Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců

Diplomová práce

Autor práce: Ing. Anna Kubátová

Vedoucí práce: Mgr. Vladimír Vrabec, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Tamara Fedorova

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a konzultanta diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 9. dubna 2015 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doktoru Vladimíru Vrabcovi, že mi umožnil věnovat se tomuto tématu a psát tímto směrem zaměřenou práci pod jeho vedením. Mé velké díky patří Ing. Tamaře Fedorové za její cenné rady a komentáře, které mi ochotně poskytovala po celou dobu psaní diplomové práce. Dále děkuji Ing. Ivě Skálové, které jsem vděčná za pomoc s vyhodnocováním sporných vzorků.

Tímto bych ráda poděkovala také zoologickým zahradám, které mi výzkum umožnily, jejich zaměstnancům, kteří se mnou aktivně komunikovali, Mgr. Michalovi Podhrazskému, Mgr. Zuzaně Mihálovové, Ing. Petře Padalíkové, a ošetřovatelům testovaných zvířat, Nadě Humlové, Janě Klementové a dalším, kteří mi ochotně sbírali vzorky slin.

Tento výzkum byl podpořen projektem CIGA ČZU v Praze č. 20145009 (51120/1313/3118).

Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců

Souhrn

Diplomová práce shrnuje dostupné poznatky o krystalizaci slin u lidí i zvířat. Experimentální část práce byla zaměřena na ověření krystalizace slin u samic orangutanů bornejských (*Pongo pygmaeus* Linnaeus, 1760) jako levné, rychlé a jednoduché metody pro základní monitoring jejich reprodukčního stavu. Dalším cílem bylo otestovat faktory (tloušťku vrstvy naneseného materiálu, teplotu při zasychání vzorků slin a změnu koncentrace), které mohou ovlivnit krystalizaci slin, na vzorcích slin velbloudů dvouhrbých (*Camelus bactrianus* Linnaeus, 1758). Výzkum probíhal od září 2014 do ledna 2015. Odběry slin od orangutaních samic ze tří zoologických zahrad (Dvůr Králové, Ústí nad Labem, Bojnice) byly prováděny denně, nejčastěji otiskem jazyka samic na broušená podložní sklíčka či odběrem přímo z tlamy plastovou lžičkou, ze které se poté sliny na podložní sklíčko přenesly. Vzorky slin velbloudů z pražské zoologické zahrady byly odebrány ve třech termínech ve větším množství, a to vždy od samce a samice, a následně ihned zpracovány v laboratoři FTZ ČZU v Praze. Vzorky slin byly vyhodnocovány pomocí světelného mikroskopu se zvětšením ×400. Vždy byl posouzen typ krystalizace a tloušťka, celistvost a hustota krystalů. Celkem bylo vyhodnoceno 246 vzorků od orangutaních samic a 180 vzorků od velbloudů. Výsledky krystalizace slin orangutaních samic byly srovnány s reprodukčním stavem samic v době odběru vzorků a bylo zjištěno, že krystalizace slin v plodných dnech se významně lišila od krystalizace slin ve dnech neplodných. To poukazuje na možnost využití krystalizace slin k detekci plodných dnů u orangutanů. Studium krystalizace slin březích samic bylo znemožněno nezabřeznutím ani jedné z testovaných samic v době výzkumu a proto byl doporučen další výzkum. Během testování faktorů na velbloudech dvouhrbých byly tloušťka vrstvy naneseného materiálu, teplota při zasychání vzorků slin a změna koncentrace slin potvrzeny jako významné faktory, které mohou krystalizaci slin ovlivnit.

Klíčová slova: arborizace, *Camelus bactrianus*, orangutan bornejský, *Pongo pygmaeus*, velbloud dvouhrbý

Reproductive status monitoring by saliva crystallization and the factors which can affect it in exotic mammals

Summary

The diploma thesis summarizes available information about human and animal saliva crystallization. The experimental part of the thesis was focused on proving of saliva crystallization in female Bornean Orangutans (*Pongo pygmaeus* Linnaeus, 1760) as a cheap, quick and simple method for basic monitoring of their reproductive status. Other aim was to test factors (thickness of smeared layer, temperature during sample drying, and change of saliva concentration), which could influence the way of saliva crystallization, in Bactrian Camels (*Camelus bactrianus* Linnaeus, 1758). The research was realized from September 2014 to January 2015. Sampling of saliva in female orangutans from three zoological gardens (Dvůr Králové, Ústí nad Labem, Bojnice) was done daily, mostly by tongue prints on safe glass slides or directly from the mouth by plastic spoon from which the saliva was transferred on the glass slide. Saliva samples from Prague Zoo camels were collected three times in higher quantity, always from male and one female, and immediately processed in the laboratory of the FTA CULS Prague. Samples evaluation was done by light microscope with the magnification ×400. Type of crystallization, thickness, entirety, and density of crystals was always assessed. In total, 246 samples from female orangutans and 180 samples from camels were evaluated. The results of saliva crystallization in female orangutans were compared with the reproductive status of females in the moment of sampling and it was discovered that the saliva crystallization during fertile period was significantly different from the saliva crystallization in non-fertile period of the cycle. It points out the possibility of usage of saliva crystallization for detection of fertile period within the menstrual cycle in orangutans. Examination of saliva crystallization in pregnant females was precluded because any of the females did not conceive during the research period. For this reason, further research was recommended. During the testing of factors in Bactrian Camels, thickness of smeared layer, temperature during sample drying, and change of saliva concentration were confirmed as factors that can significantly affect saliva crystallization.

Keywords: arborization, Bactrian Camel, Bornean Orangutan, *Camelus bactrianus*, *Pongo pygmaeus*

Obsah

1 Úvod 8
2 Vědecké hypotézy a cíle práce 10
3 Literární rešerše 11
3.1 Orangutani 11
3.2 Reprodukce u samic orangutanů 12
3.2.1 Anatomie pohlavní soustavy 12
3.2.2 Menstruační cyklus 13
3.2.3 Monitoring cyklu 16
3.2.4 Páření 16
3.2.5 Březost 17
3.2.6 Detekce březosti 17
3.2.7 Problémy s reprodukcí 18
3.3 Testování slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu samic 19
3.3.1 Odběr slin u nehumánních primátů 20
3.4 Krystalizace slin 22
3.5 Krystalizace slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu u žen 23
3.5.1 Odběry slin a provádění testů 23
3.5.2 Hodnocení krystalizace slin 24
3.5.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin 25
3.5.4 Pozitiva a negativa testování krystalizace slin 27
3.6 Krystalizace slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu u zvířat 27
3.6.1 Odběry slin a provádění testů 27
3.6.2 Hodnocení krystalizace slin 28
3.6.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin 28
3.6.4 Pozitiva a negativa testování krystalizace slin 29
3.7 Faktory ovlivňující krystalizaci slin 29
4 Materiál a metody 32
4.1 Literární rešerše 32
4.2 Zvířata 32
4.2.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 32
4.2.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 34
4.3 Odběr slin 34
4.3.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 34
4.3.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 35

4.4 Zpracovávání vzorků 35
4.4.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 35
4.4.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 36
4.5 Vyhodnocování vzorků 37
4.6 Vyhodnocování výsledků 38
4.6.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 38
4.6.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 39
4.7 Analýza dat 39
5 Výsledky 40
5.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 40
5.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 42
5.2.1 Vrstva naneseného materiálu 43
5.2.2 Teplota při zasychání vzorků slin 44
5.2.3 Změna koncentrace – ředění a přídavek soli 45
6 Diskuze 47
6.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských 47
6.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých 49
6.2.1 Vrstva naneseného materiálu 50
6.2.2 Teplota při zasychání vzorků slin 51
6.2.3 Změna koncentrace – ředění a přídavek soli 51
6.2.4 Obecné zhodnocení vlivu testovaných faktorů 53
7 Závěr 54
8 Seznam literatury 55
9 Seznam použitých zkratek a symbolů 66

1 Úvod

Monitoring cyklu a březosti je jedním z nejdůležitějších nástrojů pro úspěšný management chovu nejen u hospodářských (Heersche Jr. a Nebel, 1993; Balhara et al., 2013), ale i u divokých zvířat (Bashaw et al., 2010) včetně zvířat v zoologických zahradách (Lasley a Kirkpatrick, 1991; Kleiman et al., 2010).

Sledování říje, či přímo ovulace, hraje v lidské péči významnou roli zejména u druhů, u kterých příznaky předříjového chování či říje nejsou zjevné a u kterých je zároveň důležité správné načasování spojení samce se samicí. To totiž zvyšuje šanci na úspěšné rozmnožení (Caro a Laurenson, 1994; Knott et al., 2010) a může být zásadním řešením v případě dosavadní neplodnosti páru. Monitoring ovulace je také nezbytný pro realizaci *in vitro* fertilizace a embryotransferu (Alagendran et al., 2007).

Detekce březosti je velmi důležitá, jelikož umožňuje zisk informací o vnitřním stavu zvířat (Bashaw et al., 2010), detekuje falešnou březost (Dehnhard et al., 2010; Willis et al., 2010) či potraty samic (Willard et al., 1998; Lamb a Fricke, 2005). Pomocí některých metod lze odhadnout datum porodu a díky tomu se na porod zvířete náležitě připravit (Kleiman et al., 2010). Některými metodami je možné zjišťovat počet embryí/plodů či určovat jejich pohlaví (Lamb a Fricke, 2005) a monitorovat jejich vývoj (Suguna et al., 2008). Včasná diagnostika březosti a odhalení počtu plodů také umožňují chovatelům přizpůsobit krmnou dávku samic jejich aktuálnímu reprodukčnímu stavu a jemu odpovídající požadované kondici (Kleiman et al., 2010).

Krystalizace, někdy též označovaná jako arborizace (Skálová et al., 2012), byla u lidí pozorována téměř u všech tělních tekutin – v cervikálním hlenu (Rydberg, 1948; Pierce a Cope, 1955; Shanks a Acton, 1956; Roland, 1958; Salvatore, 1968; Boyers et al., 1991), slzách (Norn, 1988; Rolando et al., 1988; Kogbe et al., 1991; Puderbach a Stolze, 1991; Vaikoussis et al., 1994; Pensyl a Dillehay, 1998; Srinivasan et al., 2007), nosním hlenu (Peterson, 1984), folikulární tekutině, mozkomíšním moku (Zondek, 1959) či slinách (Guida et al., 1993; Braat et al., 1998; Denisov et al., 2006). U zvířat byla popsána u několika tělních tekutin, např. v cervikálním a vaginálním hlenu (Alliston et al., 1958; Noonan et al., 1975), nazálním hlenu (Tsuimira et al., 1960), slzách (Choi et al., 2009), spermatu (Gupta et al., 1990) a také ve slinách (Haberová, 2010; Pardo-Carmona et al., 2010). Z těchto tělních tekutin byly k monitoringu říje či detekci březosti pomocí krystalizace testovány u zvířat pouze cervikální (Raeside a McDonald, 1959; Betteridge a Raeside, 1962; Ghannam a Sorensen Jr, 1967; Harada, 1989; Tsiligianni et al., 2000; Rayos et al., 2001; Tsiligianni

et al., 2001; Ahmadi et al., 2005; Ježková et al., 2008; Gündogan, 2009), a vaginální hlen (Dinger a Noiles, 1982; England a Allen, 1989; England, 1992), nazální hlen (Tsuimira et al., 1960) a sliny (Pardo-Carmona et al., 2010; Skálová et al., 2012; Skalova et al., 2013).

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

1) shrnut dostupné poznatky o krystalizaci slin jako neinvazivní metodě sloužící k monitoringu cyklu a březosti;
2) experimentálně ověřit krystalizaci slin u samic orangutanů bornejských (*Pongo pygmaeus* Linnaeus, 1760) jako levnou, rychlou a jednoduchou metodu pro základní monitoring jejich reprodukčního stavu;
3) na vzorcích slin velbloudů dvouhrbých (*Camelus bactrianus* Linnaeus, 1758) stanovit faktory, které mohou krystalizaci slin ovlivňovat.

V této diplomové práci byly stanoveny následující hypotézy:

H1: krystalizace slin se bude měnit během menstruačního cyklu orangutaních samic;

H2: typy krystalizace slin u březích a nebřezích samic se budou lišit;

H3: vrstva naneseného materiálu, teplota při zasychání vzorků slin a změna koncentrace slin (ředění a přídavek soli) budou významnými faktory, které mohou krystalizaci slin ovlivnit.

3 Literární rešerše

3.1 Orangutani

Do rodu orangutan (*Pongo*) patří dva druhy – orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus*) a orangutan sumaterský (*Pongo abelii* Lesson, 1827) (ITIS, 2015). Výskyt každého z těchto primátů je omezen pouze na ostrov, podle kterého byl daný druh pojmenován. Orangutani jsou v současnosti považováni za ohrožené a jejich populační trend má klesající tendenci (Ancrenaz et al., 2008; Singleton et al., 2008). Orangutan sumaterský je s odhadovaným počtem kolem 7 000 volně žijících jedinců (Singleton et al., 2004; Caldecott a Miles, 2005; Andayani a Mardiastuti, 2009) označován dokonce za kriticky ohrožený druh (Singleton et al., 2008). U orangutana bornejského je počet zvířat ve volné přírodě odhadován na 45 000 až 69 000 (Ancrenaz et al., 2008), indonéské Ministerstvo lesnictví odhaduje počet na 55 000 volně žijících jedinců (Andayani a Mardiastuti, 2009).

Důvody jejich ohrožení spočívají zejména v devastaci původních habitatů těžbou dřeva, přeměnou přirozených ekosystémů na agroekosystémy (zejména plantáže palmy olejné) a jejich fragmentací způsobenou výstavbou komunikací (Singleton et al., 2008). Dochází i k přímému pronásledování zvířat jako škůdců na plantážích, za účelem nelegálního lovu či obchodu se zvířaty (WWF, 2015b). V oblastech výskytu orangutanů, zejména na Borneu, se opakují dlouhá období sucha a následné pralesní požáry, které se také významně podílí na snižování početnosti populací orangutanů (Husson et al., 2008). Dalším faktorem, který orangutany činí ještě zranitelnějšími a šance na jejich přežití snižuje, je způsob reprodukce těchto zvířat, která je velmi pomalá (WWF, 2015a).

Oba druhy orangutanů se v minulosti vyskytovaly na seznamu 25 nejvíce ohrožených druhů primátů. Orangutan sumaterský byl mezi 25 nejohroženějšími primáty zahrnut naposledy v letech 2008-2010 (Mittermeier et al., 2009) a jeden z poddruhů orangutana bornejského (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) se na seznamu objevil v letech 2010-2012 (Mittermeier et al., 2012). Přestože v současnosti ani jeden z obou druhů orangutanů na tomto seznamu není (Schwitzer et al., 2014), význam jejich ochrany je stále aktuální.

Na orangutany jsou zaměřeny jak *in situ* (BOSF, 2012; SOS, 2015), tak *ex situ* záchranné programy, které se odehrávají zejména v zoologických zahradách (WAZA, 2015). Právě během ochrany *ex situ* narůstá potřeba správného managementu reprodukce včetně detekce ovulace a březosti, aby mohly být záchovné programy úspěšné (Swaisgood et al., 2003).

3.2 Reprodukce u samic orangutanů

Obecně lze říci, že reprodukce orangutanů je poměrně málo prozkoumaným tématem (Graham, 1981) a studií, které by se na ni zaměřovaly, je relativně malé množství (Shumaker et al., 2008). Některé údaje jsou známé pouze od populací žijících v lidské péči, což je dáno zejména obtížností pozorování těchto druhů ve volné přírodě (Graham, 1988) či nemožností tyto informace od volně žijících jedinců získat (Shumaker et al., 2008).

Reprodukce orangutanů je velmi specifická a jsou pro ni typické určité extrémy. Reprodukční cyklus těchto primátů je velmi dlouhý (Anderson et al., 2008), dokonce nejpomalejší ze všech lidoopů (Wich et al., 2004; Shumaker et al., 2008). Díky tomu se reprodukce orangutanů potýká s mnoha problémy jak ve volné přírodě, tak v lidské péči.

Vzhledem k blízké příbuznosti orangutanů s lidmi (Springer et al., 2012) je možné mezi nimi v některých oblastech reprodukce nalézt podobnosti (Collins et al., 1975; Graham, 1981; Graham, 1988). Detailní informace o reprodukci orangutanů uvádí např. Graham (1981), Schwartz (1988), Wich et al. (2009a) či Kuze et al. (2012).

Tato kapitola nerozlišuje reprodukci jednotlivých druhů orangutanů, jelikož reprodukční parametry (věk při prvním porodu, mezidobí apod.) se mezi oběma druhy významně neliší (Anderson et al., 2008). Některé zdroje ovšem uvádějí, že rozdílnosti existují v genetice, morfologii i chování obou druhů (Knott et al., 2009).

Bez ohledu na druh byly rozdíly v reprodukčních parametrech nalezeny mezi orangutany ve volné přírodě, v polodivokých chovech v záchranných centrech a v zoologických zahradách (Kuze et al., 2008; Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013). Dostupné údaje byly pro tyto kategorie uváděny vždy zvlášť. Odlišnost reprodukčních parametrů v lidské péči může být dána mnoha faktory, jako jsou ovlivňování času, který spolu samci a samice tráví, podávání antikoncepčních preparátů (Shumaker et al., 2008) či rozdíly ve výživě (Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013).

3.2.1 Anatomie pohlavní soustavy

Zdrojů, které by se touto oblastí reprodukce zabývaly, není mnoho a častěji se věnují anatomii samčí pohlavní soustavy (Dahl et al., 1993; Dahl, 1994). O anatomii pohlavní soustavy samic pojednávají některé kapitoly knihy editované Schwartzem (1988), který však upozorňuje, že tato oblast reprodukce není detailně prokoumána a dostupné poznatky pochází od malého množství jedinců.

Pohlavní orgány samic orangutanů jsou částečně podobné ženským (Graham, 1981; Dahl, 1988; Graham, 1988). Vaječníky jsou relativně malé (Graham, 1988). Vejcovody odpovídají lidským, ovšem u orangutanů jsou fimbrie nálevky více vyvinuté (Graham, 1981; Graham, 1988). Děloha je oproti lidské znatelně menší. Uretrovaginální septum není stejně jako u samic ostatních lidoopů úplné, takže močová trubice ústí spolu s vagínou do vaginálního vestibulu. To je hlavní rozlišovací znak od pohlavní soustavy žen (Graham, 1988). Uspořádání zevních pohlavních orgánů je podobné ženskému (Dahl, 1988). Dříve se předpokládalo, že velké stydké pysky s věkem postupují atrofii, což bylo vyvráceno a Dahl (1988) uvádí, že u dospělých samic jsou jasně viditelné, na rozdíl od malých stydkých pysků, které jsou v dospělosti málo zřetelné.

3.2.2 Menstruační cyklus

Ve volné přírodě samice dosahují pohlavní dospělosti průměrně mezi 10. až 11. rokem života, kdy u nich dochází k první menstruaci a samice se začínají zajímat o jedince opačného pohlaví. Samci však čerstvě pohlavně dospělým samicím nevěnují příliš pozornost (Shumaker et al., 2008) a proto k prvním porodům dochází až v pozdějším věku.

Věk v době prvního porodu se liší mezi orangutany v lidské péči, v záchranných centrech a ve volné přírodě (Kuze et al., 2008; Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013). V záchranných centrech samice prvně rodí přibližně ve věku 11,5 roku (Kuze et al., 2012), což je výrazně dříve, než u samic v zoologických zahradách a ve volné přírodě, u nichž k prvnímu porodu dochází v průměru mezi 15. a 16. rokem (Wich et al., 2004; Anderson et al., 2008; Kuze et al., 2012). Tyto rozdíly však mohou být způsobeny pouze špatným odhadem věku dříve neznámých samic, které do záchranných center přišly z volné přírody (Kuze et al., 2012), popřípadě odlišností kvality výživy. Možnost samostatného výběru vhodné potravy v kombinaci s příkrmem umožňuje samicím v záchranných centrech dostatečný příjem energie (Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013), který může způsobit vyšší produkci pohlavních hormonů (Knott et al., 2009) a tím i rychlejší pohlavní dospívání samic (Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013). Toto vysvětlení podporuje i fakt, že produkce pohlavních hormonů během menstruačního cyklu je nižší u volně žijících orangutaních samic, než u samic v lidské péči, pro které je kvalitnější potrava dostupnější (Knott et al., 2009).

U samic většiny savců se v určitém intervalu periodicky opakuje říjový cyklus, během kterého je samice svolná k páření pouze v době říje, kdy dochází k ovulaci. U samic orangutanů se stejně jako u žen a samic ostatních lidoopů vyskytuje cyklus menstruační

a k páření dochází během celého cyklu (Udry a Morris, 1968). I přesto se však u orangutanů období plodných dnů nazývá, stejně jako u zvířat s říjovým cyklem, říje (Nadler, 1995; Shumaker et al., 2008).

