

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Využití monitoringu progesteronu v reprodukci fen

Bakalářská práce

Autor práce: Jolana Šlachtová

Obor studia: Kynologie

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití monitoringu progesteronu v reprodukci fen" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2017

Poděkování

Děkuji vedoucímu této bakalářské práce panu Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za poskytnuté cenné rady a konzultace, díky kterým jsem rozšířila své dosavadní znalosti a dále za odborné vedení této bakalářské práce. Touto cestou děkuji i své rodině za trpělivost a podporu, a Miroslavě Dobešové za příkladnou přátelskou spolupráci a podporu po celou dobu studia.

Využití monitoringu progesteronu v reprodukci feny

Souhrn

Pohlavní hormon progesteron hraje v reprodukčním cyklu feny stejně důležitou roli jako u jiných savců. Tento hormon lze snadno detekovat v periferní krvi a sledování jeho hladiny v průběhu říje z něj činí velmi dobrou pomůcku k určení neoptimálnějšího času nakrytí feny. K oblíbenosti a stále častějšímu využití této metody přispívá i fakt, že se rozšiřuje síť i technická vyspělost biochemických laboratoří jak v humánní, tak veterinární sféře. Pokročilý monitoring tohoto hormonu tak nejen v případě přirozeného krytí, ale také v situacích, kdy je nutné použít inseminaci, umožňuje dosahovat i v chovu psů vysoké úspěšnosti reprodukce.

Hladinu progesteronu v krvi feny je optimální začít sledovat v okamžiku, kdy cytologické vyšetření stěru vaginální sliznice prokáže blížící se ovulaci. Odběr krve se od toho okamžiku provádí optimálně ve 24 - 48 hodinových intervalech až do chvíle, kdy hladina progesteronu začne stoupat k hodnotám, jež jsou vhodné pro krytí feny. Je-li fena inseminována, je za vhodný okamžik pro první inseminaci považována hladina od 4 ng/ml v případě použití čerstvého semene, od 8 ng/ml semene chlazeného, a mezi 18 - 28 ng/ml při užití semene mraženého. Probíhá-li krytí klasickým způsobem, tedy přirozeně, je nejvhodnější s ním začít od 4,6 ng/ml. Ve všech případech je vhodné inseminaci či krytí opakovat alespoň 1x, a to s 24 – 48 hodinovým rozestupem.

Monitoring hladiny progesteronu lze úspěšně využívat i v závěru březosti, a to k detekci blížícího se porodu. Zvláště u problematických fen, u nichž nastaly komplikace v předchozích březostech či u plemen, o nichž je obecně známo, že lze očekávat porodní komplikace, je tato metoda vhodnou prevencí úhynu štěňat. Hladina progesteronu se prudce snižuje 8 - 12 hodin před porodem až na hodnoty 1 - 2 ng/ml. Je to příznak nastupujícího porodu a v indikovaných případech je právě toto čas, kdy by měl být proveden císařský řez.

Klíčová slova: reprodukce, fena, progesteron

Progesterone level monitoring in reproduction of bitch

Summary

The sex hormone progesterone plays the same important role in the reproductive cycle of female dogs as in other mammals. This hormone can be easily detected in peripheral blood and monitoring its level during the heat is a good way of determining the optimum time for mating. Also, contributing to the popularity and increasing use of this method is the fact that the network and the technically advanced level of biochemical laboratories are growing, both in human and veterinary sectors. The advanced monitoring of this hormone makes it possible to achieve very successful rates of reproduction in dog breeding, not only during heat but also in situations requiring the use of insemination.

The optimum time to start monitoring the progesterone level in blood of a bitch is when a cytological examination of a vaginal smear proves that ovulation is imminent. From this moment, a blood sample should be taken at intervals of 24 - 48 hours until progesterone levels begin to rise to values which are considered good for mating. In case bitch insemination, a level over 4 ng/ml is considered the right moment for inseminating with fresh semen, over 8 ng/ml for chilled semen, and between 18 and 28 ng/ml for frozen semen. If mating is done by the traditional way, i.e. natural, the best value is over 4.6 ng/ml. In all cases, insemination or mating should be repeated at least once within a 24 - 48 - hour interval.

Monitoring progesterone levels can also be successfully applied in late pregnancy to detect approaching birth. This method is especially good for preventing the death of puppies of bitches that have had complications in previous pregnancies or for breeds where birth complications can be expected. Progesterone levels sharply decrease from 8 to 12 hours before delivery to values from 1 to 2 ng/ml. This is a symptom of impending birth and in certain cases this is the time when a caesarian section should be performed.