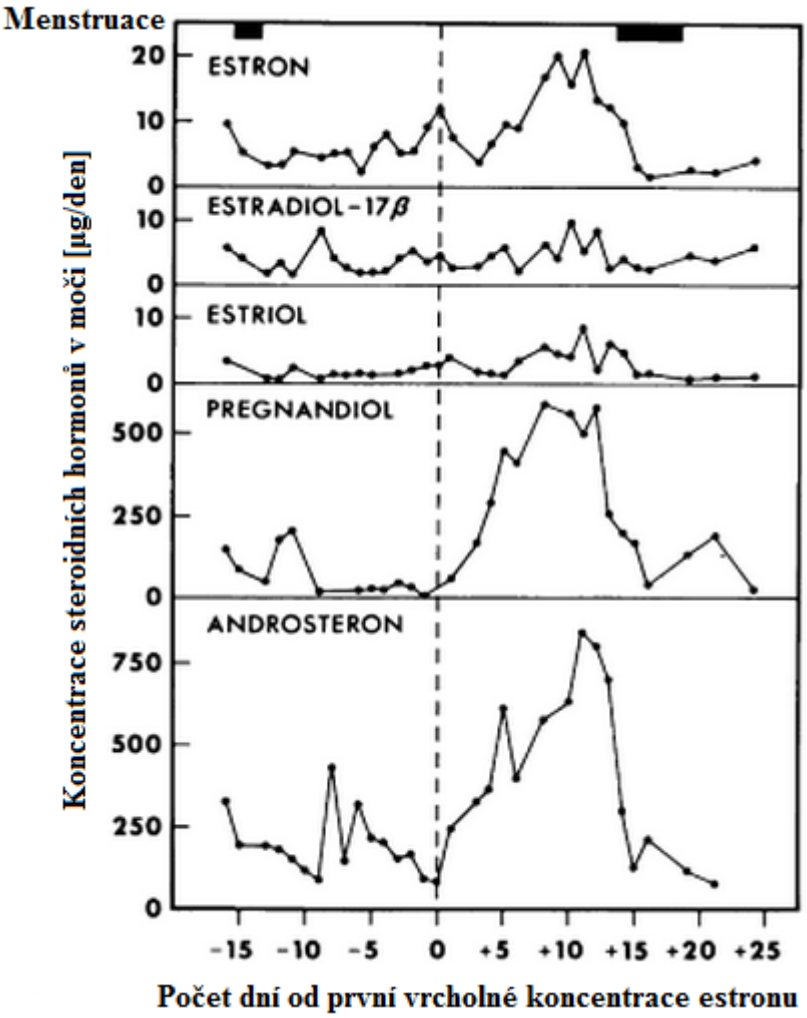
Délka menstruačního cyklu je variabilní jak mezi samicemi, tak mezi jednotlivými cykly konkrétních samic (Graham, 1981). Graham (1981) udává délku 24-32 dní. Markham (2005) uvádí průměrnou délku menstruačního cyklu 30-35 dní u nedospělých samic (menstruující méně než 2 roky) a 26-30 dní u dospělých samic. Shumaker et al. (2008) zaznamenali průměrné rozpětí 24-33 dní s průměrnou délkou 28 dní. Délka menstruace se pohybuje dle Markham (2005) mezi 2 a 5 dny u nedospělých samic a 2 a 4 dny u dospělých samic. Shumaker et al. (2008) stanovují průměrnou délku 5-7 dní.

Menstruační cykly mohou být nepravidelné u mladších (nedospělých) samic či u samic, kterým byla v nedávné době podávána antikoncepce. Postupem času se však cyklus stabilizuje (Shumaker et al., 2008).

Collins et al. (1975) sledovali změny hladin pohlavních hormonů v moči během menstruačního cyklu u orangutaních samic v lidské péči. Hladiny estronu a 17β-estradiolu odpovídaly hladinám u žen a šimpanzích samic, zatímco hodnoty estriolu byly nižší než u žen a vyšší než u šimpanzů. Koncentrace pregnandiolu a androsteronu byly významně nižší než u žen. Hladiny estronu dosahovaly dvou vrcholů – ve střední a v luteální fázi cyklu. U estriolu ani 17β-estradiolu nebyl nalezen žádný trend. Koncentrace pregnandiolu a androsteronu byly nízké během první fáze cyklu, ve střední části cyklu začaly narůstat a vrcholu dosáhly v druhé polovině cyklu (Collins et al., 1975). Změny hladin výše uvedených hormonů v moči během menstruačního cyklu orangutaních samic jsou k dispozici na Obrázku 1.

Shimizu et al. (2003) testovali v moči orangutaních samic změny koncentrací konjugátů estronu, pregnandiol-3-glukoronidu, a folikulostimulačního hormonu. Stejně jako Collins et al. (1975) zaznamenali u estronu dvouvrcholovou křivku odpovídající i cyklu žen a nárůst koncentrace pregnandiolu po ovulaci. U orangutaních samic byly však koncentrace pregnandiolu zhruba o desetinu nižší, než u ostatních lidoopů. Folikuly stimulační hormon vykazoval stejný trend jako u žen, což znamená nárůst jeho hladiny ve střední části cyklu a v rané folikulární fázi (Shimizu et al., 2003).

Stejných výsledků dosáhli i Nadler et al. (1984), kteří zkoumali hladiny luteinizačního hormonu, progesteronu a estradiolu v séru orangutaních samic a navíc zaznamenali hladiny testosteronu, které dosahovaly maxima během střední části cyklu.



Obrázek 1: Změny hladin hormonů v moči během menstruačního cyklu samic orangutanů (zdroj: upraveno dle Graham (1981))

Synchronizace menstruačního cyklu nebyla u samic v lidské péči zaznamenána (Shumaker et al., 2008), ale Graham (1981) popisuje částečnou synchronizaci reprodukce samic ve volné přírodě, která může způsobit v některých částech pralesa až absenci samic aktuálně schopných páření a zabřeznutí. Sezónnost reprodukce se u orangutanů obecně neprojevuje, ale byly zaznamenány vyšší míry zabřezávání v obdobích s větší dostupností potravy (Knott et al., 2009).

Příznaky menopauzy nebyly ve volné přírodě pozorovány (Wich et al., 2004), ale je známo, že v lidské péči rodí samice svá poslední mláďata průměrně kolem 26. (*P. abelii*) až 29. roku života (*P. pygmaeus*) (Anderson et al., 2008). Nejvyšší zaznamenaný věk při porodu v zoo je 41 let, přičemž v lidské péči se samice dožívají maximálně 58 let. Naopak ve volné přírodě byl zaznamenán porod i u 50leté samice a odhaduje se, že samice jsou schopné se rozmnožovat až do konce života. Je možné,

že rozdíly jsou dány pouze managementem, kdy v zoo dochází k předčasnému vyřazování samic z reprodukce v domnění, že jsou na reprodukci již příliš staré (Shumaker et al., 2008).

3.2.3 Monitoring cyklu

Průběh menstruačního cyklu může být u lidoopů sledován na základě pozorování dvou typů vnějších projevů – menstruace a otoku zevních pohlavních orgánů. Otoky se projevují pouze u goril, šimpanzů a bonobů (Graham, 1981), zatímco u orangutaních samic se, stejně jako u žen, tento projev nevyskytuje (Graham, 1988). Menstruaci lze dobře pozorovat u šimpanzů a bonobů chovaných v ubikacích s pevnou hladkou podlahou. U goril a orangutanů však viditelná menstruace není běžná a přítomnost krve lze zjišťovat často pouze testováním moči (Graham, 1981; Shumaker et al., 2008). Existují však i výjimky (Shumaker et al., 2008).

Vzhledem k výše uvedeným důvodům je detekce říje či přímo ovulace u orangutanů velmi obtížná a často je lze detekovat pouze nepřímo (Graham, 1981), zejména sledováním hladin pohlavních hormonů, což je poměrně přesná metoda (Shimizu et al., 2003). Na nadcházející ovulaci poukazuje nejprve nárůst hladiny estrogenů a poté maximální koncentrace luteinizačního hormonu, který ovulaci vyvolává (Graham, 1981). Dále lze využít i ultrazvukové vyšetření (Joslin et al., 1995).

U orangutaních samic však bylo ve vztahu k monitoringu cyklu a ovulace testováno i měření změn bazální tělesné teploty (BTT) (Asa et al., 1994). Naměřené změny BTT byly následně porovnávány se změnami hladin konjugátů estronu a pregnandiol-3-glukoronidu a bylo zjištěno, že změny teploty pozitivně korelují se změnami koncentrace pregnandiol-3-glukoronidu. Přestože přesný čas ovulace pomocí BTT zjistit nelze, sledování změn BTT je možné využít k orientačnímu monitoringu cyklu, zejména jeho luteální fáze (Asa et al., 1994).

3.2.4 Páření

Ve volné přírodě se samci a samice za účelem rozmnožování sdružují po dobu několika dní, kdy dochází k opakovanému páření. V této době jsou samice pravděpodobně v receptivní části cyklu (Graham, 1981). U žen se toto plodné období objevuje přibližně v době 5-6 dní před ovulací včetně dne ovulace (Wilcox et al., 1995; Dunson et al., 2002), přičemž k ovulaci dochází asi 13. až 14. den cyklu (Alagendran et al., 2010), který průměrně trvá 28-34 dní (La Marca et al., 2006). Je však známo, že údaje týkající se plodných dnů jsou často nespolehlivé a velmi individuální (Wilcox et al., 2000).

Páření orangutanů v lidské péči bylo pozorováno Nadlerem (1977), který zjistil, že hlavním iniciátorem styku jsou samci a ke kopulaci dochází i přes nevoli samic, jež se projevuje v jiné než receptivní části cyklu (Nadler, 1995). To je však rys, který se objevuje pravděpodobně pouze v uzavřených chovech, jelikož ve volné přírodě mají samice možnost se samci vyhnout (Graham, 1988). Stejně jako ve volné přírodě dochází k největšímu množství kopulací zhruba v polovině cyklu samic, kdy se samice stávají receptivními, jsou více svolné k páření, projevují rostoucí zájem o samce a zvýšené sexuální chování (Nadler, 1977; Nadler, 1995).

U orangutanů v lidské péči byla testována i možnost využití reprodukčních biotechnologií, které zahrnovaly např. odběr oocytů, *in vitro* fertilizaci, embryotransfer či inseminaci (Joslin et al., 1995). První orangutan počatý za pomoci asistované reprodukce se narodil v roce 2014 (leozoo.org, 2014).

3.2.5 Březost

Délka březosti je u orangutanů značně variabilní a pohybuje se mezi 223 a 275 dny (Shumaker et al., 2008), přičemž se rodí většinou pouze 1 mládě. Dvojčata se rodí přibližně v 1 % případů. Ve volné přírodě bylo narození dvojčat pozorováno poprvé v roce 2011 (Goossens et al., 2011).

Jung et al. (2013) monitorovali hladiny pohlavních hormonů u orangutaních samic a zjistili, že koncentrace progesteronu v séru březích samic je 30krát vyšší než u samic nebřezích a koncentrace lidského choriového gonadotropinu se během březosti liší od koncentrací zjištěných u ostatních lidoopů. Czekala et al. (1983) sledovali hladiny estrogenů v moči během březosti a došli k závěru, že orangutani mají hladiny estrogenů odpovídající lidským, které jsou 4-5krát vyšší než u goril a šimpanzů.

3.2.6 Detekce březosti

Přestože otoky vnějších pohlavních orgánů se během menstruačního cyklu neobjevují, v době březosti může být jedním z vnějších vizuálních projevů umožňujících její nepřímou detekci otok velkých stydkých pysků (Graham, 1981). Stupeň otoku je však individuální a u některých samic může být otok málo zřetelný (Shumaker et al., 2008).

K detekci březosti u orangutanů lze dále využít stanovování hladin pohlavních hormonů z moči (Czekala et al., 1981) či trusu (Bamberg et al., 1991), speciální kity pro stanovení březosti u nehumánních primátů (Hodgen et al., 1977), ultrazvuk nebo ženám určené těhotenské testy založené na otestování moči (Rees, 2011).

3.2.7 Problémy s reprodukcí

Ve volné přírodě jsou orangutani solitérně žijící zvířata a první komplikací, která ovlivňuje reprodukci tohoto druhu, je obtížné nalezení partnera vhodného k reprodukci (Graham, 1981). Situaci komplikuje i pozdní dospívání samic (Shumaker et al., 2008).

Dalším problémem jsou poměrně dlouhé intervaly mezi porody způsobující extrémně pomalou reprodukci těchto zvířat (Wich et al., 2004; Anderson et al., 2008; Shumaker et al., 2008). Intervaly se liší mezi volně žijícími orangutany, orangutany v záchranných centrech a orangutany v zoologických zahradách. V záchranných centrech se intervaly pohybují kolem 6 let (Kuze et al., 2012; Galdikas a Ashbury, 2013). V zoo je to běžně kolem 5 let (Anderson et al., 2008; Shumaker et al., 2008; Kuze et al., 2012). Existují sice i kratší než 1 rok, ale ty značí např. odebrání potomka k umělému odchovu, potrat nebo úmrtí mláděte během či krátce po porodu (Shumaker et al., 2008).

Ve volné přírodě jsou intervaly značně delší (Shumaker et al., 2008). Dle Kuze et al. (2012), kteří shromáždili data z mnoha studií, je průměrná doba intervalu ve volnosti 8 let, s čímž souhlasí i Galdikas a Ashbury (2013). Byla však zaznamenána i populace s průměrným intervalem 9,3 roku (Wich et al., 2004). Shumaker et al. (2008) uvádí ve volné přírodě průměrné rozpětí 6,1-9,3 roku, přičemž zaznamenané extrémy jsou 5 a 13,8 roku. Je zřejmé, že převažují intervaly delší než 7 let, což je logické vzhledem k tomu, že přirozený odstav se objevuje kolem 7. roku života mláďat (Shumaker et al., 2008).

Pomalý vývoj mláďat (Anderson et al., 2008) a jejich vyšší úmrtnost do 4 let v záchranných centrech (40 %) a zoologických zahradách (20 %) jsou další faktory přispívající k pomalému tempu navyšování populace orangutanů (Anderson et al., 2008; Kuze et al., 2012). Ve volné přírodě se míra úmrtnosti odhaduje nižší, kolem 12 % (Kuze et al., 2012). Rozdíl je dán pravděpodobně nevhodným managementem chovů (Markham, 2005), což se ovšem dle Wich et al. (2009b) s moderním managementem mění.

Vzhledem k ohroženosti obou druhů orangutanů a výše zmíněným problémům s jejich reprodukcí je nutné hledat nové metody, které napomohou snazšímu rozmnožování těchto zvířat v lidské péči. Tyto metody by měly být zejména spolehlivé (Alagendran et al., 2007), jednoduché (Krishna Rao a Veena, 2009), ekonomické a časově nenáročné (Lalrintluanga a Dutta, 2009), pokud možno neinvazivní (Dilrukshi a Perera, 2009) a se snadno interpretovatelnými výsledky (Rao Krishna a Veena, 2009). U metod používaných k detekci březosti je nutné, aby byly bezpečné nejen pro vyšetřovatele a testovanou samici ale i pro embryo či plod (Gargiulo et al., 2012).

3.3 Testování slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu samic

V rámci výzkumů zaměřených na využití slin k detekci říje či březosti u zvířat byly testovány hormonální analýzy slin (Czekala a Callison, 1996; Ohtaki et al., 1997; Sathe, 2012; Volkery et al., 2012) a jejich krystalizace (Pardo-Carmona et al., 2010; Skálová et al., 2012; Skalova et al., 2013). Mezi hormony, které souvisí se změnami reprodukčního cyklu samic a jsou ve slinách zvířat běžně stanovovány, patří např. progesteron (Sathe, 2012), pregnanediol-3-glukuronid (Volkery et al., 2010), estron sulfát (Ohtaki et al., 1997) či relaxin (Volkery et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že odběr slin na rozdíl od odběru např. trusu vyžaduje větší spolupráci zvířat, jsou analýzy slin zaměřené na monitoring reprodukce samic běžnější u hospodářských zvířat (Ohtaki et al., 1997; Volkery et al., 2010; Sathe, 2012; Skálová et al., 2012; Volkery et al., 2012). Pouze malé množství takto zaměřených studií se soustředí na výzkum slin exotických zvířat (Hodges et al., 2010). Výjimkou jsou např. studie na nosorožcích dvourohých (*Diceros bicornis* (Linnaeus, 1758)) (Czekala a Callison, 1996) či velbloudech dvouhrbých (*Camelus bactrianus*) (Kajzrová, 2011).

U nehumánních primátů, včetně orangutanů, jsou hormonální analýzy slin poměrně běžné, avšak nejsou využívány pro monitoring reprodukce samic, ale pro stanovování hladin kortizolu jako ukazatele stresu (Elder a Menzel, 2001; Kuhar et al., 2005; Behringer et al., 2009; Heintz et al., 2011; Behringer et al., 2014) či sledování hladin testosteronu u samců (Kutsukake et al., 2009; Wobber et al., 2010; Wobber et al., 2013). Analýza slin byla pro sledování hormonálních změn během menstruačního cyklu samic využita, dle autorce dostupných zdrojů, pouze u malp hnědých (*Cebus apella* (Linnaeus, 1758)). V rámci studie byly srovnávány hladiny progesteronu ve slinách a krevní plazmě a analýza progesteronu ze slin se u tohoto druhu zdá být vhodnou alternativou invazivních metod (DiGiano et al., 1992). Na rozdíl od hormonálních analýz, krystalizace slin nebyla u primátů, vyjma člověka, dosud studována.

Testování slin má nesporné výhody. Odběr slin, přestože je prováděn odběrem přímo z tlamy zvířete, je běžně považován za jednu z neinvazivních metod sběru vzorků (Kutsukake et al., 2009; Skálová et al., 2012; Skalova et al., 2013). Tyto metody jsou v současnosti stále více preferované (Garshelis, 2006; Kleiman et al., 2010), jelikož umožňují získávat vzorky, aniž by bylo nutné se zvířaty nějakým způsobem manipulovat či je fixovat (Waits a Paetkau, 2005). Neinvazivnost této metody je však podmíněna tím, že zvíře není během odběrů

stresováno (Hodges et al., 2010; Behringer et al., 2014) či pro účely odběru slin dokonce uspáváno (Li et al., 2013). Stres může být u zvířat minimalizován dostatečně dlouhou dobou tréninku a navykání na způsob odběrů slin, vybavení k tomu potřebné i na člověka, který je provádí (Kutsukake et al., 2009; Behringer et al., 2014). Samotný trénink může však být, zejména zpočátku, dosti stresující (Behringer et al., 2014).

Dalšími významnými výhodami využití slin k hormonálním analýzám jsou, vzhledem k neinvazivnosti metody, možnost opakovaných odběrů slin během dne (Šimůnková et al., 2009), stabilita slin během uchovávání při pokojové teplotě i bez užití konzervačních aditiv (Wood, 2009) či nižší riziko přenosu infekce v porovnání např. s krví (Šimůnková et al., 2009).

I přes tyto výhody není testování slin u zvířat tak běžné, jako testování moči či trusu, jejichž získání lze provést též neinvazivně (Kleiman et al., 2010). U nehumánních primátů, včetně lidoopů, je mnohem častější sledování cyklu a březosti samic právě dle hormonů v moči a trusu, což dokládá např. výčet vybraných studií od Hodgese et al. (2010). Pro sliny, oproti moči či trusu, je typická jejich rychlá reakce na změny hladin steroidních hormonů. To však může být výhodné jen pro určité typy studií, např. při testování hladin kortizolu v souvislosti se stresem (Kutsukake et al., 2009; Heintz et al., 2011). Koncentrace pohlavních hormonů však ve slinách rychle kolísají a pro získání spolehlivých výsledků je nutné odběry slin opakovat vícekrát denně, což je poměrně pracné (Wood, 2009).

Nízký počet výzkumů s využitím slin je dán pravděpodobně nejen problémy s odběrem slin od neochočených zvířat a nutností odběry opakovat, ale i potřebou následných laboratorních analýz. Ty totiž nejsou vždy možné, pro mnoho chovatelských zařízení mohou být příliš nákladné (Kleiman et al., 2010) a často nemají ustálenou metodiku. Hormony ze slin se mohou absorbovat do odběrového materiálu, což může následně ovlivňovat výsledky (Šimůnková et al., 2009), které jsou navíc získávány s určitým zpožděním (Simersky et al., 2007) a poměrně často se vyskytují i potíže s jejich interpretací (Šimůnková et al., 2009).

Z těchto důvodů se stále hledají levnější alternativy, které by byly zároveň rychlé a jednoduché, aby je ošetřovatelé mohli provádět sami okamžitě po odběru vzorků.

3.3.1 Odběr slin u nehumánních primátů

Odběry slin u primátů, vyjma člověka, byly testovány jak na ochočených jedincích z výzkumných středisek (Elder a Menzel, 2001; Heintz et al., 2011), útulků (Kutsukake et al., 2009; Smiley et al., 2010) nebo zoo (Mau et al., 2010; Behringer et al., 2012), tak na k lidem

přivyklých polodivoce chovaných zvířatech (Wobber et al., 2013) či zcela divokých jedincích (Inoue et al., 2007; Higham et al., 2010; Smiley et al., 2010).

Přístup k odběrům slin je různý dle míry divokosti či ochočenosti jedince. U ochočených zvířat, která jsou v denním kontaktu s lidmi, např. v zoo, je často užíván trénink pomocí pozitivního posilování (Behringer et al., 2009; Behringer et al., 2014) či systému odměn v podobě pamlsků (Hodges et al., 2010) usnadňující následné přímé odběry slin z tlamy či odběry probíhající ve spolupráci se zvířaty. V těchto případech mohou být pamlsky či jiné krmivo využívány současně i ke stimulaci produkce slin (Wobber et al., 2010). U divokých zvířat jsou odběry slin prováděny většinou nepřímo, nejčastěji stěrem slin z předmětů, které mělo zvíře v tlamě (Inoue et al., 2007; Smiley et al., 2010), ale existují i výjimky (Higham et al., 2010).

U ochočených či trénovaných jedinců patří mezi nejčastěji užívané metody odběru slin podání savého materiálu zvířeti do tlamy, odkud jsou sliny tímto způsobem absorbovány (Hodges et al., 2010), a zvíře aktivně spolupracuje odevzdáním vzorku zpět chovateli. Například u šimpanzů (*Pan troglodytes* (Blumenbach, 1775)) a bonobů (*Pan paniscus* Schwarz, 1929) byly odběry úspěšně prováděny pomocí odličovacích vatových tamponů s pamlsky, které měly zvířata nalákat. Spolu s pamlskem si zvířata do tlamy vzala i tampón, který absorboval sliny. Sliny byly z tamponů následně vymačkány a využity k dalším analýzám. Odběr tímto způsobem netrval u žádného vzorku déle než 20 minut (Wobber et al., 2010). Podobným způsobem byly u lidoopů, včetně obou druhů orangutanů, k odběrům slin využity dentální tampony, které zvířata po podání žvýkala a za odměnu následně odevzdala do rukou ošetřovatele (Behringer et al., 2009; Kutsukake et al., 2009; Heintz et al., 2011; Behringer et al., 2012; Behringer et al., 2013; Behringer et al., 2014). V rámci některých studií byly během tréninku odběrů slin tampóny namáčeny do cukerného roztoku (Behringer et al., 2009; Behringer et al., 2012; Behringer et al., 2013; Behringer et al., 2014) či limonády (Kutsukake et al., 2009), aby byl materiál na žvýkání pro zvířata přijatelnější. Kromě vaty bylo během výzkumů využito i jiných savých materiálů. Např. gorilám východním (*Gorilla beringei* Matschie, 1903) byly ke žvýkání předkládány kusy provazů (Smiley et al., 2010) a šimpanzi žvýkali gázu, ze které byly sliny následně centrifugovány (Kutsukake et al., 2009).

Metody, které se od předchozích vymykají, jsou metody přímého odběru slin z tlamy ochočených zvířat. Elder a Menzel (2001) zaváděli samici orangutana bornejského sondu do tlamy, odkud sliny odsávali do zkumavek. Kutsukake et al. (2009) odebírali šimpanzům sliny přímo z tlamy pomocí polypropylenových stříkaček.

U volně žijících zvířat je častější využití nepřímých metod odběru. Smiley et al. (2010) využívali tří různých nepřímých metod pro získávání vzorků slin k analýzám DNA od volně žijících goril východních – stěr tamponem, ždímání a smývání slin z předmětů, které mělo zvíře v tlamě, přičemž nejvíce se osvědčila metoda stěru. Stejnou metodu použili i Inoue et al. (2007) pro odběr šimpanzích slin z okousaných větviček. Oproti tomu Higham et al. (2010) použili k odběrům slin u volně žijících makaků rhesusů (*Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780)) metodu běžně používanou pro ochočené primáty – dentální tampón připevněný na provázku, který byl zvířatům na dálku nabídnut ke žvýkání.

3.4 Krystalizace slin

Krystalizace tělních tekutin byla poprvé pozorována panem Georgem Nicholasem Papanicolaouem v roce 1946 u lidského cervikálního hlenu a Papanicolaou byl také první, kdo poukázal na možný vztah mezi krystalizací a hladinou estrogenů (Papanicolaou, 1946; Zondek, 1959). Krystalizace slin ve spojení s dobou ovulace byla u lidí poprvé popsána v roce 1957 (Biel Casals, 1968) a u zvířat v roce 2010 (Haberová, 2010; Pardo-Carmona et al., 2010).

Krystalizace vzniká v roztocích bílkovin či sacharidů (Zondek, 1959), které mají funkci biopolymerů (Kogbe et al., 1991), s elektrolyty. Elektrolyty jsou pro vznik krystalizace nezbytné, což bylo dokázáno testováním dialyzovaných vzorků, které krystalizaci nevykazovaly a po opětovném dodání elektrolytů vykrystalizovaly. Většina krystalů (97 %) je tvořena krystalizací chloridu sodného (NaCl) (Zondek, 1959), který svou typickou krychlovou krystalizaci mění v přítomnosti proteinů v keříčkovité struktury (Anderson a Reid, 2006; Nielsen, 2008). Kogbe et al. (1991), studující krystalizaci slz, nepovažují za hlavní faktor určující vznik krystalizace pouze přítomnost elektrolytů, ale i jejich poměr (zejména poměr monovalentních iontů Na^+ a K^+ k bivalentním Ca^{2+} a Mg^{2+}). U slin se této problematice věnují Guida et al. (1993), kteří uvádí, že krystalizace slin vzniká ve chvíli, kdy je ve slinách dosažen optimální poměr vody, solí a sialomucinů.

Monitoring plodných dnů a ovulace pomocí krystalizace slin je založen na předpokladu, že se krystalizace slin během menstruačního/říjového cyklu mění, což bylo potvrzeno mnoha studiemi (Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Pattanasuttinont et al., 2007; Pardo-Carmona et al., 2010). Existují však i studie, které to vyvrací (Berardono et al., 1993).

Alagendran et al. (2010) uvádí, že na krystalizaci slin a její změny mají vliv cyklické změny hladin pohlavních hormonů. Dává vznik krystalizace do souvislosti s estrogenní

aktivitou, jelikož bylo potvrzeno, že v důsledku působení estrogenů se zvyšuje hladina elektrolytů – sodíku a draslíku (Alagendran et al., 2007). Bylo však zjištěno, že během ovulace nejsou ve slinách zvýšeny pouze hladiny pohlavních hormonů, ale i např. glykosaminoglykany (mukopolysacharidy), které by mohly být hlavní příčinou silnější krystalizace během ovulace (Alagendran et al., 2010). Guida et al. (1993) se domnívají, že estrogeny mohou mít na vznik krystalizace pozitivní vliv tím, že optimalizují již dříve zmíněný poměr vody, solí a sialomucinů. Podobný názor má i Biel Casals (1968), který tvrdí, že krystalizace kopíruje estrogenní křivku. Naopak Berardono et al. (1993) popírají, že by krystalizace jakkoli souvisela s aktivitou estrogenů. Toto stanovisko zastávají i Braat et al. (1998), kteří udáváájí, že koncentrace 17β-estradiolu ve slinách sice korelují s koncentracemi tohoto hormonu v séru, ale nekorelují se změnami v krystalizaci. Fehring a Gaska (1998) tvrdí, že výskyt krystalizace slin koreluje s hladinou luteinizačního hormonu.

3.5 Krystalizace slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu u žen

Přestože krystalizace slin nebyla u lidoopů dosud studována, u lidí, jejich geneticky nejbližších příbuzných (Wildman et al., 2003; Springer et al., 2012), je intenzivně zkoumaným tématem, což dokládají četné studie. Výzkum krystalizace lidských slin probíhá zejména ve spojitosti s možností jejího využití k monitoringu ovulace (Rotta et al., 1992; Guida et al., 1993; Galati et al., 1994; Braat et al., 1998; Guida et al., 1999; Alagendran et al., 2007; Alagendran et al., 2010; Salmassi et al., 2013), ale existují i studie sledující změny krystalizace slin v souvislosti s těhotenstvím (Kullander a Sonesson, 1965; Biel Casals, 1968), hormonálními poruchami (Guida et al., 1993; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003), či jinými nemocemi (Andonopoulos et al., 1992; Maragou et al., 1996; El-Miedany et al., 1999; Denisov et al., 2005; Denisov et al., 2006; Radzol et al., 2012).

3.5.1 Odběry slin a provádění testů

Metody odběru lidských slin pro testování jejich krystalizace se mohou lišit a jsou určovány zejména způsobem následného vyhodnocování vzorků, které může probíhat za užití buď optického (Guida et al., 1993; Guida et al., 1999), světelného (Andonopoulos et al., 1992; Braat et al., 1998; Pattanasuttinont et al., 2007) či polarizačního (El-Miedany et al., 1999) mikroskopu nebo kapesního (mini) mikroskopu speciálně upraveného do podoby domácího testu (Barbato et al., 1993; Guida et al., 1993; Galati et al., 1994; Braat et al., 1998; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003; Salmassi et al., 2013). Stavbu i použití těchto mini-testů

popisují např. Galati et al. (1994), Fehring a Gaska (1998) či Bensinger (2003). Dle Guida et al. (1993) byly výsledky získané pomocí mini-mikroskopů správné v 92 % případů.

Při použití klasického mikroskopu jsou vzorky odebírány např. pomocí dentálních tampónů a následně jsou 2-3 kapky slin rozetřeny na podložní sklíčka (Barbato et al., 1993; Alagendran et al., 2007; Alagendran et al., 2010). El-Miedany et al. (1999) testovali vhodnost odběrů slin stěrem z vnitřní strany tváře, spodního rtu, jazyka a přímý odběr slin, přičemž jako nejvhodnější uvádí stěry z tváře a odběry slin. U domácích testů se olizuje přímo čočka vkládaná do mini-mikroskopu (Bensinger, 2003) nebo stejně jako u klasických mikroskopů lze na ni sliny nanést, např. prstem (Fehring a Gaska, 1998). Co však zůstává stejné u obou postupů, je ponechání vzorků při pokojové teplotě, aby před vyhodnocováním zaschly (Biel Casals, 1968; Andonopoulos et al., 1992; Barbato et al., 1993; Braat et al., 1998; Fehring a Gaska, 1998; El-Miedany et al., 1999; Guida et al., 1999).

3.5.2 Hodnocení krystalizace slin

Při vyhodnocování domácích mini-testů je nalezení kompletní či částečné krystalizace považováno za znak plodných dnů (pozitivní výsledek testu), zatímco nepřítomnost krystalů značí dny neplodné (negativní výsledek testu) (Barbato et al., 1993; Braat et al., 1998; Fehring a Gaska, 1998). Někteří autoři ještě rozlišují přechodné období během nástupu plodných dnů, pro které je typická částečná krystalizace (Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Pattanasuttinont et al., 2007), která je dle Alagendran et al. (2007) tvořena nižším počtem krystalů. Plodné dny jsou pak značeny pouze úplnou krystalizací (Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Pattanasuttinont et al., 2007). Bensinger (2003) uvádí, že náznaky krystalizace se mohou objevit i během neplodných dnů, ale tato krystalizace je náhodná, není celistvá a má podobu nespojitých teček. Ovšem dle Berardono et al. (1993) mohou sliny krystalizovat během celého cyklu a vznik krystalizace s cyklem vůbec nesouvisí.

Autoři nejčastěji rozeznávají nepřítomnost krystalů, částečnou a úplnou krystalizaci (Rotta et al., 1992; Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Salmassi et al., 2013). Braat et al. (1998) rozlišuje pouze přítomnost či nepřítomnost krystalizace. Pattanasuttinont et al. (2007) ji hodnotí třemi stupni 1-3 dle rozsahu a intenzity. Maragou et al. (1996) rozdělují krystalizaci do 4 typů na základě 4 kritérií: uniformita, větvení, rozprostření a integrita. Andonopoulos et al. (1992) sledují zejména rozdíly v tloušťce, délce, pravidelnosti a hustotě krystalů.

Barbato et al. (1993), Fehring a Gaska (1998) a Pattanasuttinont et al. (2007) dělí krystalizaci do 3 typů: 1 – žádná viditelná krystalizace (nahodilá, nespojité tečky) značící

neplodné dny, 2 – částečná (kombinace teček a kapraďovité či jiné krystalizace) značící přechodné a potenciálně plodné období, 3 – kapraďovitá krystalizace značící nejvyšší plodnost (a dle některých výrobců testů přímo i ovulaci). Někdy je však obtížné od sebe jednotlivé typy jasně odlišit a Fehring a Gaska (1998) uvádí, že u 45 % testovaných žen ke vzniku úplné krystalizace (typu 3) během pokusů ani nedošlo.

Guida et al. (1999) rozlišují 4 typy krystalizace: 0 – žádná krystalizace (neplodné dny), 1 – krystalizace s primárním větvením, 2 – krystalizace se sekundárním větvením (1 a 2 značí předovulační periodu), 3 – krystalizace s terciálním větvením (ovulace).

3.5.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin

Výsledky testování krystalizace slin se dosti různí a většina autorů doporučuje další výzkum (Biel Casals, 1968; Barbato et al., 1993; Guida et al., 1993; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003).

Barbato et al. (1993) tvrdí, že krystalizace slin přímo koreluje s dobou plodných dnů. Během pozorování, které prováděl Biel Casals (1968) byla maximální krystalizace pozorována 4-5 dní před ovulací a 6-7 dní po ovulaci. Dle Bensinger (2003) se krystalizace začíná objevovat cca 3 dny před ovulací a mizí 2-3 dny po ní.

Během pokusů, které prováděli Galati et al. (1994) na 328 ženách, byla pomocí krystalizace slin určena správná fáze cyklu (plodné dny, přechodná perioda, neplodné dny) v 98 %. Pouze u 8 z 328 žen se vyskytl falešně negativní výsledek.

Testování krystalizace je však prováděno nejen na ženách v plodném věku. Biel Casals (1968) pozoroval absenci krystalizace slin u čerstvých novorozenců, její vznik s maximem krystalů 24 hodin po porodu a následný rapidní pokles. Dále testoval i těhotné ženy, ženy po porodu a menopauze, u kterých převažovaly výsledky negativní a slabě pozitivní.

Braat et al. (1998) během svých pokusů otestovali 10 post-menopauzálních žen a 10 mužů, přičemž u 8 z 10 těchto žen a u všech 10 mužů se test jevil jako pozitivní. Ani od žen s pravidelným menstruačním cyklem nebyly během této studie získány spolehlivé výsledky. Z těchto faktů Braat et al. (1998) vyvozují, že krystalizace slin nevypovídá nic o plodných dnech a mělo by se od ní, jako metody k detekci plodných dnů u lidí, ustoupit. Velmi podobné výsledky získal i Berardono et al. (1993), který zaznamenal krystalizaci u mužů, předpubertálních dívek, těhotných žen i žen po menopauze a který tuto metodu nepovažuje za vhodnou k určování doby ovulace. Kullander a Sonesson (1965) také pozorovali krystalizaci slin u těhotných a postmenopauzálních žen a dle jejich mínění byly její

tvary hrubší, než u žen cyklujících. Nenašli však rozdíly v krystalizaci slin u cyklujících žen mezi proliferační a sekreční fází cyklu. To, že krystalizace není vhodnou metodou k detekci ovulace, tvrdí i Guida et al. (1999), jelikož během jejich výzkumu byla úspěšnost detekce ovulace touto metodou pouze 36,8 %. Ovšem výsledky ukazují, že ve 21 % se maximální krystalizace objevila den před ovulací a v dalších 21 % den po ovulaci. I přesto, že v těchto případech nedošlo k řádné detekci ovulace, tak lze konstatovat, že plodné dny byly pomocí krystalizace detekovány s úspěšností 78,8 %. Guida et al. (1999) však upozorňují, že velké množství vzorků (58,7 %) bylo obtížné interpretovat a tyto vzorky nebyly do analýz ani zahrnuty. Problémy s interpretací však mohly být způsobeny tím, že vzorky byly vyhodnocovány samotnými ženami, které se studie účastnily.

K opačnému názoru dospěli Rotta et al. (1992), kteří uvádí, že krystalizaci je možné využít k detekci plodných dnů. Barbato et al. (1993), Guida et al. (1993) a Fehring a Gaska (1998) považují sledování krystalizace slin za vhodnou metodu detekce plodných dnů v případě, že je doplněna jinými doplňkovými metodami, např. měřením BTT (Biel Casals, 1968; Braat et al., 1998; Alagendran et al., 2010). Naopak Galati et al. (1994) vidí samotnou krystalizaci jako doplňkovou metodu k jiným metodám určování plodných dnů.

Dle Alagendran et al. (2007) lze krystalizaci slin využít k detekci ovulace a tento způsob testování by mohl mít klinický přínos, jen je třeba ho vhodně modifikovat. Později však autor uvádí, že se sice změny v krystalizaci slin, stejně jako změny BTT, částečně shodují s dobou ovulace, ale přeceňují počet plodných dnů (Alagendran et al., 2010). Podobný názor zastávají i Fehring a Gaska (1998), kteří tvrdí, že se krystalizace sice objevuje v době plodných dnů, ale neudává jejich přesný začátek a konec.

Galati et al. (1994) zmiňuje možnost využití krystalizace nejen k detekci plodných dnů ve smyslu nalezení vhodné doby k početí, ale i jako metodu monitoringu této periody ve chvíli, kdy se chce žena těhotenství vyhnout. Sledování krystalizace slin považuje hned po antikoncepčních pilulkách za druhou nejspolehlivější kontracepční metodu a její výhody vidí zejména v tom, že nemá žádné nežádoucí účinky. O příležitosti využít metodu i k antikoncepčním účelům se zmiňuje i Rotta et al. (1992). Bensinger (2003) však krystalizaci jako antikoncepční metodu vylučuje, považuje ji za nespolehlivou a uvádí, že by měly být zvoleny spolehlivější metody antikoncepce. S tímto názorem souhlasí i Fehring a Gaska (1998).

3.5.4 Pozitiva a negativa testování krystalizace slin

Mezi jasná pozitiva těchto testů patří jednoduchý odběr vzorků (Alagendran et al., 2010; Radzol et al., 2012) a snadná proveditelnost testu (Biel Casals, 1968; Barbato et al., 1993; Guida et al., 1993), takže si ho každá žena může udělat sama (Galati et al., 1994; Braat et al., 1998). Tento způsob testování je velice rychlý (Bensinger, 2003), bezpečný (Guida et al., 1993) a zároveň relativně levný (Braat et al., 1998), jelikož poměrně vyšší pořizovací cena mini-mikroskopu je vyvážena možností opakovaného používání po dobu cca 1 roku (životnost je omezena kapacitou baterie pro podsvícení mikroskopu) (Bensinger, 2003). Bensinger (2003) dále uvádí, že testování slin je hygieničtější, než k těmto účelům běžně používané testování moči, a lze ho provádět všude.

Negativem testu je možnost jeho využití pouze u zdravých žen s pravidelným cyklem (Bensinger, 2003). Při provádění testů je dále nutné brát v úvahu faktory, které mohou krystalizaci a tím pádem i výsledky testů ovlivnit (viz kapitola 3.7 Faktory ovlivňující krystalizaci slin).

3.6 Krystalizace slin jako neinvazivní metoda pro monitoring reprodukčního stavu u zvířat

Kromě lidí byla krystalizace slin studována u psů plemene bígl (Pardo-Carmona et al., 2010), skotu holštýnského plemene (Skálová, 2011; Skálová et al., 2012; Skalova et al., 2013) a velbloudů dvouhrbých (*Camelus bactrianus*) (Haberová, 2010; Kajzrová, 2011), a to pouze za účelem monitoringu reprodukčního stavu a vyhledávání vhodného období k páření. U všech těchto zvířat byla krystalizace slin potvrzena. Celkově však lze říci, že krystalizace slin u zvířat není příliš prozkoumaným tématem a je doporučován její další výzkum (Skálová, 2011; Skalova et al., 2013).

3.6.1 Odběry slin a provádění testů

U zvířat byly vzorky slin pro sledování krystalizace odebírány buď přímým otiskem jazyka zvířat na zmražená podložní sklíčka (Pardo-Carmona et al., 2010) nebo sběrem slin přímo z tlamy a nanesením na podložní sklíčka (Pardo-Carmona et al., 2010; Kajzrová, 2011; Skálová, 2011; Skalova et al., 2013). Následně byly vzorky ponechány na vzduchu při pokojové teplotě, aby zaschly, a pak byly okamžitě mikroskopovány pomocí běžných mikroskopů (Pardo-Carmona et al., 2010; Kajzrová, 2011; Skálová, 2011; Skalova et al., 2013). Během mikroskopování byly jednotlivými autory použity různé hodnoty zvětšení.

Pardo-Carmona et al. (2010) uvádí zvětšení ×100, Kajzrová (2011) ×300, Skálová (2011) a Skalova et al. (2013) ×400.

3.6.2 Hodnocení krystalizace slin

Pardo-Carmona et al. (2010) rozlišují pouze základní typy krystalizace: 0 – žádná, 1 – částečná krystalizace (částečné krystaly s malým i velkým rozšířením) nebo úplná jedlovitá krystalizace, 2 – úplná kapraďovitá krystalizace, která by měla značit plodné dny.

Kajzrová (2011) hodnotí krystalizaci velmi komplexním způsobem a bere v úvahu typ, zbobtnalost a rozpadlost krystalizace, kvalitu roztěru a pokrytí podložního sklíčka krystaly. Rozeznává 3 základní typy krystalizace – větvičkovitou, jedlovitou a kapraďovitou a jejich kombinace, dále atypickou, mřížkovanou a tečkovanou krystalizaci. Zbobtnalost krystalizace hodnotí 3 stupni od nezbobtnalé, přes mírně zbobtnalou, po velmi zbobtnalou. Z pohledu celistvosti (rozpadlosti) dělí krystalizaci na celistvou, mírně rozpadlou, a rozpadlou (perličkovitou). Kvalita roztěru byla Kajzrovou (2011) hodnocena jako dobrá, horší, nebo šlo o kontaminovaný vzorek. Pokrytí krystaly bylo klasifikováno dle 5bodové stupnice od velmi řídkého po krystalizaci vyskytující se po téměř celém roztěru.

Skálová (2011) rozlišuje stejné typy krystalizace jako Kajzrová (2011) vyjma mřížkované krystalizace. Dle tloušťky dělí krystaly do 3 kategorií – tenké, středně silné a silné. Stejně tak rozeznává 3 kategorie i u hodnocení celistvosti – krystaly celistvé, separované a poškozené. Hustota krystalů byla klasifikována 5 stupni od nejnižší po nejvyšší. Skálová (2011) bere v úvahu i kvalitu vzorku a vzorky dělí na ty s dobrou kvalitou, kontaminované vzorky a vzorky s příliš tenkou vrstvou slin.

3.6.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin

Pardo-Carmona et al. (2010) pozorovali změny v krystalizaci slin během říjového cyklu u 6 fen plemene bígl. Bylo zjištěno, že sliny fen krystalizovaly pouze během folikulární fáze cyklu (proestru a estru), zatímco během diestru se krystalizace slin u fen vůbec nevyskytovala.

Krystalizace slin fen se během folikulární fáze cyklu měnila postupně od žádné, přes typ 1 až po typ 2. Krystalizace se objevovala několik dní před a po optimální době pro páření a trvala celkem asi 7 dní. Úplná krystalizace se vyskytovala v souhře s maximální hladinou estrogenů, dva dny před LH vlnou a 4 dny před ovulací. Poté přetrvávala 2-3 dny a vymizela ve chvíli, kdy hladina progesteronu, který ji tlumí, dosáhla průměrně krevní hladiny 2,5 ng/ml. Pardo-Carmona et al. (2010) dále nalezli pozitivní korelaci mezi krystalizací slin

a vaginální cytologií, ale její hodnota byla velmi nízká. To by však mohlo být dáno malým množstvím testovaných zvířat.

Pardo-Carmona et al. (2010) nepovažují metodu sledování krystalizace slin k detekci plodných dnů u fen za adekvátní a dle nich lze tuto metodu používat pouze jako doplněk k jiným metodám detekce říje, např. k cytologii vaginálních buněk. K podobným závěrům dospělo mnoho autorů věnujících se stejné problematice u lidí (viz kapitola 3.5.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin).