Keywords: reproduktion, bitch, progesterone

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Anatomie pohlavních orgánů feny	3
3.1	Samičí pohlavní orgány.....	3
3.1.1	Vaječník.....	3
3.1.2	Vejcovod	3
3.1.3	Děloha	4
3.2	Samičí kopulační orgány	5
3.2.1	Pochva.....	5
3.2.2	Poševní předsíň.....	5
3.2.3	Vateň – ochod	6
4	Fyziologie reprodukce feny.....	7
4.1	Neurohumorální řízení říjového cyklu	8
4.1.1	Centrální nervový systém	9
4.1.2	Hypotalamus	10
4.1.3	Hypofýza	11
4.1.4	Gonády.....	12
4.1.5	Děloha	13
4.2	Fáze říjového cyklu	13
4.2.1	Proestrus.....	13
4.2.2	Estrus.....	14
4.2.3	Metestrus.....	15
4.2.4	Anestrus	15
4.3	Endokrinologické řízení říjového cyklu	16
5	Krytí feny.....	20
5.1	Stanovení optimální doby ke krytí feny.....	20
5.1.1	Krytí na základě změn v charakteru výtoku	20
5.1.2	Krytí na základě svolnosti k páření	21
5.1.3	Krytí na základě délky hárání	21
5.1.4	Metoda monitorování fáze estru z vaginální cytologie	22
5.1.5	Stanovení hladiny LH	24
5.1.6	Stanovení hladiny progesteronu v krvi	25
5.2	Vyšetřovací metody pro stanovení hladiny progesteronu.....	26
5.2.1	Vyšetřovací metoda RIA (Radio Immuno Assay)	26
5.2.2	Vyšetřovací metoda CLIA (Chemi Lumminiscence Immuno Assay).....	27
5.2.3	Vyšetřovací metoda FEIA (Fluorescence Enzyme Immuno Assay)	27

5.2.4	Vyšetřovací metoda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	27
5.3	Stanovení vhodné doby krytí dle hladiny progesteronu.....	29
5.3.1	Přirozené krytí feny	30
5.3.2	Inseminace feny	30
6	Březost feny.....	32
6.1	Hladina progesteronu v době březosti	32
6.2	Hormonální řízení porodu v návaznosti na progesteron	34
7	Závěr	36
8	Seznam literatury.....	37

1 Úvod

Podle posledních výzkumů pes člověka provází už více než 15 000 let. Šlechtěním, jehož výsledkem je v současnosti více než 400 plemen různých velikostí a rázů, byla maximalizována schopnost tohoto zvířete uspokojit všemožné požadavky člověka v širokém okruhu jeho činností, ať už jde o využití přirozených schopností psa pro soustavnou práci v lidský prospěch, zájmovou činnost pro radost, či prostě jen psa jako společníka, jež může doplnit spokojené, či nahradit neuspokojivé lidské vztahy, nebo svou přítomností zmírňovat následky různých životních etap v sociální oblasti.

Čím hodnotnější roli pes v životě člověka hraje, tím víc roste snaha kvalitní jedince snadno rozmnožovat. S postupujícím vědeckým poznáním i v této oblasti je možné uplatnit získané informace ke zlepšení chovatelské práce majitelů psů. V posledních letech doznala laboratorní diagnostika významného pokroku i ve veterinární medicíně. Rozšiřuje se taktéž nabídka a pokrytí humánních laboratorních pracovišť zabývajících se vyšetřením krve, jež jsou vybavena stále dokonalejšími diagnostickými přístroji a své služby na vysoké úrovni nabízejí i veterinárním lékařům. Laboratorní vyšetření se i díky tomu stalo běžnou součástí klinického vyšetření malých zvířat. Rozšíření služeb laboratoří a četnost vyšetření pak umožnila snížit ceny jednotlivých úkonů, a ty se tak staly cenově dostupnými pro širší chovatelskou základnu. V posledních letech se proto stanovení hladiny progesteronu v krvi feny stalo jednou z nejužívanějších metod pro určení nejvhodnějšího dne k jejímu úspěšnému nakrytí. Majitel feny je sice odkázán na spolupráci s veterinárním lékařem, který zajišťuje odborné úkony a současně poskytuje garanci, že informace získané klinickým vyšetřením budou vhodně využity v chovatelské práci, ale zároveň díky snadné dostupnosti podrobnějších informací o reprodukčním cyklu feny a také možnosti rychlé výměny zkušeností s ostatními chovateli, je sám kompetentnější zasáhnout do celého reprodukčního procesu způsobem, který ve výsledku vede k maximalizaci úspěšnosti chovatelské práce.