Kajzrová (2011) a Skálová et al. (2012) pozorovali u jimi zkoumaných zvířat všechny typy krystalizace, které rozlišovali. Skálová et al. (2012) dále zaznamenali její změny během reprodukčního cyklu skotu. V době umělé inseminace se u krav objevovala větvičkovito-jedlovitá a větvičkovito-jedlovito-kapraďovitá krystalizace, které převažovaly až do 16. dne po inseminaci, nehledě na zabřeznutí. Od 16. do 20. dne od inseminace se nejčastěji vyskytovala krystalizace jedlovitá (Skálová, 2011). Mezi 20. a 29. dnem po inseminaci byl nalezen statisticky významný rozdíl v krystalizaci slin mezi březími a nebřezími samicemi. U březích krav převažovala krystalizace větvičkovitá či její úplná absence, zatímco u nebřezích se vyskytovaly složitější typy krystalizace. Skalova et al. (2013) uvádí, že pomocí krystalizace slin je možné detekovat časné fáze březosti u skotu, ale tuto metodu považují za nepříliš proveditelnou v praxi.

Kajzrová (2011) kromě 2 velbloudích samic testovala i 1 mládě a 1 samce, přičemž u obou také pozorovala krystalizaci slin. Vzhledem k malému množství testovaných zvířat Kajzrová (2011) ze svých výsledků nevyvozuje, zda je krystalizace slin u samic velbloudů dvouhrbých v nějakém vztahu s ovulací či reprodukčním cyklem jako takovým.

3.6.4 Pozitiva a negativa testování krystalizace slin

Testování krystalizace slin je neinvazivní, poměrně jednoduše interpretovatelná metoda, která nevystavuje zvířata zbytečnému stresu (Pardo-Carmona et al., 2010). Tuto levnou (Skalova et al., 2013) a jednouchou metodu lze provádět i u téměř neochočených zvířat a bez dohledu veterináře (Skálová, 2011; Skálová et al., 2012).

3.7 Faktory ovlivňující krystalizaci slin

Mezi faktory, které mohou ovlivňovat krystalizaci slin, byla u lidí studována různá onemocnění (Andonopoulos et al., 1992; Maragou et al., 1996; El-Miedany et al., 1999; Denisov et al., 2005; Denisov et al., 2006; Radzol et al., 2012), vliv inhibičních proteinů (Verdier, 1993), jídla, pití, kouření (Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger,

2003) a u žen ještě hormonální poruchy (Guida et al., 1993; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003), léčba klomifen citrátem (Pattanasuttinont et al., 2007), těhotenství či menopauza (Kullander a Sonesson, 1965).

U osob se Sjögrenovým syndromem byly pozorovány odlišné typy krystalizace, než u osob zdravých. El-Miedany et al. (1999) u zdravých jedinců popisují běžnou krystalizaci slin jako geometrickou. U nemocných osob se podle nich vyskytuje krystalizace podobná sobím parohům a má větší tloušťku. Krystalizaci ve tvaru sobích parohů zmiňují u pacientů se Sjögrenovým syndromem i Andonopoulos et al. (1992).

Ve slinách byly dále detekovány 4 typy inhibičních proteinů, které zamezují vzniku krystalizačních jader a růstu krystalů fosforečnanu vápenatého (Verdier, 1993), což potenciálně také může ovlivňovat krystalizaci slin.

Během studie Alagendran et al. (2010) zaměřené na biochemii lidských slin, která zahrnovala i krystalizaci, byly testované osoby požádány o zdržení se od kouření a konzumace alkoholu během studie. To však bylo pravděpodobně zejména z důvodu testování biochemických parametrů. El-Miedany et al. (1999) během svých pokusů rozlišují osoby, které byly a nebyly testovány nalačno. Nalačno testy provádí i Pattanasuttinont et al. (2007) a to proto, že veškeré látky přítomné jak v nápojích, tak v jídle mohou způsobit změnu poměru vody, solí a dalších komponentů slin (Guida et al., 1993). Galati et al. (1994) se domnívají, že u žen, které jedly hodinu před provedením testu, mohla tato skutečnost ovlivnit průběh krystalizace slin a vytvořit falešně negativní výsledky. Bensinger (2003) sice uvádí, že test je možné udělat kdykoli, ale doporučuje ho provádět ráno nalačno popřípadě 1-2 hodiny po požití jakéhokoli jídla či nápoje nebo kouření. Během pokusů, které prováděli Fehring a Gaska (1998) bylo požadováno, aby testované osoby nepily, nejedly a nekouřily celé 2 hodiny před odebíráním vzorků.

Pohlavní hormony, zejména estrogeny, mají s největší pravděpodobností na krystalizaci slin určitý vliv (Guida et al., 1993; Alagendran et al., 2007; Alagendran et al., 2010) a proto jsou hormonální poruchy související se změnami hladin těchto hormonů jedním z dalších faktorů. Obézní ženy mohou mít vyšší hladiny estrogenů způsobené jejich hromaděním v tukové tkáni, což by mohlo ovlivňovat výsledky testů. Stejně tak u žen s nepravidelným cyklem, u kterých mohou být tyto problémy způsobené hormonálními disbalancemi, by mohly mít tyto disbalance vliv na výsledky testů (Bensinger, 2003). S touto problematikou souvisí i užívání klomifen citrátu, který je využíván ke stimulaci cyklu u žen a způsobuje změny v krystalizaci slin. Ta pak zcela vůbec nesouvisí s průběhem ovulace, což by mohlo být dáno tím, že klomifen citrát má antiestrogenní vlastnosti (Pattanasuttinont

et al., 2007). Problematika změn krystalizace u těhotných žen a žen po menopauze byla vysvětlena v kapitole 3.5.3 Spolehlivost testů založených na krystalizaci slin.

Problematiku faktorů, které mohou ovlivňovat výsledky krystalizace slin u lidí, shrnují např. Rotta et al. (1992).

U zvířat nebyla problematika faktorů ovlivňujících krystalizaci slin a její vyhodnocování dosud příliš prozkoumána. Z faktorů byly testovány pouze barvení krystalů (Skálová et al., 2012), kvalita vzorku (Kajzrová, 2011), tloušťka nanesené vrstvy slin a doba skladování při pokojové teplotě (Skálová, 2011). Stejně jako u lidí je nutné brát v úvahu i možnou změnu poměru vody, solí a dalších komponentů slin a tím i jejich krystalizace po napojení či nakrmení zvířete. Z tohoto důvodu by neměla být zvířatům nabízena při odběru vzorků potrava. Někdy však, zejména u jen částečně ochočených zvířat, není jiná možnost a odběr slin je prováděn za současného podání odměny jako např. během experimentu Kajzrové (2011).

Skálová et al. (2012) testovali sledování krystalizace za pomoci barviva Giemsa, které mělo usnadnit nalezení krystalů. To se však ukázalo jako kontraproduktivní, jelikož se přednostně barvily nečistoty a krystaly byly méně viditelné (Skálová, 2011).

Během pokusů Skálové et al. (2012) bylo dále potvrzeno, že kvalita vzorku má vliv na množství vzniklých krystalů. Tento fakt se však během výzkumu Kajzrové (2011) nepotvrdil.

Dle Skálové (2011) má na krystalizaci vliv i tloušťka nanesené vrstvy slin, přičemž v silnější vrstvě je snazší nelézt krystaly. Doba skladování nemá podle autorky na kvalitu vzorků vliv a vzorky lze skladovat několik měsíců při pokojové teplotě. Skálová (2011) dále potvrzuje vztah mezi kvalitou vzorků a hustotou krystalů. Čím kvalitnější vzorek byl, tím byla krystalizace více rozšířená.

4 Materiál a metody

Práce byla vytvořena v souladu s Přesnými pokyny pro psaní diplomových prací na FAPPZ (FAPPZ, 2014a). Odborná literatura a další informační zdroje byly citovány dle Závazných pravidel tvoření citací a seznamů použité literatury pro FAPPZ, ČZU v Praze (FAPPZ, 2014b). Taxonomické názvy zvířat byly převzaty z databáze Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2015).

4.1 Literární rešerše

Literární rešerše vychází z vědeckých prací a článků nalezených převážně v databázi Web of Science a zabývajících se problematikou související s tématem této diplomové práce. Publikace byly vyhledávány dle následujících klíčových slov: orangutan (orangutan), sliny (saliva), krystalizace (crystallization, ferning), arborizace (arborization), detekce říje (oestrus detection), detekce březosti (pregnancy detection), ovulace (ovulation), faktor (factor) a dalších.

4.2 Zvířata

4.2.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

Sliny pro testování monitoringu cyklu a březosti pomocí jejich krystalizace byly odebírány od tří samic orangutana bornejského (*Pongo pygmaeus*) chovaných v zoologických zahradách Dvůr Králové (n = 1) a Ústí nad Labem (n = 1) v České republice a v zoologické zahradě Bojnice (n = 1) ve Slovenské republice.

Všechny samice byly od počátku výzkumu pohlavně dospělé, všechny již měly v minulosti mládě a všechny v době výzkumu o své posledně narozené mládě pečovaly. Detailní informace o samicích lze nalézt v Tabulce 1 a jejich fotografie v Příloze 1.

Tabulka 1: Detailní informace o samicích orangutana bornejského zahrnutých do výzkumu

ZOO	Jméno samice	Datum narození	Zdravotní stav	Kontakt se samcem
Bojnice	Nanga	29. 1. 1995	dobrý	Ano
Dvůr Králové	Žaneta	29. 6. 1976	dobrý	Ne
Ústí nad Labem	Ňuninka	1987[1]	dobrý	Ano

[1] Samice byla odchycena v přírodě jako mládě. Jde pouze o odhadovaný rok narození, ale dle Ing. Petry Padalíkové z ústecké zoo se samice narodila pravděpodobně dříve (Padalíková, 2014).

Každodenní základ krmné dávky samic byl velmi podobný ve všech zoo a skládal se zejména z ovoce a zeleniny. Dále byly samicím podávány doplňkové druhy krmiv, např. vejce, maso, mléčné výrobky a další, jejichž podávání se lišilo mezi jednotlivými zoo. Orientační krmné dávky samic jsou uvedeny v Příloze 2.

Management reprodukce se u jednotlivých zoo lišil. V zoologické zahradě Bojnice byli samec se samicí spojeni každý den pouze v dopoledních hodinách a během odpoledne a noci byli drženi odděleně. Samice pravidelně cyklovala a byla u ní pozorována menstruace, o které si personál zoo vedl záznamy. V době předpokládané říje byla samice držena spolu se samcem nepřetržitě. Samice v době výzkumu odchovávala své první mládě. V zoologické zahradě Dvůr Králové byla v průběhu výzkumu chována pouze samice s mládětem (její již šesté mládě) a tím pádem samice nebyla v kontaktu se žádným samcem. Vzhledem k vyššímu věku samice a vzhledem k tomu, že u ní nebyla pozorována menstruace, nebylo na počátku výzkumu jisté, zda samice pravidelně cykluje. V zoologické zahradě Ústí nad Labem byli samec se samicí spojeni denně od 7:00 do 16:00-17:00 dle ročního období. Na noc byli drženi odděleně. Tento režim byl neměnný. Přestože nebyla u samice nikdy pozorována menstruace, předpokládalo se, že pravidelně cykluje, jelikož samice v posledních letech pravidelně rodila (během výzkumu odchovávala své již čtvrté mládě).

Aktuální reprodukční stav samic v zoologických zahradách v Bojnicích a v Ústí nad Labem byl zjišťován pravidelným prováděním těhotenského testu GS Mamatest 10 (Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.) v intervalu jednoho měsíce, a to vždy provedením dvou testů, aby byl výsledek spolehlivý. Vzhledem k již déletrvajícímu vyřazení královédvorské samice z reprodukce, nebyla tato samice na počátku výzkumu březí a detekce březosti se u ní během výzkumu neprováděla.

U samice ze zoologické zahrady v Bojnicích byly dále využity záznamy chovatelů o její menstruaci a páření se samcem. Z pěti měsíců, ve kterých výzkum probíhal, byla menstruace pozorována třikrát a viditelné krvácení trvalo vždy 1-2 dny. První den, kdy bylo krvácení pozorováno, byl považován za první den cyklu. Z těchto záznamů bylo vypočteno, že menstruační cyklus samice trval průměrně 28 dní, což odpovídá průměrné délce ženského menstruačního cyklu (La Marca et al., 2006). Doba ovulace byla dle dostupných zdrojů zaměřených na lidskou reprodukci (Graham, 1981; Alagendran et al., 2010) odhadnuta na 13.-14. den cyklu. Vzhledem k tomu, že reprodukční stav v době odběru vzorků byl tímto způsobem určen pouze přibližně, byla zvolena delší časová perioda považovaná za plodné dny, která byla stanovena na 8.-19. den cyklu (Arévalo et al., 1999). Ostatní dny v rámci cyklu byly brány jako neplodné.

4.2.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

Vzorky slin pro testování faktorů, které mohou krystalizaci slin ovlivňovat, byly odebírány od jednoho samce a dvou samic velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) chovaných v zoologické zahradě v Praze v České republice.

Všichni jednici velblouda dvouhrbého byli na počátku výzkumu pohlavně dospělí a byli po celou dobu výzkumu drženi ve společném výběhu. Informace o jedincích uvádí Tabulka 2 a jejich fotografie lze nalézt v Příloze 1.

Všechna zvířata měla stejnou krmnou dávku skládající se ze sena *ad libitum*, zelené píce a doplňkově granulátu pro býložravce C a mrkve. Přístup k vodě měla *ad libitum*.

Tabulka 2: Detailní informace o velbloudech dvouhrbých zahrnutých do výzkumu

Pohlaví	Jméno	Datum narození
Samec	Jepe	20. 4. 2002
Samice	Andy	29. 1. 1993
Samice	Jolanda	9. 3. 1997

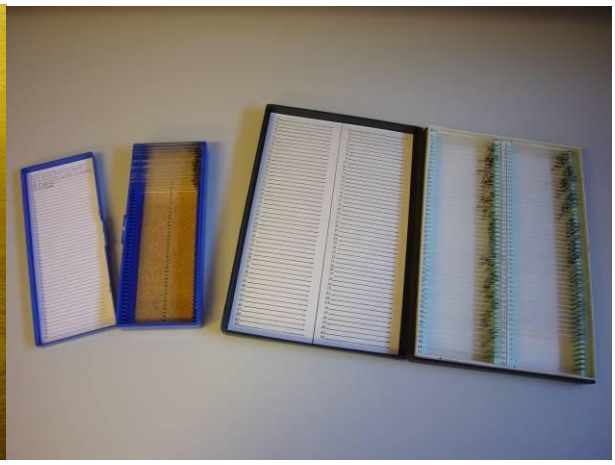
4.3 Odběr slin

4.3.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

Na počátku výzkumu bylo do každé zoo pro odběr slin dodáno: 100 nových čistých podložních sklíček (broušených či řezaných dle zamýšlené metody odběru slin), 100 plastových nápojových míchátek, 100 plastových lžiček, lihová fixa na popis podložních sklíček a 3 boxy pro skladování a transport sklíček (pro uložení 50 či 100 ks). Do zoologické zahrady v Bojnicích byla během výzkumu dodána jedna sada broušených podložních sklíček navíc. Odběrový materiál a boxy jsou zobrazeny na Obrázcích 2 a 3.

Odběr vzorků probíhal v následujících termínech: září-listopad ve Dvoře Králové, září-prosinec v Ústí nad Labem, září-leden v Bojnicích.

Ve Dvoře Králové byly vzorky slin odebírány ošetřovatelkami denně otiskem jazyka samice na broušená podložní sklíčka se zkosenými hranami či seškrábnutím slin pomocí sklíček z vnitřní strany pysků. V Bojnicích byly sliny odebírány ošetřovatelkami každý den pomocí lžičky z vnitřní strany pysků či jazyka. Pravidelný denní odběr vzorků se ukázal jako velmi obtížný u samice chované v Ústí nad Labem, u které byly vzorky slin odebírány nepravidelně zejména stěrem plivanců, výjimečně olíznutím podložního sklíčka, odběrem slin z tlamy pomocí plastových lžiček nebo vatových tyčinek.



Obrázek 2: Odběrový materiál (foto: autor) **Obrázek 3:** Boxy na podložní sklíčka

4.3.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

Vzorky slin od velbloudů dvouhrbých určených pro stanovování faktorů, které mohou ovlivnit krystalizaci slin, byly ošetřovatelem odebírány namátkově ve větším množství v termínech 16. 9. 2014, 29. 9. 2014 a 6. 10. 2014, a to vždy od samce a jedné samice.

Produkce slin byla u zvířat stimulována podáváním suchého chleba během odběru vzorků (Haberová et al., 2012). Sliny byly získávány odběrem přímo z tlamy zvířat, konkrétně z jazyka.

K odběru vzorků byly jednorázově používány čisté plastové lžíce a plastová míchátka na nápoje (viz Obrázek 2 v kapitole 4.3.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských). Odběr slin byl prováděn zadní částí držátka umělohmotných lžic, odkud byly sliny přesunuty pomocí plastového míchátka na nápoje do zkumavek (Haberová et al., 2012) s iniciálami jmen zvířat. Ve zkumavkách byly vzorky slin okamžitě převezeny do laboratoře Katedry chovu zvířat a potravinářství v tropech (KCHZPT) na České zemědělské univerzitě (ČZU) v Praze a ihned zpracovány.

4.4 Zpracovávání vzorků

4.4.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

Ihned po odběru, pokud nebyl odběr proveden olíznutím brouseného podložního sklíčka, byly sliny naneseny a rozetřeny na podložní sklíčko. Poté se podložní sklíčko se vzorkem slin označilo datem odběru vzorku, nechalo se zaschnout při pokojové teplotě po dobu přibližně 15 minut a bylo přesunuto do boxu pro uchovávání podložních sklíček. V těchto boxech pak byly vzorky v intervalu přibližně jednoho měsíce dováženy či zasílány poštou na ČZU v Praze k vyhodnocení v laboratořích KCHZPT, ČZU v Praze.

4.4.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

Vzorky slin byly nanášeny na řádně omytá, osušená a lihem ošetřená podložní sklíčka. Následně bylo každé podložní sklíčko označeno iniciálami zvířete, testovaným faktorem a číslem vzorku.

Byly vybrány následující faktory potenciálně ovlivňující krystalizaci slin: vrstva naneseného materiálu, teplota při zasychání vzorků slin a změna koncentrace slin (ředění vzorků a přídavek soli).

Jako kontrola sloužily vzorky slin nanesené na podložní sklíčka a zaschlé při pokojové teplotě ve středně tlusté vrstvě (nanesení slin plastovým nápojovým míchátkem pomocí dvou stěrů, každý vždy z jedné strany míchátka). Celkem bylo vytvořeno 10 kontrolních vzorků se slinami samice a 10 se slinami samce a to vždy z každého jednotlivého odběru slin.

Nejprve bylo testováno, zda vrstva naneseného materiálu může ovlivnit průběh krystalizace. Vzorky slin byly nanášeny na podložní sklíčka pomocí nápojových míchátek ve vrstvě slabší (velice tenký roztěr, pouze 1 stěr míchátka) a silnější (silný roztěr, 3 stěry míchátka), než byla středně tlustá vrstva u kontrolních vzorků. Vždy bylo provedeno 10 opakování pro každou z těchto dvou tlouštěk vrstvy a to se slinami jak samce, tak i samice (celkem 40 vzorků). Tyto vzorky byly po zaschnutí porovnány s kontrolními vzorky pocházejícími ze stejného odběru slin.

Druhým testovaným faktorem byla teplota při zasychání vzorků. Byly testovány vzorky se středně tlustou vrstvou slin zasychající při nižší a vyšší teplotě, než byla pokojová teplota (t = 21 °C). První část vzorků byla po nanesení slin přesunuta k zaschnutí do lednice (t = 4 °C) a druhá část se nechala zasychat na víku nádoby naplněné horkou vodou (t = 65 °C). Vždy bylo provedeno 10 opakování pro každou z těchto teplot a to se slinami jak samce, tak i samice (celkem 40 vzorků). Tyto vzorky byly po zaschnutí porovnány s kontrolními vzorky pocházejícími ze stejného odběru slin.

Následovaly změny koncentrace slin jako další možný faktor ovlivňující krystalizaci, přičemž jako první se provádělo ředění vzorků. Byl použit vzorek slin o objemu 1 ml, který byl pomocí stříkačky přenesen do Petriho misky. Poté byla ke vzorku přidána destilovaná voda o objemu 0,2 ml a obsah misky byl promíchán pomocí nápojového míchátka. Směs slin a destilované vody byla nanesena ve středně silné vrstvě na podložní sklíčka a ponechána zaschnout při pokojové teplotě. Bylo vytvořeno 10 vzorků se slinami samce a 10 se slinami samice (celkem 20 vzorků). Následně byly tyto vzorky porovnány s kontrolními vzorky pocházejícími ze stejného odběru slin.

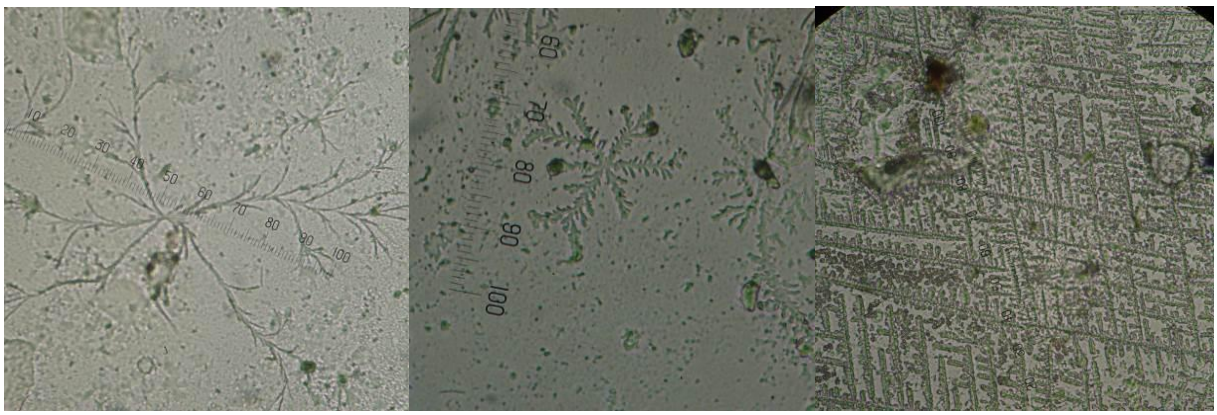
Dále byl testován přídavek soli do vzorku slin. Stejně jako u testování vlivu ředění byl použit vzorek slin o objemu 1 ml, který byl pomocí stříkačky vložen do Petriho misky. Poté byla ke vzorku přidána čistá kuchyňská sůl (NaCl) v množství 0,5 g a obsah misky byl promíchán pomocí nápojového míchátka. Poté byla směs slin a soli nanesena ve středně silné vrstvě na podložní sklíčka a ponechána zaschnout při pokojové teplotě. Bylo vytvořeno 10 vzorků se slinami samce a 10 se slinami samice (celkem 20 vzorků). Tyto vzorky byly dále porovnány s kontrolními vzorky pocházejícími ze stejného odběru slin.

4.5 Vyhodnocování vzorků

Vzorky orangutaních i velbloudích slin byly vyhodnocovány pomocí světelného mikroskopu se zvětšením ×400. Vyhodnocení každého vzorku bylo zaznamenáno slovním popisem a vyfotografováním vzorku pod mikroskopem.

Vyhledávání krystalů bylo prováděno systematicky po celém podložním sklíčku a krystalizace byla klasifikována lehce modifikovaným systému hodnocení, který byl v minulosti použit u skotu (Skálová, 2011; Skálová et al., 2012; Skalova et al., 2013) a velbloudů dvouhrbých (Haberová, 2010; Kajzrová, 2011). U všech vzorků byla hodnocena následující kritéria: typ krystalizace, celistvost, tloušťka a výskyt krystalů, kvalita vzorku.

Byly rozpoznávány 3 základní typy krystalizace – větvičkovitá, jedlovitá a kapraďovitá (viz Obrázek 4) a jejich kombinace (viz Tabulka 3). Celistvost krystalizace i tloušťka krystalů byly hodnoceny ve třech stupních. Celistvost krystalizace: 1 – celistvá, 2 – mírně rozpadlá, 3 – rozpadlá krystalizace. Tloušťka krystalů: 1 – tenké, 2 – střední, 3 – silné krystaly. Výskyt krystalů byl hodnocen následovně: 10 – velmi řídký, 20 – řídký, 30 – častý, 40 – velmi častý, 50 – výskyt téměř po celém roztěru. Kvalita vzorků byla hodnocena jako dobrá či špatná v případě kontaminace (např. potravou) nebo příliš tenké či silné vrstvy slin.

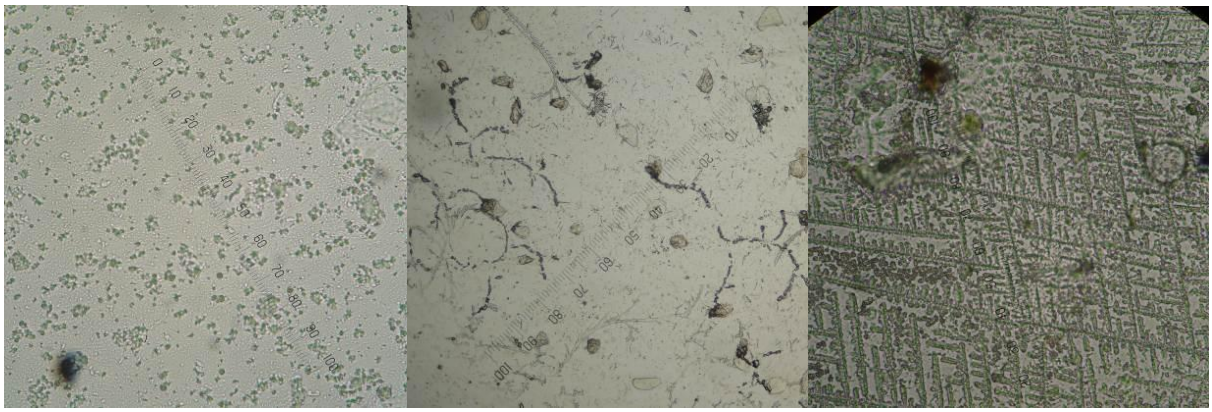


Obrázek 4: Větvičkovitá, jedlovitá a kapraďovitá krystalizace (foto: autor)

Tabulka 3: Typy krystalizace

Typ krystalizace	Zkratka
žádná	0
větvičkovitá	V
větvičkovito-jedlovitá	VJ
větvičkovito-kapraďovitá	VK
jedlovitá	J
jedlovito-kapraďovitá	JK
kapraďovitá	K
větvičkovito-jelovito-kapraďovitá	VJK

U vzorků od orangutaních samic bylo dále rozlišováno, zda jde o krystalizaci značící neplodné dny (N), tranzitní periodu (T) či plodné dny (P). Metodika vycházela ze studií krystalizace lidských slin (Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Pattanasuttinont et al., 2007) a slin fen (Pardo-Carmona et al., 2010). Obrázek 5 ukazuje krystalizaci slin během těchto období.



Obrázek 5: Krystalizace značící neplodné dny, tranzitní periodu a plodné dny (foto: autor)

4.6 Vyhodnocování výsledků

4.6.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

Výsledky krystalizace slin orangutaních samic měly být zpětně srovnávány s reprodukčním stavem zvířat v daném období (např. dle informací chovatelů, potvrzení březosti těhotenským testem, zaznamenání menstruace atd.).

Všechny těhotenské testy provedené během výzkumu na samicích v Ústí nad Labem a Bojnicích byly negativní. Jelikož ani jedna z testovaných samic během výzkumu nezabřezla, nebylo možné sledovat krystalizaci slin během březosti.

V zoologických zahradách Ústí nad Labem a Dvůr Králové nebyla u samic ani jednou pozorována menstruace či jiné příznaky cyklu. Jediná zoo, která poskytla informace o menstruačním cyklu samice, byla zoologická zahrada v Bojnicích.

4.6.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

Vliv faktorů byl vyhodnocen na základě změn, které nastaly u vzorků testujících dané faktory v porovnání s kontrolními vzorky.

4.7 Analýza dat

Veškeré informace získané z vyhodnocování vzorků byly uspořádány do tabulek, které byly následně zpracovány v programu Statistica CZ 12 program (StatSoft, Inc., 2013). Pro všechny výpočty byla stanovena hladina významnosti $\alpha = 0,05$ a všechny vypočtené hodnoty byly zokrouhleny na dvě desetinná místa. K analýzám dat byly využity tabulky četností, kontingenční tabulky a Pearsonův chí-kvadrát test.

5 Výsledky

5.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

Celkem bylo získáno a vyhodnoceno 246 vzorků slin orangutaních samic – 11 z Ústí nad Labem, 94 ze Dvora Králové a 141 z Bojnic. Z celkového množství vzorků byla krystalizace slin pozorována na 153 vzorcích (62,20 %) – 7 z Ústí nad Labem (63,64 % z původních 11), 57 ze Dvora Králové (60,64 %) a 89 z Bojnic (63,12 %). Vzhledem k tomu, že žádná ze samic během výzkumu nezabřezla, všechny vzorky pocházely od nebřezích samic.

Z 93 vzorků (37,80 % z celkového počtu vzorků), na kterých nebyla krystalizace slin pozorována, se na 64 vzorcích (68,82 % z 93 vzorků) nevyskytovaly žádné krystaly a u zbylých 29 vzorků (31,18 %) bylo vyhodnocení znemožněno silnou kontaminací či příliš silnou vrstvou slin, kterou nebylo možné zaostřit.

Mezi samicemi nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v typech krystalizace stupnice větvičkovitá-jedlovitá-kapraďovitá (VJK), celistvosti a hustotě pozorovaných krystalů ($p > 0,05$). Frekvence výskytu pozorovaných typů krystalizace ze stupnice VJK od všech samic společně zobrazuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Pro všechny samice společně hodnocený výskyt typů krystalizace VJK

Typ krystalizace	Četnost [počet vzorků]	Rel. četnost z celkového počtu 246 vzorků [%]
V	103	41,87
J	16	6,50
VK	12	4,88
VJ	10	4,07
K	8	3,25
JK	2	0,81
VJK	2	0,81

Pozorované krystaly byly ve většině případů buď celistvé (62 vzorků; 40,52 % z celkového počtu 153 vzorků, na kterých byla nalezena krystalizace) nebo mírně rozpadlé (56 vzorků; 36,60 %). Vzorků s rozpadlou krystalizací bylo méně (35 vzorků; 22,88 %).

U většiny vzorků (101 vzorků; 66,01 % z celkového počtu 153 vzorků, na kterých byla nalezena krystalizace) se krystaly vyskytovaly téměř po celém roztěru (hodnota hustoty 50). Na 23 vzorcích (15,03 %) byl výskyt krystalů hodnocen jako častý (hodnota 30)

a na 13 vzorcích (8,50 %) jako velmi častý (hodnota 40). Pouze 9 vzorků (5,88 %) vykazovalo řídký výskyt krystalů (hodnota 20) a 7 vzorků (4,58 %) jejich velmi řídký výskyt (hodnota 10).

Naopak statisticky významně se samice lišily v typech krystalizace přímo značících plodné/neplodné dny a tranzitní periodu (NTP; $\chi^2 = 12{,}65$; sv = 4; p = 0,01), v tloušťce pozorovaných krystalů ($\chi^2 = 42{,}65$; sv = 4; p < 0,01) a množství kontaminovaných vzorků ($\chi^2 = 45{,}30$; sv = 4; p < 0,01). Informace o výskytu typů krystalizace NTP u jednotlivých samic lze nalézt v Tabulce 5.

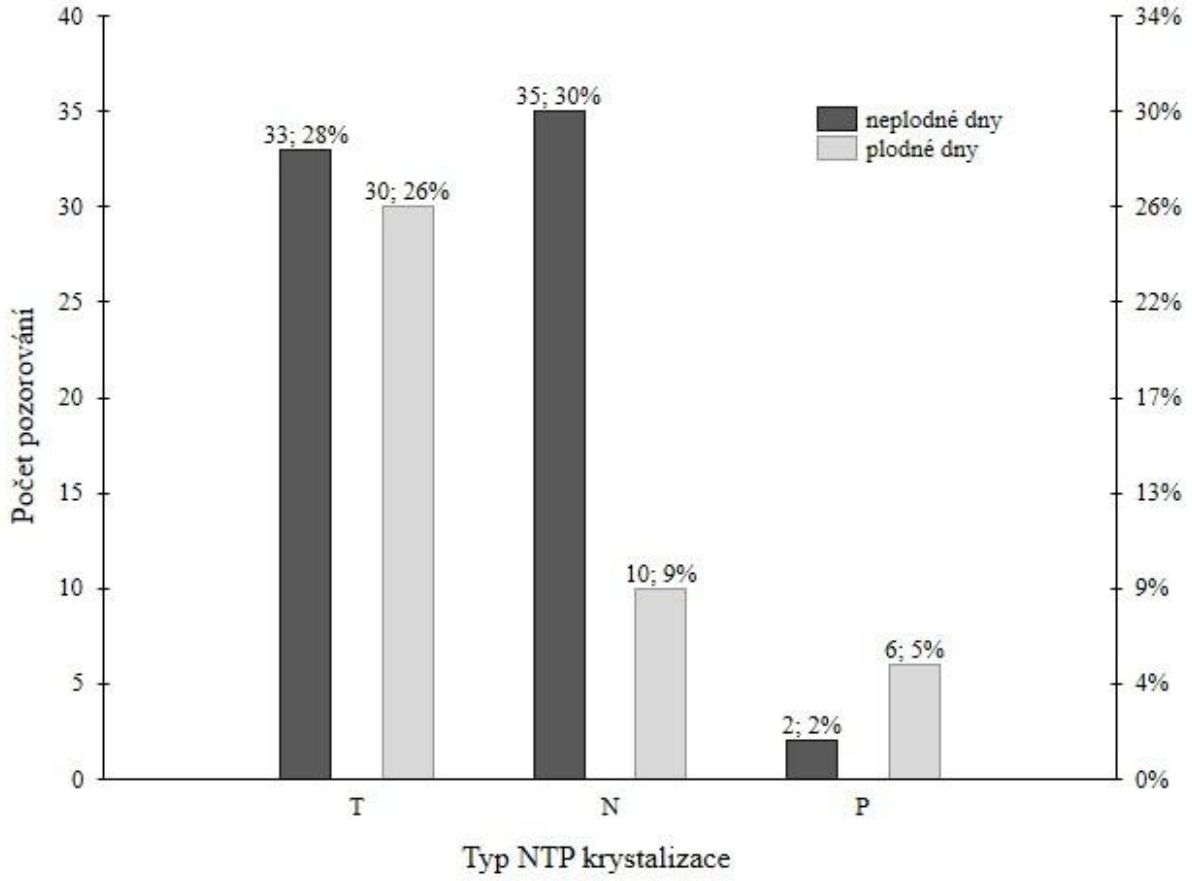
Tabulka 5: Výskyt typů NTP krystalizace u jednotlivých samic

Samice	Četnost	Typ krystalizace		
		N	T	P
Ňuninka	absolutní [počet vzorků]	10	1	0
	relativní z odebraných 11 vzorků [%]	90,91	9,09	0
Žaneta	absolutní [počet vzorků]	42	39	9
	relativní z odebraných 94 vzorků [%]	44,68	41,49	9,57
Nanga	absolutní [počet vzorků]	45	63	8
	relativní z odebraných 141 vzorků [%]	31,91	44,68	5,67

U samice Ňuninky byly pozorovány ve všech případech pouze tenké krystaly (7 vzorků; 100 % z celkem 7 vzorků této samice, na kterých byla nalezena krystalizace). Tenké (33 vzorků, 57,89 % z celkem 57) a středně silné (21 vzorků; 36,84 %) krystaly převažovaly u samice Žanety, u které se silné krystaly objevily pouze u 3 vzorků (5,26 %). U samice Nangy byla krystalizace většinou tvořena středně silnými krystaly (65 vzorků, 73,03 % z celkem 89) a zbytek vzorků vykazoval buď tenkou (13 vzorků; 14,61 %) anebo silnou krystalizaci (11 vzorků; 12,36 %).

Všech 11 vzorků získaných od samice Ňuninky mělo dobrou kvalitu. U samice Žanety byla většina vzorků dobré kvality (88 vzorků; 93,62 % z celkem 94), u 5 vzorků (5,32 %) byla nanesena příliš silná vrstva slin, která neumožňovala zaostření, a pouze 1 vzorek (1,06 %) vykazoval kontaminaci krmivem, která však neznemožnila vyhodnocení vzorku. 89 vzorků (63,12 % z celkem 141) od samice Nangy mělo dobrou kvalitu. U 51 vzorků Nangy (36,17 %) byla zaznamenána kontaminace krmivem, což u 24 z těchto vzorků znemožnilo vyhodnocení krystalizace, a pouze 1 vzorek (0,71 %) nebylo možné zaostřit kvůli příliš silné vrstvě slin.

U samice Nangy, u které bylo možné díky pozorování chovatelů odhadnout reprodukční stav v době odběru vzorků, byl zjišťován vztah plodných/neplodných dnů k oběma typům krystalizací. V typech krystalizace VJK nebyl mezi plodnými a neplodnými dny nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$), zatímco typy krystalizace NTP se statisticky významně lišily mezi plodnými a neplodnými dny ($\chi^2 = 11,56$; $sv = 2$; $p < 0,01$). Frekvence výskytu jednotlivých typů NTP krystalizace během plodných a neplodných dnů ukazuje Graf 1.



Graf 1: Výskyt jednotlivých typů NTP krystalizace během plodných a neplodných dnů (typy krystalizace: N – krystalizace značící neplodné dny, T – tranzitní periodu, P – plodné dny)

5.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

Celkem bylo vyhodnoceno 180 vzorků slin, 90 se slinami samce a 90 se slinami samic, které byly vytvořeny z 3 odběrů samčích a 3 odběrů samičích slin. Z toho byla krystalizace pozorována na 174 vzorcích (96,67 %), 89 vzorcích (98,89 %) od samce a 85 vzorcích (94,44 %) od samic.

Během analýz 60 kontrolních vzorků (30 samec, 30 samice) nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v typech pozorované krystalizace, tloušťce a celistvosti krystalů mezi pohlavími. Nejčastěji se vyskytovaly větvičkovitá (34 vzorků; 56,67 %) a větvičkovito-jedlovitá krystalizace (24 vzorků; 40,00 %). Pouze v jednom případě (1,67 %) byla u samce nalezena větvičkovito-kapraďovitá krystalizace a na dalším z jeho vzorků (1,67 %) nebyly nalezeny žádné krystaly.

Pozorované krystaly byly ve většině případů tenké (51 vzorků; 85,00 %). U 8 vzorků (13,33 %) byl pozorován střední stupeň tloušťky krystalů. Silné krystaly se nevyskytly vůbec. U více než poloviny vzorků (32 vzorků; 53,33 %) byly krystaly celistvé. Na 19 vzorcích (31,67 %) se vytvořily mírně rozpadlé krystaly a 8 vzorků (13,33 %) vykazovalo rozpadlou krystalizaci.

Významně se od sebe pohlaví lišila pouze v hustotě pozorovaných krystalů ($\chi^2 = 14{,}43$; sv = 4; $p < 0{,}01$), přičemž vyšší průměrnou hodnotu hustoty pozorovaných krystalů měly samice (41,67) oproti samci (35,17).

Všechny kontrolní vzorky samic měly dobrou kvalitu, zatímco u samce byla většina vzorků kontaminována (20 vzorků; 66,67 %).

5.2.1 Vrstva naneseného materiálu

Ani u jednoho pohlaví nebylo zjištěno, že by vrstva naneseného materiálu měla vliv na typ krystalizace či na tloušťku krystalů ($p > 0{,}05$).

U samčích slin měla vrstva naneseného materiálu významný vliv na celistvost krystalů ($\chi^2 = 21{,}72$; sv = 4; $p < 0{,}01$) na rozdíl od samičích ($p > 0{,}05$). Bylo zjištěno, že u samce tento rozdíl způsobila tenká vrstva ($\chi^2 = 12{,}38$; sv = 2; $p < 0{,}01$), která zapříčinila větší rozpad krystalů. U vzorků s tenkou vrstvou se průměrný stupeň celistvosti rovnal hodnotě 2,80 (rozpadlé krystaly). Vzorky se střední vrstvou vykazovaly průměr 1,78 (mírně rozpadlé krystaly). Krystaly na vzorcích se silnou vrstvou byly v průměru také mírně rozpadlé, ale průměrná hodnota celistvosti byla nižší – 1,50 (značící vyšší průměrný stupeň celistvosti).

Přesně naopak tomu bylo u hustoty krystalů, která nebyla u samce vrstvou materiálu ovlivněna ($p > 0{,}05$), zatímco u samice ano ($\chi^2 = 20{,}76$; sv = 8; $p < 0{,}01$). Tento rozdíl byl způsoben taktéž tenkou vrstvou nanesených slin ($\chi^2 = 18{,}00$; sv = 4; $p < 0{,}01$), díky které byla průměrná hustota krystalů nižší. U všech vzorků s tenkou vrstvou se vyskytovaly krystaly pouze velmi řídce (hodnota 10). Vzorky se střední vrstvou měly průměrnou hodnotu hustoty krystalů 28,00 (častý výskyt). Krystaly na vzorcích se silnou vrstvou vykazovaly v průměru velmi řídký výskyt krystalů, přičemž průměrná hodnota hustoty byla 14,29.

5.2.2 Teplota při zasychání vzorků slin

Změna teploty, při které byly sliny ponechávány zaschnout, měla významný vliv na typ vzniklé krystalizace jak u samce (χ^2 = 24,74; sv = 6; p < 0,01), tak samice (χ^2 = 19,45; sv = 4; p < 0,01). U samce byl rozdíl způsoben vyšší teplotou zaschnutí (χ^2 = 13,73; sv = 2; p < 0,01), zatímco u samice nižší teplotou zaschnutí (χ^2 = 10,04; sv = 2; p = 0,01). Bylo zjištěno, že u obou pohlaví na kontrolních vzorcích převažovala větvičkovito-jedlovitá krystalizace (♂ 90 % vzorků, ♀ 80 % vzorků). Vyšší teploty u samce způsobily změnu typu krystalizace na převážně jedlovitou (70 % vzorků). U samice došlo ke změně na převážně větvičkovitou (80 % vzorků).

Naopak změnou teploty nebyla ani u jednoho pohlaví ovlivněna tloušťka krystalů (p > 0,05).

U samice byl zjištěn významný vliv změny teploty na celistvost krystalů (χ^2 = 23,65; sv = 4; p < 0,01), přičemž odlišnou celistvost vykazovaly vzorky zasychající při nižší teplotě (χ^2 = 10,77; sv = 2; p < 0,01). Ta způsobila u všech vzorků zasychajících v lednici vznik celistvých krystalů stupně 1. U kontrolních vzorků byla průměrná hodnota celistvosti 1,8 a u vzorků zasychajících při vyšší teplotě byly krystaly ve všech případech mírně rozpadlé s hodnotou 2.

Přestože při souhrnném testování změny teploty jako faktoru nebyl u samce nalezen žádný statisticky významný vliv na celistvost krystalů (p > 0,05), při porovnání kontrolních vzorků se vzorky zaschlými při vyšší a nižší teplotě zvlášť bylo zjištěno, že nízké teploty ovlivnily celistvost krystalů i u samce (χ^2 = 6,67; sv = 2; p = 0,04). Stejně jako u samice byly krystaly všech vzorků zaschlých při nižší teplotě celistvé, hodnocené stupněm 1. Průměrná celistvost dosahovala u kontrolních vzorků hodnoty 1,6 a u vzorků zaschlých při vyšší teplotě 1,1.