2 Cíl práce

Cílem práce je sepsat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o využití monitoringu progesteronu v reprodukci žen.

3 Anatomie pohlavních orgánů feny

3.1 Samičí pohlavní orgány

Samičí pohlavní orgány zahrnují ústrojí, která se podílejí jednak na produkci samičích pohlavních buněk a jednak vytváření vhodného prostředí pro oplození, a posléze vývoj oplozeného vajíčka. Tento vývoj končí za fyziologických podmínek porodem zralého, životaschopného plodu. Samičí pohlavní orgány zahrnují párové pohlavní žlázy – vaječníky, párové vejcovody spojené zpravidla s nepárovou dělohou, dále u domácích savců nepárovou pochvu, poševní předsíň a vateň (Marvan et Hampl, 2011).

3.1.1 Vaječník

Vaječník je párová pohlavní samičí žláza (Marvan et Hampl, 2011). Vaječníky u feny zůstávají uloženy vysoko dorsálně v bederní oblasti, kaudálně od ledvin (König et Liebich, 2002), v úrovni mezi 3. a 4. bederním obratlem (Černý, 2002). Vaječníky mají elipsovité, až ledvinovité tvar. Jejich délka je úměrná velikosti psa a dosahuje až 2 cm (Černý, 2002). Ve své poloze je upevněn na stropě břišní dutiny pomocí poměrně dlouhého vaječnickového okruží, které je kraniálním pokračováním širokého děložního vazů. Kromě toho je kratším vlastním vaječnickovým vazem připojen k děložnímu rohu. Převážná většina povrchu vaječnicku je volná a nazývá se ovulační plocha, protože na ní praskají dozrálé vaječnickové folikuly. Ke kraniálnímu konci vaječnicku se třásněmi připojuje vejcovod. Kaudálně obrácený konec je pak vlastním vazem připojený k děložnímu rohu (Marvan et Hampl, 2011).

Vaječník nemá žádný zvláštní vývod a vaječné buňky se z něj na povrch uvolňují prasknutím dozrálého folikulu – ovulací. K ovulaci dochází u většiny zvířat spontánně, tj. nezávisle na pohlavním aktu, zpravidla v období říje. Po ovulaci se na vaječnicku v místě prasklého folikulu začne vyvíjet zvláštní kompaktní útvar s významnou vnitřně sekretonickou funkcí – žluté tělísko. Pokud byla dozrálá vaječná buňka oplozena, žluté tělísko se silně zvětšuje a zůstává na vaječnicku téměř po celou dobu březosti (Marvan et Hampl, 2011).

3.1.2 Vejcovod

Vejcovod je párový orgán, který má úzké lumen a probíhá klikatě v peritoneálním závěsu. Ovariální konec vejcovodu má tvar nálevky, která přijímá ovulované vajíčko. Vnitřní povrch nálevky je tvořen slizničními řasami, které vybíhají na okraji nálevky v třásně. Některé z nich se připojují k povrchu vaječnicku (König et Liebich, 2002). Je to svalová a slizniční trubička, která má tloušťku stěbla a slouží k zachycení ovulované vaječné buňky

a k jejímu přemístění do dělohy. V jeho počátečním úseku se také dokončuje vývoj vajíčka a dochází zde k oplození. Druhý otvor vejcovodu se děložním ústím otevírá do děložního rohu (Marvan et Hampl, 2011). Otvor do dělohy leží u feny na papile, která představuje bariéru pro případné vzestupné infekce (König et Liebich, 2002). Ve stěně vejcovodu je přítomna kruhová i podélná hladká svalovina, která kontrakcemi pomáhá při transportu vajíček a spermií (Reece, 2011). Sliznice je kryta jednovrstevným až víceřadým cylindrickým epitelem, v němž se střídají buňky s řasinkami a také buňky žlázové. Působením hormonů, jež tvoří vaječníky, probíhají ve vejcovodu v průběhu pohlavního cyklu u samic opakované změny, jež označujeme jako vejcovodovo-ovariální cyklus (Marvan et Hampl, 2011).

3.1.3 Děloha

Děloha je silnostěnný dutý orgán, jenž slouží k vývoji nového jedince až do jeho narození (Marvan et Hampl, 2011). U psa je dvourohá, lze na ní rozlišit dva děložní rohy: jednotné děložní tělo a děložní krček. Děložní rohy šelem jsou silné jak tužka a zasahují daleko do břišní dutiny. Po rovném průběhu dosahují k vaječnickům, které se nacházejí kaudálně od ledvin (König et Liebich, 2002).