Významný vliv měla změna teploty na množství (hustotu) vzniklých krystalů jak u samce (χ^2 = 30,00; sv = 2; p < 0,01), tak i samice (χ^2 = 29,71; sv = 6; p < 0,01). U samce byl rozdíl způsoben vyšší teplotou (χ^2 = 20,00; sv = 1; p < 0,01), která snížila hustotu pozorovatelných krystalů. Všechny kontrolní vzorky a vzorky zaschlé při nižší teplotě vykazovaly u samce stupeň hustoty 50 (výskyt téměř po celém roztěru), zatímco všechny vzorky zaschlé při vyšší teplotě vykazovaly stupeň hustoty 40 (velmi častý výskyt). U samice mělo na hustotu krystalů vliv jak zvýšení (χ^2 = 20,00; sv = 2; p < 0,01), tak snížení teploty (χ^2 = 13,14; sv = 3; p < 0,01) a obě změny způsobily její pokles. Krystaly pozorované na kontrolních vzorcích samice se vyskytovaly téměř po celém roztěru (průměrná hodnota

hustoty byla 47), zatímco u vzorků zaschlých při nižší a vyšší teplotě byl výskyt krystalů hodnocen jako častý (průměrné hodnoty hustoty 33 u nižší a 30 u vyšší teploty).

5.2.3 Změna koncentrace – ředění a přídavek soli

U samice změny koncentrace vzorků slin významně ovlivňovaly typ jejich krystalizace ($\chi^2 = 28{,}00$; sv = 4; $p < 0{,}01$). Vliv mělo jak ředění vzorků slin ($\chi^2 = 8{,}57$; sv = 1; $p < 0{,}01$), tak i přídavek soli ($\chi^2 = 12{,}00$; sv = 2; $p < 0{,}01$). Na kontrolních vzorcích samice převažovala větvičkovito-jedlovitá krystalizace (60 % vzorků). Ředění vzorků způsobilo změnu typu krystalizace na převážně větvičkovitou (100 % vzorků), zatímco přídavek soli zapříčinil vznik převážně kapraďovité krystalizace (60 % vzorků). U samce nedošlo v rámci testování tohoto faktoru k žádným změnám a všechny vzorky (kontrolní i vzorky testující faktor) vykazovaly stejný typ krystalizace (větvičkovitá).

Stejně tak tomu bylo u tloušťky krystalů, na kterou měla změna koncentrace slin významný vliv u samice ($\chi^2 = 14{,}66$; sv = 2; $p < 0{,}01$), zatímco u samce byla pozorována u všech vzorků stejná tloušťka (tenké krystaly). Ředění nemělo na změnu tloušťky samičích krystalů vliv ($p > 0{,}05$), ale změny způsoboval přídavek soli ($\chi^2 = 7{,}50$; sv = 1; $p = 0{,}01$), který u samice zapříčinil zvětšení tloušťky krystalů na středně silné (průměrná hodnota 1,7) oproti tenkým krystalům, které se vyskytovaly u kontrolních (hodnota 1,1) a ředěných vzorků (hodnota 1,0).

Změny koncentrace měly významný vliv na celistvost krystalů nejen u samice ($\chi^2 = 36{,}15$; sv = 4; $p < 0{,}01$), ale i samce ($\chi^2 = 25{,}71$; sv = 4; $p < 0{,}01$). Ředění mělo vliv na celistvost u obou pohlaví, samce ($\chi^2 = 16{,}36$; sv = 2; $p < 0{,}01$) i samice ($\chi^2 = 13{,}33$; sv = 2; $p < 0{,}01$), ale přídavek soli měl vliv již jen u samice ($\chi^2 = 10{,}77$; sv = 2; $p < 0{,}01$). U samce způsobilo ředění zhoršení celistvosti z původně celistvých krystalů, které se nacházely na všech kontrolních vzorcích, na rozpadlé krystaly naředěných vzorků (průměrná hodnota celistvosti 2,7). Po přídavku soli však u samce ke změně celistvosti nedošlo. U samice se sice průměrná hodnota celistvosti kontrolních vzorků (2,2) a vzorků testujících ředění (2,0) nijak zvlášť nelišily (mírně rozpadlé), ale pozorované hodnoty byly mezi skupinami značně rozdílné (ředěné vzorky všechny vykazovaly 2. stupeň celistvosti, kontrolní vzorky nabývaly všech jejích stupňů). Přídavek soli u samice zvýšil celistvost krystalů tak, že u všech vzorků dosáhla 1. stupně (celistvé krystaly).

Množství vzniklých krystalů (hustota) bylo změnami koncentrace slin významně ovlivněno u samce ($\chi^2 = 60{,}00$; sv = 6; $p < 0{,}01$) i samice ($\chi^2 = 30{,}00$; sv = 2; $p < 0{,}01$). Na hustotu krystalů ve vzorcích samce mělo vliv jak ředění ($\chi^2 = 20{,}00$; sv = 1; $p < 0{,}01$),

tak přídavek soli (χ^2 = 20,00; sv = 2; p < 0,01). Výskyt krystalů na kontrolních vzorcích byl u samce ve všech případech vyhodnocen jako častý (hodnota 30), u ředěných vzorků se krystaly vyskytovaly ve všech případech téměř po celém roztěru a u vzorků s přídavkem soli dosahovala průměrná hodnota hustoty 17 (řídký výskyt). Na hustotu krystalů u vzorků samice nemělo ředění žádný vliv, jelikož kontrolní i ředěné vzorky vykázaly ve všech případech výskyt téměř po celém roztěru. Naopak přídavek soli hustotu krystalů ve vzorcích samice významně ovlivnil (χ^2 = 20,00; sv = 1; p < 0,01), jelikož způsobil u všech vzorků snížení hustoty na hodnotu 20 (řídký výskyt).

6 Diskuze

6.1 Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských

V souladu se studiemi Kutsukake et al. (2009) a Behringer et al. (2014) byly samice orangutanů z počátku výzkumu postupně navykány na odběrový materiál a způsob odběrů slin, aby byla zachována neinvazivnost metody a zvířata nebyla zbytečně stresována. Samice nebylo nutné přivykat na nové osoby, jelikož odběry prováděly přímo jejich ošetřovatelky, což přispívalo minimalizaci stresu. Samice v zoologických zahradách ve Dvoře Králové a v Bojnicích se poměrně rychle přizpůsobily a bylo možné u nich provádět pravidelný denní odběr slin. V bojnické zoo byla samici po každém odběru poskytována odměna, což postupně posilovalo snahu zvířete na odběru spolupracovat. Naopak v ústecké zoo se nepodařilo samici žádným způsobem k odběrům slin přivyknout a odběry natrénovat. Možnost odběru slin od této samice byla omezena na sběr občasných plivanců, což zapříčinilo nízký počet vzorků z ústecké zoo.

Relativní zastoupení vzorků, na kterých bylo možné pozorovat krystalizaci, bylo velmi podobné u všech samic i přes značný nepoměr počtu vzorků získaných od jednotlivých zoo. Tento nepoměr mohl také způsobit rozdíly mezi samicemi v typech NTP krystalizace, tloušťce pozorovaných krystalů a množství kontaminovaných vzorků.

Nejčastěji se u orangutanů vyskytoval větvičkovitý typ VJK krystalizace (41,87 %), což se shoduje s výsledky získanými od velbloudů (Kajzrová, 2011) i skotu (Skálová, 2011; Skalova et al., 2013), u kterých se tento typ krystalizace vyskytoval v 37,31 % respektive 36,27 %. Kajzrová (2011) však uvádí, že větvičkovitá krystalizace byla u velbloudů nejčastěji se vyskytujícím typem krystalizace při hodnocení všech kategorií zvířat včetně samce i mláďat. U nebřezích samic měla dle Kajzrové (2011) větvičkovitá krystalizace výskyt 31 % a byla druhým nejčastěji pozorovaným typem po tečkované krystalizaci, která nebyla u orangutaních samic hodnocena. Výsledky Skálové (2011; 2013) pocházely od březích a nebřezích krav. Další typy VJK krystalizace se u orangutanů vyskytovaly v mnohem menším množství a četností se již ani vzdáleně neshodovaly s výsledky u jiných zvířat.

Na rozdíl od krystalů slin velbloudů, které byly z 50,94 % mírně rozpadlé (Kajzrová, 2011), největší podíl krystalů slin orangutaních samic vykazoval celistvost. Hustota krystalů slin byla u orangutanů oproti velbloudům významně vyšší, jelikož Kajzrová (2011) udává v průměru střední stupeň výskytu krystalů a u orangutanů byl pozorován u většiny vzorků (66,01 %) výskyt téměř po celém roztěru.

Přestože se v tloušťkách krystalů samice významně lišily, u všech samic se nejméně vyskytovaly silné krystaly.

Vzorky samice Ňuninky z ústecké zoo měly sice ve všech případech dobrou kvalitu, ovšem počet vzorků je pro vyvozování závěrů příliš nízký. U samice Ženety z královédvorské zoo dosahovala četnost vzorků s dobrou kvalitou 93,62 %, což odpovídá 95,52% výskytu kvalitních vzorků u velbloudů dvouhrbých (Kajzrová, 2011). Poměrně vysoká míra kontaminace (36,17 %) byla zaznamenána u samice Nangy z bojnické zoo, což mohlo být způsobeno odběrem vzorků v době krmení, krátce po něm či podáváním odměn během odběrů slin. U téměř poloviny těchto vzorků kontaminace zcela znemožnila jejich vyhodnocení. Je také možné, že u zbytku vzorků, u kterých k vyhodnocení došlo i přes jejich kontaminaci, mohla být krystalizace v důsledku kontaminace pozměněna (Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003). Z těchto důvodu lze doporučit odběr slin k výzkumu krystalizace mimo dobu krmení a zvířata odměňovat až po odběru vzorků.

U samice Nangy byl zjištěn rozdíl v NTP krystalizaci slin v době plodných a neplodných dnů, což potvrzuje, že se u orangutanů stejně jako u fen (Pardo-Carmona et al., 2010) či lidí (Barbato et al., 1993; Braat et al., 1998; Fehring a Gaska, 1998) krystalizace slin během cyklu mění. Tím byla potvrzena i první hypotéza diplomové práce.

Krystalizace značící neplodné dny se vyskytovala více během neplodných než plodných dnů, zatímco krystalizace značící plodné dny se vyskytovala více během plodných než neplodných dnů. To odpovídá výsledkům získaným u žen (Barbato et al., 1993; Galati et al., 1994; Fehring a Gaska, 1998; Pattanasuttinont et al., 2007) a poukazuje na možnost využití krystalizace slin k detekci plodných dnů i u orangutanů. Krystalizace značící tranzitní periodu se objevovala v téměř stejné míře jak v době plodných, tak v době neplodných dnů a to nejen v době přechodu mezi těmito periodami, ale během celého cyklu, což odpovídá závěrům Berardono et al. (1993) u lidí, že sliny krystalizují během celého cyklu.

Zjištěné výsledky však vychází ze vzorků jen jedné samice a reprodukční stav v době odběrů byl pouze odhadován. Také je důležité brát v úvahu možné kolísání délky cyklu samice (Graham, 1981) a eventuální částečnou odlišnost jejího cyklu od menstruačního cyklu žen. Lze doporučit další výzkum, který by tyto závěry potvrdil na více testovaných samicích. Během navazujícího výzkumu by mělo být využito objektivního způsobu monitorování cyklu, který by byl spolehlivý, ekonomický, snadno proveditelný, neinvazivní a zajistil by přehled o aktuální fázi cyklu i u samic, u kterých není možné pozorovat menstruaci. Tím je např. testování moči na přítomnost krve (Graham, 1981; Shumaker et al., 2008).

Přestože na počátku výzkumu nebylo jisté, zda samice Žaneta z královédvorské zoo pravidelně cykluje, ze získaných výsledků lze usuzovat, že ano, jelikož i u ní se objevily všechny typy NTP krystalizace a to s podobnou četností jako u samice Nangy. Pro podobné závěry u samice Ňuninky nebyl odebrán dostatek vzorků slin.

Vzhledem k nezabřeznutí ani jedné z orangutaních samic v době výzkumu nebylo možné odebrat žádné vzorky slin březích samic a porovnat je se vzorky samic nebřezích. Tím bylo znemožněno ověření platnosti druhé hypotézy diplomové práce, která předpokládala, že typy krystalizace slin u březích a nebřezích samic se budou lišit. V případě navazujícího výzkumu lze doporučit zahrnutí březích samic mezi testovaná zvířata a dále i samců a mláďat obou pohlaví, aby bylo možné zjistit, zda se krystalizace vyskytuje i u nich, stejně jako se vyskytuje u lidí u těhotných žen (Kullander a Sonesson, 1965; Biel Casals, 1968; Berardono et al., 1993), mužů (Berardono et al., 1993; Braat et al., 1998) a dětí (Biel Casals, 1968; Berardono et al., 1993).

6.2 Faktory ovlivňující krystalizaci slin u velbloudů dvouhrbých

S odběrem vzorků od velbloudů dvouhrbých z pražské zoologické zahrady nebyl problém, jelikož byly sliny odebírány již ověřenou metodou a od jedinců, kteří už byli na odběr slin přivyklí (Haberová, 2010; Kajzrová, 2011; Haberová et al., 2012).

Pokud je krystalizace slin skutečně ovlivňována hladinami pohlavních hormonů, konkrétně estrogenů, jak uvádí někteří autoři (Papanicolaou, 1946; Zondek, 1959; Guida et al., 1993; Alagendran et al., 2010), pak by stupeň krystalizace slin měl odpovídat výšce hladin těchto hormonů (Biel Casals, 1968). Vzhledem k vyšším koncentracím estrogenů u samic oproti samcům (Hussein et al., 2008; Pasha et al., 2012) lze tedy předpokládat, že samčí a samičí sliny budou krystalizovat odlišným způsobem.

Absence rozdílu mezi velbloudím samcem a velbloudími samicemi v typech krystalizace, tloušťce a celistvosti krystalů mohla být způsobena odběrem vzorků mimo hlavní sezonu rozmnožování (Marai et al., 2009), kdy je u obou pohlaví snížena produkce pohlavních hormonů a nedochází k výkyvům jejich hladin (Yagil a Etzion, 1980; Zia-ur-Rahman et al., 2007; Hussein et al., 2008). Nižší hladiny testosteronu u samců by v tomto období teoreticky mohly umožňovat větší projev estrogenních účinků estradiolu (Rateb et al., 2011) a způsobit vznik stejného typu krystalizace, jaká vznikala v této době u méně estrogenizovaných samic. Rozdíly v typech krystalizace mezi samcem a samicemi velbloudů však nezaznamenala ani Kajzrová (2011), která odběry slin prováděla během reprodukční sezóny. Tím pádem lze buď uvažovat o vyloučení vlivu estrogenů na krystalizaci slin,

což udělali např. Berardono et al. (1993) či Braat et al. (1998), nebo naopak zahrnout mezi hormony ovlivňující krystalizaci i testosteron, anebo usuzovat, že periodické změny v poklesech a nárůstech hladiny estradiolu u velbloudích samců, které časově odpovídají změnám u samic (Hussein et al., 2008; Pasha et al., 2012), jsou dostatečné pro vytvoření stejného typu krystalizace slin jako u samic.

Oproti Kajzrové (2011), která u velbloudů zaznamenala všechny typy VJK krystalizace včetně tečkované, byly během tohoto výzkumu u velbloudů nalezeny pouze krystaly typické pro větvičkovitou, větvičkovito-jedlovitou a větvičkovito-kapraďovitou krystalizaci. Kajzrová (2011) shodně zaznamenala větvičkovitou krystalizaci jako nejčastěji se vyskytující, ale jí pozorovaná četnost byla o 20 % nižší. Rozdíly byly pravděpodobně způsobeny odběrem menšího množství vzorků a posuzováním méně kategorií zvířat než u Kajzrové (2011), která testovala i krystalizaci slin mláďat.

Zatímco Kajzrová (2011) udává, že převažovaly vzorky s krystaly se střední tloušťkou a mírně rozpadlé, většina vzorků vyhodnocovaných během této diplomové práce vykazovala krystalizaci s tenkými a celistvými krystaly.

Rozdílnost v hustotě krystalů byla s největší pravděpodobností způsobena kontaminací vzorků samce. Vyšší průměrnou hodnotu hustoty měly samice, jejichž vzorky byly ve všech případech dobré kvality. Naopak u samce byla více než polovina vzorků kontaminována a kontaminace mohla způsobit zhoršení podmínek pro vznik krystalů. To odpovídá zjištění, Skálové (2011) a Skálové et al. (2012), že kvalita vzorku má vliv na množství vzniklých krystalů a čím vyšší je kvalita vzorku, tím jsou na něm krystaly více rozšířené.

6.2.1 Vrstva naneseného materiálu

V případě samce způsobilo nanesení tenké vrstvy slin menší celistvost vzniklých krystalů. Absence tohoto problému u samic byla pravděpodobně dána dobrou kvalitou odebraných vzorků slin, zatímco u samce kontaminace vzorků přispěla při nanesení tenčí vrstvy slin k rozpadu krystalů. Celkově bylo zjištěno, že čím větší vrstva samčích slin byla nanesena, tím větší byla celistvost krystalů.

U samice se projevil vliv vrstvy na hustotu vzniklých krystalů, přičemž tenká vrstva způsobila vznik jejich menšího počtu ve srovnání s kontrolními vzorky. Ke stejnému závěru dospěla i Skálová (2011). Nebylo však potvrzeno, že by se hustota krystalů s rostoucí vrstvou slin zvyšovala, jelikož u silné vrstvy průměrná hustota oproti kontrolním vzorkům naopak klesla. Zaznamenaný pokles však nemusel být dán reálným snížením počtu krystalů, ale mohl

být způsoben pouze zhoršením zaostřování vzorku, čímž došlo k vyhodnocení, které neodpovídalo reálnému počtu krystalů na podložním sklíčku.

Z výsledků vyplývá, že nejméně vhodné jsou pro posuzování krystalizace slin vzorky s tenkou vrstvou slin. Střední a silná vrstva jsou vhodnější a každá má své výhody a nevýhody.

6.2.2 Teplota při zasychání vzorků slin

Změna teploty zasychání vzorků ovlivnila typ vzniklé krystalizace u obou pohlaví. Při sloučení dosažených výsledků lze vysledovat, že čím vyšší byla teplota, při které vzorky zasychaly, tím složitěji větvená krystalizace vznikala. Zatímco při nižší než pokojové teplotě vznikala spíše větvičkovitá krystalizace, při vyšší než pokojové teplotě vznikala jedlovitá krystalizace. Ponechání vzorků v pokojové teplotě způsobilo vznik přechodného typu, větvičkovito-jedlovité krystalizace, která je tvořena jejich kombinací. Vyšší teplota pravděpodobně způsobila odpar vody a tím zvýšení koncentrace iontů, což zajistilo jejich optimální poměr potřebný ke vzniku složitější krystalizace (Kogbe et al., 1991; Guida et al., 1993). Zvýšení teploty by mohlo být také důvodem vzniku složitějšího větvení krystalů během plodných dnů žen, jelikož v době ovulace dochází k navýšení bazální tělesné teploty (Biel Casals, 1968; Braat et al., 1998; Alagendran et al., 2010).

Nižší teplota zasychání vzorků ovlivnila jak celistvost, tak hustotu krystalů, což mohlo být způsobeno ovlivněním vlastností vody obsažené ve slinách. Při nižší teplotě zasychání byly krystaly celistvější, ale vzniklo jich méně. Na hustotu krystalů měla nepříznivý vliv i vyšší teplota zasychání. Je možné, že s rostoucí teplotou byla míra složitosti krystalizace kompenzována menším množstvím vznikajících krystalů. Skálová (2011) však uvádí, že čím byla krystalizace složitější a rozvinutější, tím byla větší i její hustota.

Vzhledem k tomu, že výsledky ukazují, že teplota může výrazně pozměnit výsledný typ krystalizace, je důležité brát tento fakt v úvahu a vzorky ponechávat zaschnout při konstantní teplotě po dobu celého výzkumu.

6.2.3 Změna koncentrace – ředění a přídavek soli

Změna koncentrace slin měla u samice podobné následky jako změna teploty zasychání vzorků a ovlivňovala typ vzniklé krystalizace. Čím vyšší byla koncentrace slin, tím složitější typ krystalů vznikl. U kontrolních vzorků samice převažovala větvičkovito-jedlovitá krystalizace. Po naředění slin došlo ke vzniku větvičkovité krystalizace s jednodušším větvením, zatímco přídavek soli způsobil vznik silnější celistvější krystalizace

s vyšším stupněm složitosti, než se vyskytovala u kontrolních vzorků – kapraďovité. Přídavkem soli byly dodány nejdůležitější ionty pro vznik krystalizace (Zondek, 1959) a nejspíše došlo k optimalizaci poměru iontů (Kogbe et al., 1991; Guida et al., 1993), která umožnila vznik složitějšího typu krystalizace.

U samce však změna koncentrace slin neměla vliv ani na typ vzniklé krystalizace, ani na tloušťku jejích krystalů. To by mohlo být způsobeno odlišností hladin hormonů. Dle Guida et al. (1993) a Alagendran et al. (2010) estrogeny pozitivně ovlivňují vznik krystalizace tím, že optimalizují poměr vody a iontů. Alagendran et al. (2007) dále zmiňuje význam draslíku pro krystalizaci slin, jehož hladina se působením estrogenů také zvyšuje. Je možné, že u samce ke změnám v krystalizaci slin nedošlo, jelikož díky příliš nízkým hladinám estrogenů ve slinách u něj nebylo možné po dodání soli optimalizovat poměr iontů a tím zvýšit stupeň krystalizace slin. Kromě hormonů mohl být příčinou neměnnosti typu krystalizace u samce i akutní nedostatek glykosaminoglykanů, které Alagendran et al. (2010) zvažují jako hlavní komponenty silnější krystalizace.

Ředění vzorků mělo u samice na celistvost i hustotu krystalů jen nepatrný dopad, zatímco u samce způsobilo výrazné zhoršení celistvosti krystalů, což bylo způsobeno pravděpodobně snížením koncentrace iontů potřebných pro vznik krystalizace (Kogbe et al., 1991; Guida et al., 1993), které nemohlo být kompenzováno estrogeny (Guida et al., 1993; Alagendran et al., 2010). U samce však došlo k současnému navýšení hustoty krystalů. Hustota byla u obou pohlaví snížena přídavkem soli.