Děloha je zavěšena na dvou širokých děložních vazech, které odstupují na dorzolaterálních stěnách pánevní dutiny, na stropu břišní dutiny a na dělohu přecházejí po stranách jejího těla a děložních rohů. Tyto vazy jsou silné duplikatury pobřišnice. Mezi nimi se nachází řídké vazivo, snopce hladké svaloviny a dále cévy a nervy zásobující dělohu (Marvan et Hampl, 2011).

Děložní krček spojuje tělo dělohy s pochvou (Marvan et Hampl, 2011). Představuje silnostěnný, dobře hmatný uzávěr dělohy, jehož lumen se otevírá jenom při říji a během porodu. Začíná vnitřním ústím a končí vnějším ústím. Uzávěr krčku je tvořen slizničními řasami, které do sebe zapadají. U feny se zde nacházejí podélné řasy. Sekret cervikální sliznice tvoří hlenovou zátku, která přispívá k optimálnímu uzávěru cervikálního kanálu. Zevní ústí děložního krčku se otevírá nálevkovitě (König et Liebich, 2002).

Na skladbě děložní stěny se podílejí tři odlišné vrstvy. Její povrch tvoří tenká pobřišnice, která po obou stranách přechází v široké děložní vazy. Střední vrstvu tvoří hladká svalovina – vnitřní kruhovou a vnější, slabší podélnou vrstvu. Mezi nimi se nachází řídké vazivo s pleteněmi cév a nervů. Uvnitř dělohy se nachází sliznice šedorůžové až hnědočervené barvy a tvoří jemné podélné a příčné řasy. Ve sliznici jsou uloženy četné děložní žlázy. U feny povrch kryje jednovrstevný cylindrický epitel. Ten vystylá i děložní krček a vyměšuje zde hustý čirý hlen, který vyplňuje jako hlenová zátka krčkový

kanál. Při říjovém cyklu se tato zátka uvolňuje a vychází ze samice ven (Marvan et Hampl, 2011).

3.2 Samičí kopulační orgány

Pochva a vateň představují samičí kopulační orgány. Kromě vaječníků všechny zbývající orgány samičího pohlavního ústrojí reprezentují vývodné pohlavní cesty, neboť jimi sestupuje oplozené vajíčko do dělohy. Do posledního oddílu, poševní předsíně, ústí také močová trubice. K tvorbě samičích pohlavních buněk dochází ve vaječnicích, které řadíme mezi samičí pohlavní žlázy. Vaječník funguje navíc jako žláza s vnitřní sekrecí. Hormony produkované ve vaječnicích (estrogeny a gestageny) ovlivňují jednak činnost celého organismu a jednak rozvoj sekundárních pohlavních znaků (König et Liebich, 2002).

3.2.1 Pochva

Pochva je pářící orgán samice. Má charakter úzké svalové a slizniční trubice se značnou schopností rozšíření (Marvan et Hampl, 2011). U feny je obzvláště dlouhá (Černý, 2002). Sahá od zevního ústí děložního krčku až po vyústění močové trubice (König et Liebich, 2002).

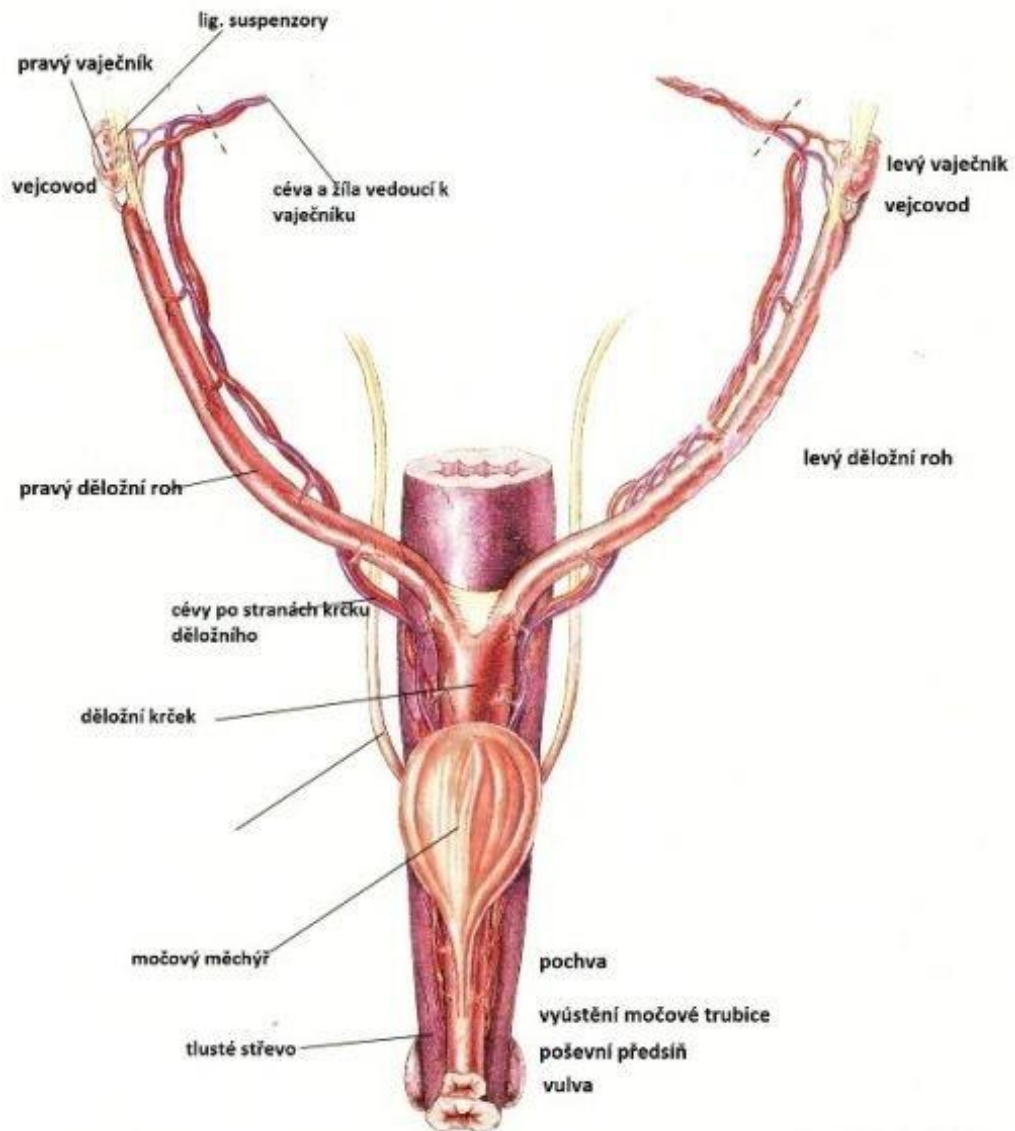
Stěna pochvy je pružná a skládá se z adventicie, hladké svaloviny a sliznice. Adventicie je vrstva řídkého vaziva, která připojuje pochvu k okolním orgánům. Narůžovělá sliznice pochvy je pomocí hojného vaziva připojena ke svalovině a je podélně zřasená. Neobsahuje žlázy a je pokryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem, jenž v průběhu cyklu podléhá významným periodickým změnám. Tyto změny se souborně označují jako poševní vaginální cyklus. V průběhu cyklu tak dochází k ztlustění epitelu v období před říjí, zrohovatění a odloupení povrchových vrstev v průběhu říje a infiltraci epitelu leukocyty, jež se navrácí do původního stavu v období po říjí (König et Liebich, 2002).

3.2.2 Poševní předsíň

Kaudálně pochva přechází v poševní předsíň, jež navenek přechází v stydkou štěrbinu. Poševní předsíň začíná u vyústění močové trubice, u feny vyčnívá otvor močové trubice kousek nad úroveň dna předsíně. Na rozdíl od pochvy, jež je čistě pohlavním orgánem, tak poševní předsíň slouží i jako vývodná močová cesta (Marvan et Hampl, 2011). Na dně ve dvou řadách ústí malé vestibulární žlázy, jež zvlhčují sliznici, což snižuje tření během kopulace (König et Liebich, 2002).

3.2.3 Vateň – ochod

Je vstup do pohlavních cest samice a spolu s poštváčkem tvoří zevní část samičí pohlavní soustavy. Nachází se ventrálně od řitě, od níž je oddělena pomocí krátké hráze. Vulva se skládá ze dvou stydkých pysků, které ze stran ohraničují svisle postavenou stydkou štěrbinu (Marvan et Hampl, 2011). U feny jsou stydké pysky valovitě zaobleny. (König et Liebich, 2002). Klitoris – poštváček je homologon samčího penisu. U feny je klitoris nápadně velký (Marvan et Hampl, 2011). Jamka je však překryta slizniční řasou, takže je někdy tento útvar mylně pokládán za kraniálněji uložené ústí močové trubice. Od penisu samců se klitoris odlišuje vedle menší velikosti především tím, že jím neprochází uretra (König et Liebich, 2002).