Během testování tohoto faktoru se ukázalo, že změny koncentrace slin jsou pro vyhodnocování samčích vzorků spíše nevhodné. Na samičí vzorky slin nemělo ředění výraznější dopad, ovšem přídavek soli u nich významně měnil krystalizaci slin a to spíše pozitivním způsobem. Vzhledem k těmto faktům, je možné využívat změn koncentrací samičích vzorků slin určených ke sledování krystalizace, zejména přídavkem soli, ale výhradně během výzkumů zaměřených na samice, přičemž by všechny vzorky měly být zpracovávány konstantním způsobem po celou dobu výzkumu. V případě testování krystalizace slin u obou pohlaví zároveň se pro vliv soli na krystalizaci slin u samic použití tohoto způsobu úpravy vzorků nedoporučuje.

Krmení či napájení zvířat bezprostředně před odběrem vzorků může způsobit uvedené změny v krystalizaci slin zvířat. Je tedy vhodné odběr slin provádět mimo hlavní dobu krmení. Doplňky jako je např. okus či minerální lizy mohou taktéž ovlivnit výsledky krystalizace a před odběrem vzorků by k nim měl být zvířatům zamezen přístup, a to nejméně

po dobu 1-2 hodin, což je stejná doba, kterou požadují autoři studií zaměřených na krystalizaci lidských slin (Fehring a Gaska, 1998; Bensinger, 2003).

U jen částečně ochočených zvířat, u kterých není možné provést odběr slin bez současného podání odměny, jako např. během tohoto výzkumu či experimentu Kajzrové (2011), je vzhledem k různému obsahu soli v jednotlivých typech krmiv nutné zachovávat stejný typ krmiva používaného jako odměna po celou dobu odběru vzorků.

6.2.4 Obecné zhodnocení vlivu testovaných faktorů

U žádného faktoru nedošlo k tomu, že by zcela vůbec neovlivnil vzniklou krystalizaci. Hlavním kritériem při hodnocení krystalizace slin je její typ. Ten byl ovlivněn pouze změnami teploty zasychání vzorků a změnami koncentrace slin. Tloušťka nanesené vrstvy slin na typ vzniklé krystalizace slin vliv neměla. Všechny faktory však ovlivňovaly doplňková kritéria hodnocení krystalizace, jako jsou tloušťka krystalů, jejich celistvost a hustota, což potvrzuje třetí hypotézu diplomové práce, že vrstva naneseného materiálu, teplota při zasychání vzorků slin a změna koncentrace slin (ředění a přídavek soli) budou významnými faktory, které mohou krystalizaci slin ovlivnit.

Na závěr je důležité upozornit na vysokou subjektivitu hodnocení krystalizace, kterou zdůrazňuje i Skálová (2011). Přestože bylo vyhodnocení vzorků, které byly autorkou označeny za sporné, konzultováno a typy krystalizace vyhodnocovány ve spolupráci s Ing. Ivou Skálovou, která má již s vyhodnocováním krystalizace slin bohaté zkušenosti, je důležité brát tento fakt v úvahu. Míru subjektivity v navazujících studiích lze snížit zařazením více hodnotitelů, z jejichž individuálních hodnocení se vyvodí jednotný závěr.

7 Závěr

Pravidelný neinvazivní odběr vzorků slin byl zvolenou metodikou úspěšně prováděn u dvou ze tří samic orangutana bornejského a všech tří jedinců velblouda dvouhrbého, kteří byli do studie zahrnuti.

V rámci výzkumu zaměřeného na monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin u orangutanů bornejských se podařilo zjistit, že se během výzkumu krystalizace slin plodných dnů lišila od krystalizace slin dnů neplodných. Tím byla potvrzena první hypotéza diplomové práce, která předpokládala, že krystalizace slin se bude během menstruačního cyklu orangutaních samic měnit. Zjištěné výsledky však vychází ze vzorků jen jedné samice, jelikož u dalších dvou testovaných samic nebylo možné v době výzkumu dostupnými nástroji zjistit fázi menstruačního cyklu, ve které se samice nacházely v době odběru vzorků. Navíc u samice, od které výsledky pocházejí, byla fáze menstruačního cyklu, ve které byly vzorky odebrány a jejíž znalost je pro zisk výsledků nezbytná, pouze odhadována. Z tohoto důvodu byl doporučen další výzkum, který by tyto závěry potvrdil na více testovaných samicích, přičemž během něho by mělo být využito objektivního, spolehlivého, ekonomického, snadno proveditelného a neinvazivního způsobu monitorování cyklu, který by zároveň zajistil přehled o aktuální fázi cyklu i u samic, u kterých není možné ji stanovit pouhým pozorováním menstruace.

Ověření druhé hypotézy, že typy krystalizace slin u březích a nebřezích samic orangutanů bornejských se budou lišit, bylo znemožněno nezabřeznutím ani jedné z orangutaních samic v době výzkumu. V případě navazujícího výzkumu bylo doporučeno rozšíření kategorií testovaných zvířat nejen o březí samice, ale i samce a mláďata obou pohlaví, aby bylo možné zjistit, zda se krystalizace vyskytuje i u nich.

Během testování faktorů, které mohou krystalizaci slin ovlivňovat, na velbloudech dvouhrbých došlo u všech testovaných faktorů k ovlivnění krystalizace. Hlavním kritériem při hodnocení krystalizace slin je její typ. Ten byl ovlivněn pouze změnami teploty zasychání vzorků a změnami koncentrace slin. Tloušťka nanesené vrstvy slin na typ vzniklé krystalizace slin vliv neměla. Všechny faktory však ovlivňovaly doplňková kritéria hodnocení krystalizace, jako jsou tloušťka krystalů, jejich celistvost a hustota, což potvrzuje třetí hypotézu diplomové práce, že vrstva naneseného materiálu, teplota při zasychání vzorků slin a změna koncentrace slin (ředění a přídavek soli) budou významnými faktory, které mohou krystalizaci slin ovlivnit.

8 Seznam literatury

Ahmadi MR, Kafi M, Ghodrat M. 2005. Crystallization and the number of neutrophils increase in the cervical mucus as parturition approaches in dairy cows. Comparative Clinical Pathology 14: 72–75.

Alagendran S, Archunan G, Achiraman SS. 2007. Prediction of Ovulation in Women through the Occurrence of Salivary Fern Prototype. The IUP Journal of Life Sciences IJLS10708.

Alagendran S, Archunan G, Prabhu SV, Orozco BE, Guzman RG. 2010. Biochemical evaluation in human saliva with special reference to ovulation detection. Indian Journal of Dental Research 21: 165-168.

Alliston CW, Patterson TB, Ulberg LC. 1958. Crystallization Patterns of Cervical Mucus as Related to Estrus in Beef Cattle. Journal of Animal Science 17: 322-325.

Andayani N, Mardiastuti A. 2009. Orangutan Indonesia: Conservation Strategies and Action Plan, 2007-2017. Indonesia: Ministry of Forestry and Departemen Kehutanan. 77s.

Anderson HB, Thompson ME, Knott CD, Perlins L. 2008. Fertility and mortality patterns of captive Bornean and Sumatran orangutans: Is there a species difference in life history? Journal of Human Evolution 54: 34-42.

Anderson HE, Reid B. 2006. Vicinal, Long Range, and Extremely Long Range Effects on Growth of Sodium Chloride Crystals From Aqueous Solutions Containing Protein. Queen Elizabeth II Research Institute for Mothers and Infants. The University of Sydney.

Andonopoulos AP, Tzanakakis GN, Christophidou M. 1992. Light microscopy of dried saliva in the evaluation of xerostomia of the sicca syndrome. A preliminary report. Journal of Rheumatology 19: 1390-1392.

Arévalo M, Sinai I, Jennings V. 1999. A fixed formula to define the fertile window of the menstrual cycle as the basis of a simple method of natural family planning. Contraception 60: 357–360.

Asa CS, Fischer F, Carrasco E, Puricelli C. 1994. Correlation between urinary pregnanediol glucuronide and basal body temperature in female orangutans, *Pongo pygmaeus*. American Journal of Primatology 34: 275–281.

Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK, Singh I. 2013. Early Pregnancy Diagnosis in Bovines: Current Status and Future Directions. The Scientific World Journal 2013: 10s.

Bamberg E, Möstl E, Patzl M, King GJ. 1991. Pregnancy Diagnosis by Enzyme Immunoassay of Estrogens in Feces from Nondomestic Species. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 22: 73-77.

Barbato M, Pandolfi A, Guida M. 1993. A new diagnostic aid for natural family planning. Advances in contraception 9: 335-340.

Bashaw MJ, Carter K, Tavassolie T. 2010. Using fecal samples to diagnose pregnancy in wild giraffe. Proceedings of the First Annual Conference of the International Society of Wildlife Endocrinologists. Cincinnati: International Society of Wildlife Endocrinologists, s8.

Behringer V, Borchers C, Deschner T, Möstl E, Selzer D, Hohmann G. 2013. Measurements of Salivary Alpha Amylase and Salivary Cortisol in Hominoid Primates Reveal Within-Species Consistency and Between-Species Differences. PLoS ONE 8: 1-8.

Behringer V, Clauß W, Hachenburger K, Kuchar A, Möstl E, Selzer D. 2009. Effect of giving birth on the cortisol level in a bonobo groups' (*Pan paniscus*) saliva. Primates 50: 190-193.

Behringer V, Deschner T, Möstl E, Selzer D, Hohmann G. 2012. Stress affects salivary alpha-Amylase activity in bonobos. Physiology & Behavior 105: 476-482.

Behringer V, Stevens JMG, Hohmann G, Möstl E, Selzer D, Deschner T. 2014. Testing the Effect of Medical Positive Reinforcement Training on Salivary Cortisol Levels in Bonobos andOrangutans. PLoS ONE 9: 1-9.

Bensinger H. 2003. Saliva Used to Test Ovulation. The Nurse Practitioner 28: 56.

Berardono B, Melani D, Ranaldi F, Giachetti E, Vanni P. 1993. Is the salivary "ferning" a reliable index of the fertile period? Acta Europaea fertilitatis 24: 61-65.

Betteridge J, Raeside JI. 1962. Investigation of cervical mucus as an indicator of ovarian activity in pigs. Journal of Reproduction and Fertility 3: 410-421.

Biel Casals JM. 1968. Descripcion de un nuevo test de ovulacion y analisis de sus resultados. Medicina Clinica 50: 385-392.

Boyers AI, Shenfield F, Valentine A. 1991. Semen and cervical mucus parameters and success in artificial insemination. Human Reproduction 6: 1108-1114.

Braat DD, Smeenk JM, Manger AP, Thomas CM, Veersema S, Merkus JM. 1998. Saliva test as ovulation predictor. The Lancet 352: 1283-1284.

Caldecott J, Miles L. 2005. World Atlas of Great Apes and their Conservation. Berkeley and Los Angeles: University of California Press. 468s.

Caro TM, Laurenson MK. 1994. Ecological and Genetic Factors in Conservation: A Cautionary Tale. Science 263: 485-486.

Choi SM, Lee YG, Seo MJ, Kang KK, Ahn BO, Yoo M. 2009. Effects of DA-6034 on aqueous tear fluid secretion and conjunctival goblet cell proliferation. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 25: 209-214.

Collins DC, Graham CE, Preedy JR. 1975. Identification and measurement of urinary estrone, estradiol-17 beta, estriol, pregnanediol and androsterone during the menstrual cycle of the orangutan. Endocrinology 96: 93-101.

Czekala NM, Benirschke K, McClure H, Lasley BL. 1983. Urinary estrogen excretion during pregnancy in the gorilla (*Gorilla gorilla*), orangutan (*Pongo pygmaeus*) and the human (*Homo sapiens*). Biology of Reproduction 28: 289-294.

Czekala NM, Callison L. 1996. Pregnancy Diagnosis in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) by Salivary Hormone Analysis. Zoo Biology 15: 37-44.

Czekala NM, Hodges JK, Lasley BL. 1981. Pregnancy monitoring in diverse primate species by estrogen and bioactive luteinizing hormone determinations in small volumes of urine. Journal of Medical Primatology 10: 1-15.

Dahl JF. 1988. External Genitalia. Schwartz JH editor. Orang-utan Biology. New York: Oxford University Press, s133-144.

Dahl JF. 1994. Size and Form of the Penis in Orangutans. Journal of Mammalogy 75: 1-9.

Dahl JF, Gould KG, Nadler RD. 1993. Testicle Size of Orangutans in Relation to Body Size. American Journal of Physical Anthropology 90: 229-236.

Dehnhard M, Crossier A, Kersey D, Schwarzenberger F, Walker S, Jewgenow K. 2010. Noninvasive pregnancy diagnosis in carnivores based on fecal prostaglandin F2α metabolites. Proceedings of the First Annual Conference of the International Society of Wildlife Endocrinologists. Cincinnati: International Society of Wildlife Endocrinologists, s9.

Denisov AB, Barer GM, Selifanova EI. 2005. Crystallization of components oral fluid in diabetics in case of absence of crystal structures. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 140: 100-101.

Denisov AB, Pushkar' DY, Denisov SA. 2006. Use of saliva crystallogenic properties for early diagnostics of prostate cancer. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 142: 242-245.

DiGiano L, Nagle CA, Quiroga S, Paul N, Farinati Z, Torres M, Mendizabal AF. 1992. Salivary progesterone for the assessment of the ovarian function in the capuchin monkey (*Cebus apella*). International Journal of Primatology 13: 113-123.

Dilrukshi HNN, Perera ANF. 2009. Evaluation of An ancient technique to diagnose the pregnancy in cattle using urine. Wayamba Journal of Animal Science 1: 6-8.

Dinger JE, Noiles EE. 1982. Vaginal and cervical mucus ferning as a method of detecting estrus in mares. Theriogenology 18: 633-642.

Dunson DB, Colombo B, Baird DD. 2002. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. Human Reproduction 17: 1399-1403.

El-Miedany Y, El-Hady SM, El-Baddin MA. 1999. Validity of the saliva ferning test for the diagnosis of dry mouth in Sjogren's syndrome. Revue du Rhumatisme 66: 73-78.

Elder CM, Menzel CR. 2001. Dissociation of Cortisol and Behavioral Indicators of Stress in an Orangutan (*Pongo pygmaeus*) During a Computerized Task. Primates 42: 345-357.

England GCW. 1992. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. Journal of Small Animal Practice 33: 577–582.

England GCW, Allen WE. 1989. Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. Journal of Reproduction and Fertility 86: 335-339.

FAPPZ. 2014a. Přesné pokyny pro psaní diplomových prací na FAPPZ. Česká zemědělská univerzita v Praze: Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, s11.

FAPPZ. 2014b. Závazná pravidla tvoření citací a seznamů použité literatury pro FAPPZ, ČZU v Praze. Česká zemědělská univerzita: Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, s13.

Fehring RJ, Gaska N. 1998. Evaluation of the Lady Free Biotester in determining the fertile period. Contraception 57: 325-328.

Galati G, Trapani E, Yacoub M, Toccaceli MR, Galati GM, Fiorelli C, Bandiera F, Paolillo A. 1994. A new test for human female ovulation diagnosis. International Review of Medical Sciences 6.

Galdikas BM, Ashbury A. 2013. Reproductive parameters of female orangutans (*Pongo pygmaeus wurmbii*) 1971–2011, a 40-year study at Tanjung Puting National Park, Central Kalimantan, Indonesia. Primates 54: 61-72.

Gargiulo GD, Shephard RW, Tapson J, McEwan AL, Bifulco P, Cesarelli M, Jin C, Al-Ani A, Wang N, van Schaik A. 2012. Pregnancy detection and monitoring in cattle via

combined foetus electrocardiogram and phonocardiogram signal processing. BMC Veterinary Research 8: 164.

Garshelis DL. 2006. On the allure of noninvasive genetic sampling — putting a face to the name. Ursus 17: 109-123.

Ghannam SA, Sorensen Jr AM. 1967. Early pregnancy diagnosis in the bovine. 50: 562-567.

Goossens B, Kapar MD, Kahar S, Ancrenaz M. 2011. First Sighting of Bornean Orangutan Twins in the wild. Asian Primates Journal 2: 10-12.

Graham C. 1981. Reproductive Biology of the Great Apes: Comparative and Biomedical Perspectives. New York: Academic Press.

Graham C. 1988. Reproductive Physiology. Schwartz JH editor. Orang-utan Biology. New York: Oxford University Press, s383.

Guida M, Barbato M, Bruno P, Lauro G, Lampariello C. 1993. Salivary ferning and the menstrual cycle in women Clinical and experimental obstetrics & gynecology 20: 48-54.

Guida M, Tommaselli GA, Palomba S, Pellicano M, Moccia G, Di Carlo C, Nappi C. 1999. Efficacy of methods for determining ovulation in a natural family planning program. Fertility and Sterility 72: 900-904.

Gupta HP, Saxena VB, Tripathi SS. 1990. A rapid method for evaluation of semen quality in bulls. Indian Journal of Animal Sciences 60: 329-330.

Gündogan M. 2009. Ovulatory Follicle Size and Mucus Ferning Level in Relation To Non-Return Rate During Artificial Insemination Time in Spontaneously Oestrus Signed Cows. Fýrat University Veterinary Journal of Health Sciences 23: 9-13.

Haberová T. 2010. A Preliminary Study of Saliva Crystallization in Bactrian Camels (*Camelus bactrianus*). Fernández Cusimani E, Havrland B editors. 4th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics: Sustainable Use of Natural Resources in Tropics and Subtropics. Praha: ČZU v Praze, s28.

Haberová T, Skálová I, Brandlová K, Kajzrová S, Lukešová D. 2012. The usage of disposable catering supplies for sampling of saliva and urine in even-toed ungulates. 6th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics. Praha, s51.

Harada H. 1989. Crystallization of uterocervical mucus in cattle and its significance in diagnosis and treatment of ovarian dysfunction. Journal of the Japan Veterinary Medical Association 42: 469-475.

Heersche Jr. G, Nebel RL. 1993. Measuring Efficiency and Accuracy of Detection of Estrus. Journal of Dairy Science 77: 2754–2761.

Heintz MR, Santymire RM, Parr LA, Lonsdorf EV. 2011. Validation of a Cortisol Enzyme Immunoassay and Characterization of SalivaryCortisol Circadian Rhythm in Chimpanzees (*Pan troglodytes*). American Journal of Primatology 73: 903-908.

Higham JP, Vitale AB, Rivera AM, Ayala JE, Maestripieri D. 2010. Measuring salivary analytes from free-ranging monkeys. Physiology & Behavior 101: 601-607.

Hodgen GD, Turner CK, Smith EE, Bush RM. 1977. Pregnancy diagnosis in the orangutan (*Pongo pygmaeus*) using the subhuman primate pregnancy test kit. Laboratory Animal Science 27: 99-101.

Hodges K, Brown J, Heistermann M. 2010. Endocrine Monitoring of Reproduction and Stress. Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C editors. Wild Mammals in Captivity:

Principles and Techniques for Zoo Management. Chicago: The University of Chicago Press, s447-468.

Hussein MM, El-Agawany AA, Amin K. 2008. Ovarian activity of she-camel (*Camelus dromedarius*) in relation to season, hormonal pattern, age and body condition scores. Beni-Suef Veterinary Medical Journal 18: 1-9.

Husson SJ, Wich SA, Marshall AJ, Dennis RD, Ancrenaz M, Brassey R, Gumal M, Hearn AJ, Meijaard E, Simorangkir T, Singleton I. 2008. Orangutan distribution, density, abundance and impacts of disturbance. Wich SA, Atmoko SSU, Setia TM, van Schaik CP editors. Orangutans: Geographic Variation in Behavioral Ecology and Conservation. Oxford: Oxford University Press, s77-96.

Inoue E, Inoue-Murayama M, Takenaka O, Nishida T. 2007. Wild chimpanzee infant urine and saliva sampled noninvasively usable for DNA analyses Primates 48: 156-159.

Ježková A, Stádník L, Vacek M, Louda F. 2008. Factors affecting the cervical mucus crystallization, the sperm survival in cervical mucus, and pregnancy rates of Holstein cows. Journal of Central European Agriculture 2: 377-384.

Joslin JO, Weissman WD, Johnson K, Forster M, Wasser S, Collins D. 1995. In vitro Fertilization of Bornean Orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) Gametes Followed by Embryo Transfer into a Surrogate Hybrid Orangutan (*Pongo pygmaeus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 26: 32-42.

Jung SY, Kim BS, Yoon YD. 2013. The Reproductive Patterns of Endangered Captive Orangutans by Analysing the Sex Hormones in Feces. Journal of veterinary clinics 30: 22-26.

Kajzrová S. 2011. Moderní technologie v chovu a reprodukci velbloudů. Bakalářská práce. ČZU v Praze, Institut tropů a subtropů. Praha, s51.

Kleiman DG, Thompson KV, Baer CK. 2010. Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management, Second Edition. Chicago: University of Chicago Press.

Knott CD, Thompson ME, Stumpf RM, McIntyre MH. 2010. Female reproductive strategies in orangutans, evidence for female choice and counterstrategies to infanticide in a species with frequent sexual coercion. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277: 105–113.

Knott CD, Thompson ME, Wich SA. 2009. The ecology of female reproduction in wild orangutans. Wich SA, Atmoko SSU, Setia TM, van Schaik CP editors. Orangutans: Geographic Variation in Behavioral Ecology and Conservation. Oxford: Oxford University Press, s171-189.

Kogbe O, Liotet S, Tiffany JM. 1991. Factors responsible for tear ferning. Cornea 10: 433-444.

Krishna Rao SV, Veena T. 2009. Comparison of seed germination test with urine barium chloride test and milk copper sulphate test for efficacy to detect pregnancy in cows. Indian Journal of Animal Research 43: 124-126.

Kuhar CW, Bettinger TL, Laudenslager ML. 2005. Salivary cortisol and behaviour in an all-male group of western lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*). Animal Welfare 14: 187-193.

Kullander S, Sonesson B. 1965. Studies on saliva in menstruating, pregnant and post-menopausal women. Acta Endocrinologica 48: 329–336.