Obrázek 1: Pohlavní orgány feny

Zdroj: <http://enusa.wgz.cz/rubriky/gynekologie-pohlavni-aparat>

4 Fyziologie reprodukce feny

Od puberty až do zániku pohlavní činnosti dochází na pohlavních orgánech a v celém organismu samic k periodicky se opakujícím změnám, který souhrnně označujeme jako pohlavní – sexuální nebo reprodukční cyklus. Říjový cyklus je fyziologický děj, při němž se v celém organismu samice, především však v jejích pohlavních orgánech vytvářejí příznivé podmínky pro oplození vajíčka a pro vývoj zárodku a plodu (Elečko et Kudláč, 1987).

Termín pohlavního dospívání (puberty) určuje dosažení určitého stupně aktivity hypotalamo – hypofýzo – ovariální osy. Konkrétně jde o dostatečnou hypofyzární sekreci gonadotropinů a na vaječnicích dosažení určitého stupně vývoje ovariálních folikulů a jejich citlivosti k hypofyzárním gonadotropinům (Svoboda, 2001). Rytmus říjových cyklů, tj. jejich střídání a trvání je druhově dosti odlišný. Vlivem domestikace se říje u feny objevuje minimálně jednou, ale i vícekrát za rok. Podle cykličnosti pohlavní aktivity je fena považována za zvíře diestrické. Přibližně 70 % fen má říji dvakrát do roka. U velkých a primitivnějších plemen se říje častěji vyskytuje jednou, u plemen malých a přešlechtěných naopak tři až čtyřikrát (Doležel et Kudláč, 2000).

První říje přichází mezi 6.–24 měsíci, později nastupuje u velkých plemen. Nástup puberty je ovlivněn především somatickým vývojem, výživou a způsobem chovu (Doležel et Kudláč, 2000). V úvahu přichází i návaznost na dosažení 80 % tělesné váhy dospělého zvířete (England et Heimendahl, 2010). Časněji nastupuje puberta u malých plemen, u psů volně až polodivoce chovaných a u fen chovaných ve skupinách nebo v přítomnosti psů (Doležel et Kudláč, 2000).

Normální psí reprodukční cyklus je rozdělen do čtyř fází – proestrus, estrus, metestrus (diestrus) a anestrus, a má charakteristické behaviorální, fyziologické a endokrinologické vzory. Termín proestru a estru je souhrnně označován jako hárání. (Kudláč, 1997). Délka trvání jednotlivých fází je variabilní (Concannon, 2011). Interval mezi říjemi je normálně 4 - 13 měsíců, jeho průměrná délka je 7 měsíců (Nelson et Couto, 2014). Interval je ovlivněn plemenem, věkem (od 6 - 7 roku se interval postupně prodlužuje), březostí (může prodloužit následující interval), tělesnou kondicí (kachexie i obezita prodlužuje interval), zdravotním stavem zvířete a způsobem chovu – přítomnost psa či říjící se feny zkracuje interval, vliv má i sociální postavení ve smečce atd. (Doležel et Kudláč, 2000).

Termín nástupu vývoje ovulačních folikulů (folikulární fáze) na rozdíl od většiny domácích zvířat nevykazuje vztah k luteální fázi (luteolýze) ani k ročnímu období. Příčiny znovuoobjevení folikulogeneze po několikaměsíčním anestru u fen nejsou dosud známé.

Příbuzná psovitá šelma – vlk, je monoestrickým zvířetem s výrazným přesahem k sezónnosti, způsobené fotoperiodou. I když feny vykazují sporadický vztah ke změnám fotoperiody vyšším zastoupením hárajících fen na jaře a na podzim, nelze tento vztah považovat za limitující. Fena pravděpodobně vlivem domestikace a omezením kontaktu a závislosti na zevním prostředí částečně ztratila tento vztah a její cyklická pohlavní aktivita zůstala jako přechodná forma mezi zvířaty monoestrickými a polyestrickými (Doležel et Kudláč, 2000).