Kutsukake N, Ikeda K, Honma S, Teramoto M, Mori Y, Haysaka I, Yamamoto R, Ishida T, Yoshikawa Y, Hasegawa T. 2009. Validation of Salivary Cortisol and Testosterone Assays in Chimpanzees by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry American Journal of Primatology 71: 696-706.

Kuze N, Dellatore D, Banes GL, Pratje P, Tajima T, Russon AE. 2012. Factors affecting reproduction in rehabilitant female orangutans: young age at first birth and short inter-birth interval. Primates 53: 181-192.

Kuze N, Sipangkui S, Malim TP, Bernard H, Ambu LN, Kohshima S. 2008. Reproductive parameters over a 37-year period of free-ranging female Borneo orangutans at Sepilok Orangutan Rehabilitation Centre. Primates 49: 126-134.

La Marca A, Stabile G, Carducci Artenisio A, Volpe A. 2006. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. Human Reproduction 21: 3103-3107.

Lalrintluanga K, Dutta M. 2009. Pregnancy Diagnosis in Swine from urine using Barium Chloride Test. Indian Journal of Animal Research 43: 114-116.

Lamb GC, Fricke PM. 2005. Ultrasound – Early Pregnancy Diagnosis and Fetal Sexing. Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Lexington, s268-277.

Lasley BL, Kirkpatrick JF. 1991. Monitoring Ovarian Function in Captive and Free-Ranging Wildlife by Means of Urinary and Fecal Steroids. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 22: 23-31.

Li J, Nasidze I, Quinque D, Li M, Horz H-P, André C, Garriga RM, Halbwax M, Fischer A, Stoneking M. 2013. The saliva microbiome of *Pan* and *Homo* BMC Microbiology 13: 204.

Maragou M, Vaikousis E, Ntre A, Koronis N, Georgiou P, Hatzidimitriou E, Sotsiou F, Dantis P. 1996. Tear and saliva ferning tests in Sjogren's syndrome (SS). Clinical Rheumatology 15: 125-132.

Marai IFM, Zeidan AEB, Abdel-Samee AM, Abizaid A, Fadiel A. 2009. Camels' Reproductive and Physiological Performance Traits as Affected by Environmental Conditions. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10: 129-149.

Markham RJ. 2005. Breeding orangutans at Perth Zoo: Twenty years of appropriate husbandry. Zoo Biology 9: 171–182.

Mau M, Südekum KH, Johann A, Sliwa A, Kaiser TM. 2010. Indication of higher salivary a-amylase expression in hamadryas baboons and geladas compared to chimpanzees and humans Journal of Medical Primatology 39: 187-190.

Mittermeier RA, Rylands AB, Schwitzer C, Taylor LA, Chiozza F, Williamson EA. 2012. Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2010–2012. Arlington: IUCN/SSC Primate Specialist Group, International Primatological Society, and Conservation International. 40s.

Mittermeier RA, Wallis J, Rylands AB, Ganzhorn JU, Oates JF, Williamson EA, Palacios E, Heymann EW, Kierulff MCM, Yongcheng L, Supriatna J, Roos C, Walker S, Cortés-Ortiz L, Schwitzer C. 2009. Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2008–2010. Arlington: IUCN/SSC Primate Specialist Group, International Primatological Society, and Conservation International. 84s.

Nadler RD. 1977. Sexual behavior of captive orangutans. Archives of Sexual Behavior 6: 457-475.

Nadler RD. 1995. Proximate and ultimate influences on the regulation of mating in the great apes. American Journal of Primatology 37: 93–102.

Nadler RD, Collins DC, Blank MS. 1984. Luteinizing hormone and gonadal steroid levels during the menstrual cycle of orangutans. Journal of Medical Primatology 13: 305-314.

Nielsen JL. 2008. Microcosmic Forests: An Investigation of Protein Crystallization Using ESEM, Contact AFM and Optical Microscopy. Lucerna: Honors Undergraduate Journal. The University of Missouri-Kansas City 3: 43-54.

Noonan JJ, Schultze AB, Ellington EF. 1975. Changes in bovine cervical and vaginal mucus during the estrous cycle and early pregnancy. Journal of Animal Science 41: 1084-1089.

Norn M. 1988. Quantitative tear ferning. Methodologic and experimental investigations. Acta Ophthalmologica 66: 201-205.

Ohtaki T, Moriyoshi M, Nakada K, Nakao T, Kawata K. 1997. Radioimmunoassay of saliva estrone sulfate in pregnant sows. Journal of Veterinary Medical Science 59: 759-763.

Padalíková P. 2014. Kubátová A editor. Ústí nad Labem: Zoologická zahrada Ústí nad Labem.

Papanicolaou GN. 1946. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. American Journal of Obstetrics & Gynecology 51: 316-328.

Pardo-Carmona B, Moyano MR, Fernández-Palacinos R, Pérez-Marín CC. 2010. Saliva crystallisation as a means of determining optimal mating time in bitches Journal of Small Animal Practice 51: 437-442.

Pasha RH, Qureshi AS, Khanum SA, Lodhi LA, Ullah N, Khamas W. 2012. Seasonal and ecological variations in the serum steroid hormone concentrations of one- humped male camel in Pakistan. Reproduction in Domestic Animals 47: 416–613.

Pattanasuttinont S, Sereepapong W, Suwajanakorn S. 2007. The salivary ferning test and ovulation in clomiphene citrate-stimulated cycles. The Medical Association of Thailand 90: 876-883.

Pensyl CD, Dillehay SM. 1998. The repeatability of tear mucus ferning grading. Optometry and Vision Science Journal 75: 600-604.

Peterson DL. 1984. Nasal mucus ferning patterns. Master thesis. University of Utah, College of Nursing, Utah, s51.

Pierce JR, Cope HB. 1955. Crystallization of Cervical Mucus in Early Pregnancy: Relation to abortion. Obstetrics & Gynecology 5: 815-818.

Puderbach S, Stolze HH. 1991. Tear ferning and other lacrimal tests in normal persons of different ages. International Ophthalmology 15: 391-395.

Radzol ARM, Lee KY, Mansor W. 2012. Crystalization Structure of Whole Saliva of Drop Coating Deposition Raman for Surface Enhanced Raman Spectroscopy Analysis (17^{th}-19^{th} December 2012). 2nd IEEE EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES 2012). Langkawi: Faculty of Electrical Engineering, Universiti Teknologi MARA, Shah Alam, s438-442.

Raeside JI, McDonald MF. 1959. Arborization of Cervical Mucus in the Ewe. Journal of Endocrinology 18: 350-358.

Rao Krishna SV, Veena T. 2009. Evaluation of seed germination test for early detection of pregnancy in cows. Indian Journal of Animal Research 43: 37-40.

Rateb SA, El-Hassanein EE, El-Koumy AG, El-Bahrawy KA, El-Ezz ZRA. 2011. Manipulation of Reproductive Hormones Disorder in Sub-Fertile Male Dromedary Camels Using Exogenous Gonadotropic-Releasing Hormone (GnRH). World Journal of Agricultural Sciences 7: 280.

Rayos AA, Almoro WJC, Valdez CA, Marcial Jr. DB. 2001. Early detection of successful insemination in dairy cattle by evaluation of their cervical mucus crystallization patterns. Philippine Journal of Veterinary Medicine 38: 92-97.

Rees PA. 2011. An Introduction to Zoo Biology and Management. Hoboken: Wiley-Blackwell.

Roland M. 1958. The Fern Test: A critical analysis. Obstetrics & Gynecology 11: 30-34.

Rolando M, Baldi F, Calabria G. 1988. Tear Mucus Crystallization in Children with Cystic Fibrosis. Ophthalmologica 197: 202-206.

Rotta L, Matěchová E, Cerný M, Pelák Z. 1992. Determination of the fertile period during the menstrual cycle in women by monitoring changes in crystallization of saliva with the PC2000 IMPCON minimicroscope. Česká gynekologie 57: 340-352.

Rydberg E. 1948. Observations on the Crystallization of the Cervical Mucus. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 28: 172–187.

Salmassi A, Schmutzler AG, Pungel F, Schubert M, Alkatout I, Mettler L. 2013. Ovulation Detection in Saliva, Is It Possible? Gynecologic and Obstetric Investigation 76: 171-176.

Salvatore CA. 1968. Cervical mucus crystallization in pregnancy. Obstetrics & Gynecology 32: 226-231.

Sathe SR. 2012. Evaluation of Salivary Progesterone Profiles as an Indicator of Reproductive Status in Equines. Veterinary Clinical Medicine. Urbana, Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign, s67.

Schwartz JH. 1988. Orang-utan Biology. New York: Oxford University Press. 383s.

Schwitzer C, Mittermeier RA, Rylands AB, Taylor LA, Chiozza F, Williamson EA, Wallis J, Clark FE. 2014. Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2012–2014. Arlington: IUCN SSC Primate Specialist Group, International Primatological Society, Conservation International, and Bristol Zoological Society.

Shanks JA, Acton WC. 1956. Crystallization of cervical mucus; a clinical study. Canadian Medical Association Journal 75: 482-485.

Shimizu K, Udono T, Tanaka C, Narushima E, Yoshihara M, Takeda M, Tanahashi A, van Elsackar L, Hayashi M, Takenaka O. 2003. Comparative study of urinary reproductive hormones in great apes. Primates 44: 183-190.

Shumaker RW, Wich SA, Perkins L. 2008. Reproductive life history traits of female orangutans (*Pongo* spp.). Interdisciplinary Topics in Gerontology 36: 147-161.

Simersky R, Swaczynova J, Morris DA, Franek M, Strnad M. 2007. Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk. Veterinarni Medicina 52: 19-28.

Singleton I, Wich S, Husson S, Stephens S, Utami Atmoko S, Leighton M, Rosen N, Traylor-Holzer K, Lacy R, Byers O. 2004. Orangutan Population and Habitat Viability

Assessment: Final Report. Apple Valley: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. 235s.

Skalova I, Fedorova T, Brandlova K. 2013. Saliva Crystallization in Cattle: New Possibility for Early Pregnancy Diagnosis? Agricultura tropica et subtropica.

Skálová I. 2011. Saliva crystallization in cattle. Diplomová práce. Czech University of Life Sciences Prague, Institute of tropics and subtropics, Prague, s66.

Skálová I, Haberová T, Brandlová K. 2012. Krystalizace slin u skotu. 6th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics: Sustainable Use of Natural Resources in Tropics and Subtropics. Praha: ČZU v Praze.

Smiley T, Spelman L, Lukasik-Braum M, Mukherjee J, Kaufman G, Akiyoshi DE, Cranfield M. 2010. Noninvasive Saliva Collection Techniques for Free-Ranging Mountain Gorillas and Captive Eastern Gorillas. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 41: 201-209.

Springer MS, Meredith RW, Gatesy J, Emerling CA, Park J, Rabosky DL, Stadler T, Steiner C, Ryder OA, Janečka JE, Fisher CA, Murphy WJ. 2012. Macroevolutionary Dynamics and Historical Biogeography of Primate Diversification Inferred from a Species Supermatrix. PLoS ONE 7: e49521.

Srinivasan S, Joyce E, Jones LW. 2007. Tear osmolality and ferning patterns in postmenopausal women. Optometry and Vision Science Journal 84: 588-592.

Suguna K, Mehrotra S, Agarwal SK, Hoque M, Singh SK, Shanker U, Sarath T. 2008. Early pregnancy diagnosis and embryonic and fetal development using real time B mode ultrasound in goats. Small Ruminant Research 80: 80–86.

Swaisgood RR, Zhou X, Zhang G, Lindburg DG, Zhang H. 2003. Application of Behavioral Knowledge to Conservation in the Giant Panda. International Journal of Comparative Psychology 16: 65-84.

Tsiligianni T, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. 2000. Relationship between certain physical properties of cervical mucus and fertility in cows. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 107: 28-31.

Tsiligianni T, Karagiannidis IA, Brikas P, Saratsis P. 2001. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or PGF2alpha) estrus. Theriogenology 55: 629-640.

Tsuimira L, Sasaki H, Maeta T. 1960. Studies on sterility of cows. IV. Crystallization pattern and cellular changes of nasal mucus during the sexual cycle. Journal of the Japan Veterinary Medical Association 13: 306-309.

Udry JR, Morris NM. 1968. Distribution of Coitus in the Menstrual Cycle. Nature 220: 593-596.

Vaikoussis E, Georgiou P, Nomicarios D. 1994. Tear mucus ferning in patients with Sjögren's syndrome. Documenta Ophthalmologica 87: 145-151.

Verdier JM. 1993. Macromolecular inhibitors of crystallization in saliva and bile. Nephrologie 14: 251-255.

Volkery J, Gottschalk J, Sobiraj A, Wittek T, Einspanier A. 2012. Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis. Veterinary Record 171: 195.

Volkery J, Wittek T, Sobiraj A, Gottschalk J, Einspanier A. 2010. Progesterone and pregnanediol-glucuronid concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas and their application in pregnancy diagnosis. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 123: 500-505.

Waits LP, Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. Journal of Wildlife Management 69: 1419-1433.

Wich SA, Atmoko SSU, Setia TM, van Schaik CP. 2009a. Orangutans: Geographic Variation in Behavioral Ecology and Conservation. Oxford: Oxford University Press. 408s.

Wich SA, Shumaker RW, Perkins L, de Vries H. 2009b. Captive and wild orangutan (*Pongo* sp.) survivorship: a comparison and the influence of management. American Journal of Primatology 71: 680–686.

Wich SA, Utami-Atmoko SS, Setia TM, Rijksen HD, Schürmann C, van Hooff JA, van Schaik CP. 2004. Life history of wild Sumatran orangutans (*Pongo abelii*) Journal of Human Evolution 47: 385-398.

Wilcox AJ, Dunson D, Baird DD. 2000. The timing of the "fertile window" in the menstrual cycle: day specific estimates from a prospective study. BMJ 321: 1259-1262.

Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. 1995. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. The New England Journal of Medicine 333: 1517-1521.

Wildman DE, Uddin M, Liu G, Grossman LI, Goodman M. 2003. Implications of natural selection in shaping 99.4% nonsynonymous DNA identity between humans and chimpanzees: Enlarging genus Homo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 7181–7188.

Willard ST, Sasser RG, Jaques JT, White DR, Neuendorff DA, Randel RD. 1998. Early pregnancy detection and the hormonal characterization of embryonic-fetal mortality in fallow deer (*Dama dama*). Theriogenology 49: 861-869.

Willis EL, Kersey DC, Durrant BS, Kouba AJ. 2010. The levels of active urinary ceruloplasmin as an indicator of pregnancy status in ursids. Proceedings of the First Annual Conference of the International Society of Wildlife Endocrinologists. Cincinnati: International Society of Wildlife Endocrinologists, s11.

Wobber V, Hare B, Lipson S, Wrangham R, Ellison P. 2013. Different ontogenetic patterns of testosterone production reflect divergent male reproductive strategies in chimpanzees and bonobos Physiology & Behavior 116-117: 44–53.

Wobber V, Hare B, Maboto J, Lipson S, Wrangham R, Ellison PT. 2010. Differential changes in steroid hormones before competition in bonobos and chimpanzees. PNAS 107: 12457-12462.

Wood P. 2009. Salivary steroid assays - research or routine? Annals of Clinical Biochemistry 46: 183-196.

Yagil R, Etzion Z. 1980. Hormonal and behavioural patterns in the male camel (*Camelus dromedarius*). Journals of Reproduction & Fertility 58: 61-65.

Zia-ur-Rahman, Ahmad N, Bukhari SA, Akhtar N, Haq IU. 2007. Serum hormonal, electrolytes and trace element profiles in the rutting and non-rutting one-humped male camel (*Camelus dromedarius*). Animal Reproduction Science 101: 172–178.

Zondek B. 1959. Arborization of Cervical and Nasal Mucus and Saliva. Obstetrics & Gynecology 13: 477-481.

Šimůnková K, Stárka L, Dušková M, Hill M, Vondra K. 2009. Hormony ve slinách: metodické předpoklady. Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie - Výživa 12: 149-153.

Elektronické zdroje:

Ancrenaz M, Marshall A, Goossens B, van Schaik C, Sugardjito J, Gumal M, Wich S. 2008. The IUCN Red List of Threatened Species: *Pongo pygmaeus* [online]. 2014 [cit. 2015-02-14]: Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/17975/0>.

BOSF. 2012. Borneo Orangutan Survival Foundation: About BOSF [online]. 2012 [cit. 2015-02-15]: Dostupné z: <http://orangutan.or.id/about-bosf/>.

ITIS. 2015. Integrated Taxonomic Information System [online]. 2015 [cit. 2015-02-14]: Dostupné z: <http://www.itis.gov>.

leozoo.org. 2014. Endangered Baby Orangutan Born through First-Ever Successful Assisted Reproduction [online]. 2014 [cit. 2015-04-02]: Dostupné z: <http://leozoo.org/endangered-baby-orangutan-born-through-first-ever-successful-assisted-reproduction/>.

Singleton I, Wich SA, Griffiths M. 2008. The IUCN Red List of Threatened Species: *Pongo abelii* [online]. 2014 [cit. 2015-02-14]: Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/39780/0>.

SOS. 2015. Sumatran Orangutan Society: About the SOS [online]. 2015 [cit. 2015-02-15]: Dostupné z: <http://www.orangutans-sos.org/about>.

WAZA. 2015. World Association of Zoos and Aquariums: The Orang-utan Conservation Genetics Project [online]. 2015 [cit. 2015-02-15]: Dostupné z: <http://www.waza.org/en/site/conservation/waza-conservation-projects/overview/the-orangutan-conservation-genetics-project>.

WWF. 2015a. World Wildlife Fund**:** Orangutan Overview [online]. 2015 [cit. 2015-02-15]: Dostupné z: <http://www.worldwildlife.org/species/orangutan>.

WWF. 2015b. World Wildlife Fund**:** Orangutans [online]. 2015 [cit. 2015-02-15]: Dostupné z: <http://wwf.panda.org/what_we_do/endangered_species/great_apes/orangutans/>.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

0	žádná krystalizace
BTT	bazální tělesná teplota
J	jedlovitá krystalizace
JK	jedlovito-kapraďovitá krystalizace
K	kapraďovitá krystalizace
N	krystalizace značící neplodné dny
NTP	krystalizace rozlišující neplodné/plodné dny a tranzitní periodu
P	krystalizace značící plodné dny
T	krystalizace značící tranzitní periodu
V	větvičkovitá krystalizace
VJ	větvičkovito-jedlovitá krystalizace
VK	větvičkovito-kapraďovitá krystalizace
VJK	větvičkovito-jelovito-kapraďovitá krystalizace

10 Samostatné přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Fotografie zvířat zahrnutých do výzkumu

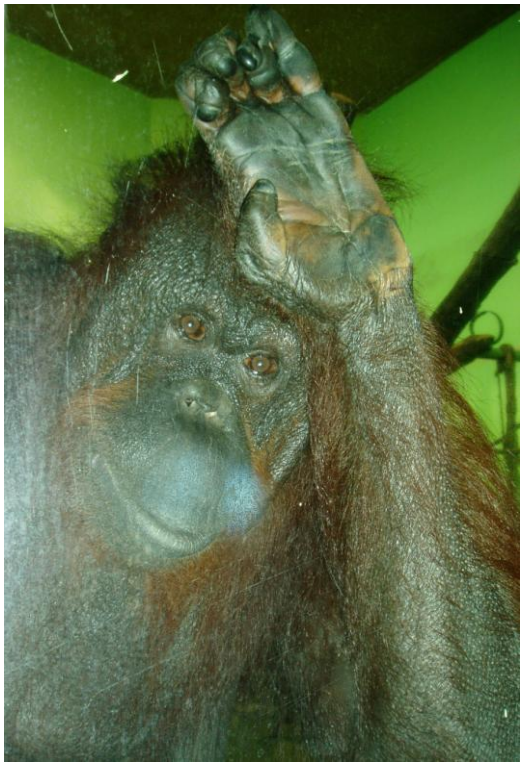
Příloha 2: Orientační krmné dávky samic orangutana bornejského zahrnutých do výzkumu

Příloha 1

Fotografie zvířat zahrnutých do výzkumu:

Samice Nanga ze zoologické zahrady v Bojnicích se svým prvním a dosud jediným mládětem (foto: autor)

Samice Žaneta ze zoologické zahrady ve Dvoře Králové se svým nejmladším mládětem (foto: autor)



Samice Ňuninka ze zoologické zahrady v Ústí nad Labem vyfocená samostatně, bez mláděte (foto: autor)

Samec Jepe a samice Andy – jednici velblouda dvouhrbého z pražské zoologické zahrady (foto: autor)

Příloha 2

Orientační krmné dávky samic orangutana bornejského zahrnutých do výzkumu:

Krmná dávka samice Nangy ze zoologické zahrady Bojnice:

- ovoce a vařená zelenina (např. mrkev, květák, špenát, kukuřice)
- doplňky: rybí filé, ovesné vločky, kuřecí maso, brambory, rýže, sója, tvaroh, vejce, vlašské ořechy, arašídy
- okus: javor, dub, vrba, lípa, třešeň, líska apod.

Zdroj: chovatelky ze zoologické zahrady Bojnice

Krmná dávka samice Žanety ze zoologické zahrady Dvůr Králové:

- 2 kg ovoce (1 kg sezónního a 1 kg jižního ovoce) a 2 kg zeleniny
- doplňky: vejce, maso, jogurty apod.

Zdroj: chovatelky ze zoologické zahrady Dvůr Králové

Krmná dávka samice Ňuninky ze zoologické zahrady Ústí nad Labem:

- podávána 4x denně po menších množstvích
- 7:00 snídaně: granule a vločky
- 10:15 svačina: kořenová zelenina, kedlubna, červená řepa, čínské zelí nebo hlávkový salát, omezeně pochoutky (oříšky, dýňová semínka, rozinky)
- 13:00 oběd: vařená zelenina (brokolice, lilek, cuketa, květák, pórek, jarní cibulka, žampióny, kořenová zelenina)
- občasně 2. svačina: slunečnice
- 15:30-16:00 večeře: zelenina (krom výše zmíněných druhů také papriky, rajčata, okurky) a ovoce (jablka, hrušky, blumy, ananas, pomeranče, hroznové víno, kiwi), voda se šťávou

Zdroj: chovatelky ze zoologické zahrady Ústí nad Labem