Postreprodukční fáze je charakterizována zánikem pohlavní aktivity. Folikuly postupně ztrácejí schopnost dozrát a ovulovat, postupně zaniká i vývoj atrálních folikulů. Ztráta plodnosti a přechod do postreprodukční periody probíhá vesměs ve stáří 9 - 13 let (Doležel et Kudláč, 2000).

4.1 Neurohumorální řízení říjového cyklu

U všech domácích zvířat je primární kontrola reprodukčních funkcí podřízena vzájemnému působení vnitřního prostředí organismu a mozku – hypotalamu a hypofýzy. Hypotalamo – hypofyzárně – ovariální systém tvoří uzavřený okruh, který na jednotlivých úrovních svými sekrety zajišťuje neustálou vzájemnou informovanost a rovnováhu. Principem této samoregulace je mechanismus zpětných vazeb, jehož podstata spočívá v tom, že hormony v rámci posloupného uspořádání níže položené ovlivňují prostřednictvím krevní cesty orgány výše položené, a to buď tlumivě, nebo povzbudivě. Takto funguje systém zpětných vazeb pozitivních nebo negativních ve smyslu stimulace nebo naopak inhibice. Konkrétně si lze představit, že nízká hladina konkrétního hormonu stimuluje, a naopak vysoká hladina hormonu inhibuje činnost orgánu nadřazeného a tím i produkci dalších hormonů (Elečko et Kudláč, 1987).

Pohlavní funkce, jakož i celý proces rozmnožování patří mezi velmi složité biologické děje, které jsou jak výsledkem činnosti specializovaných orgánů – pohlavního ústrojí, tak i řízení prostřednictvím extragenitálních struktur hypotalamo hypofyzárního systému a jejich neurohumorálních mechanismů (England et Heimendahl, 2010). Tyto složky zajišťují informovanost a dokonalou souhru a vzájemnou součinnost všech systémů a orgánů sloužících k procesu rozmnožování. V systému jsou sice zastoupeny posloupně, avšak v důsledku neustálého vzájemného působení orgánů výše uložených orgány níže položenými představují nedělitelný uzavřený funkční okruh, jehož samoregulační principy zajišťují vzájemnou rovnováhu (Concannon, 2009).

V celém tomto systému je nejvýše uloženým řídicím orgánem pravidelného průběhu pohlavní činnosti centrální nervový systém, a to zejména hypotalamus a synaptické spoje s předním a středním mozkem, které jsou označovány jako limbický systém. Dále se tohoto funkčního reprodukčního okruhu účastní adenohipofýza, gonády a vývodné pohlavní cesty. Koordinace mezi jednotlivými složkami, které se na řízení pohlavní činnosti podílejí, tj. od vyšších k nižším a naopak, se uskutečňuje neurohumorálně (Elečko et Kudláč, 1987).

4.1.1 Centrální nervový systém

Kůra velkého mozku je buď úkolujícím, nebo naopak programujícím zařízením neurohumorální regulace reprodukčního procesu. Tvoří centrálu pro řízení sexuálních funkcí zároveň vyšší orgán analýzy a syntézy informací přicházejících z vnějšího prostředí. Smyslové orgány – zrak, sluch, čich, chuť, hmat vnímají ekologické vlivy a nervový systém poskytuje informace o vnitřním stavu celého organismu (England et Heimendahl, 2010). Všechny podněty jsou analyzovány v centrálně nervových strukturách tzv. limbického systému čichového mozku a dalších podkorových centrech a nervových jádrech. Odtud pak přicházejí do hypotalamu a částečně přes asociační centrum k bederní míše a jednotlivým pohlavním orgánům. Akustické, vizuální, čichové, hmatové, chuťové, termické, psychické, jakož i jiné sensorické vjemy jsou pak pro průběh pohlavních funkcí velmi významným činitelem (Elečko et Kudláč, 1987). Na úrovni centrálního nervového systému zprostředkovávají předávání impulsů a informací mezi nervovými buňkami neurotransmitry. Tyto látky jsou nehormonální povahy a uvolňují se elektrickým signálem nervové buňky, jež přes synaptický spoj předává informaci další nervové buňce. Dělí se na cholinergní – sem patří jako jejich hlavní zástupce acetylcholin, dále na adrenergní – noradrenalin a dopamin a sérotonin, k nimž patří serotonin a melatonin (Doležel et Kudláč, 1997).

Acetylcholin podněcuje sekreci uvolňujících hormonů pro FSH a LHA a dále inhibuje uvolňování LTH. Noradrenalin a dopamin rovněž stimulují produkci obou gonadotropiny uvolňujících hormonů. Obě tyto skupiny neurotransmitrů mají vliv na kontrakci hladké svaloviny pohlavního ústrojí. Sérotoninová skupina má pak antigonadotropní efekt. Vzájemné ovlivnění syntézy, uvolňování, příjmu, funkce a metabolismu těchto látek vede ke změnám v sekreci hypotalamických a hypofyzárních hormonů a opačně změny v těchto vyjmenovaných hormonech a v jimi řízených orgánových systémech působí také na tvorbu a funkci neurotransmitrů (Doležel et Kudláč, 1997).

4.1.2 Hypotalamus

Hypotalamus, který je částí mezimozku uloženou ventrálně od talamu, má ústřední postavení v řízení nejdůležitějších funkcí organismu. Obsahuje velký počet strukturálně i funkčně odlišných skupin buněk (England et Heimendahl, 2010). Dobře lze od sebe odlišit zejména dva úseky – dřeňově bohatý hypotalamus bez vztahu k adenohipofýze a dřeňově chudý hypotalamus, jež bývá označován jako vegetativní, s úzkým vztahem k hypofýze, neboť se v něm tvoří všechny neurohormony (Doležel et Kudláč, 2000).

V hypotalamu jsou určena dvě místa, která mají přednostní význam pro řízení pohlavní činnosti a jsou označována jako sexuální centra. Patří sem přední, nebo také rostrální sexuální centrum a zadní, nebo také kaudální sexuální centrum. Stimuly a vjemy přicházející z vnějšího prostředí jsou zachycovány v předním sexuálním centru, odkud jsou po zpracování vysílány rytmické nervové impulsy na kaudální hypotalamické sexuální centrum. Indukce těchto impulsů je regulována rytmem dnem a noci, ale reaguje poměrně citlivě i na další faktory vnějšího a vnitřního prostředí. Impulsy, jež přicházejí z předního centra, navozují v kaudální části sekreci speciálních látek, jimiž jsou neurosekrety uvolňující a inhibiční – RH a IH, které řídí vnitřně sekretonickou činnost adenohipofýzy. Přenos těchto neurosekrétů se uskutečňuje prostřednictvím hypofyzárního portálního cévního systému. Směr toku krve je nejčastěji od hypotalamu k hypofýze. Hypotalamus je nadřízeným a také řídicím centrem také i pro činnost zadního laloku hypofýzy (Elečko et Kudláč, 1987).

Hypotalamové hormony jsou tvořeny v nervových buňkách a plně tak odpovídají definici hormonů. Rozdělujeme je na uvolňovací (RH) a inhibiční (IH), které řídí činnost adenohipofýz (Rokyta, 2000).

Syntéza a uvolnění gonadotropního hormonu (GnRH) je řízena komplexním systémem, na který navazují různé transmittery, opiáty, melatonin (jehož sekrece je ve vztahu k délce denního světla) a četné nervové a hormonální zpětné vazby (England et Heimendahl, 2010). Gonadotropin uvolňující hormon (GnRH) je v hypotalamu produkován pulsním způsobem a portálním systémem je distribuován do adenohipofýzy, kde stimuluje tvorbu gonadotropinů (Roztočil et Bartoš, 2011).

Dalším důležitým hormonem, jež se účastní pohlavního cyklu je oxytocin, rovněž produkován v hypotalamu. U samice způsobuje stahy hladké svaloviny dělohy a také buněk mléčné žlázy. Ovlivňuje tak transport gamet v porodních cestách, účastní se fáze vypuzení plodu a posléze hraje podstatnou roli v procesu spouštění mléka (Concannon, 2009).

Mezi neurohormony patří rovněž dopamin, který funguje jako prolaktin inhibující hormon, jež je produkován hypofýzou (Elečko et Kudláč, 1987).

4.1.3 Hypofýza

Hypofýza je výkonným orgánem, který realizuje příkazy přicházející z hypotalamu a v určitém směru působí i jako zesilující zařízení. Jen nepatrné hypotalamické podněty jsou potencovány tím, že v adenohypofýze indukují větší množství gonadotropních hormonů, které jsou pak krví dále šířeny k výkonným orgánům reprodukční soustavy, což jsou pohlavní žlázy (Doležel et Kudláč, 1997).

Hypofýza má sice nadřazené postavení v regulaci celého endokrinního systému, nicméně nepřísluší jí dominantní úloha v hormonálním dění, neboť je plně řízena hypotalamem. Z anatomického i funkčního hlediska se dělí na dvě části, a to na adenohypofýzu a neurohypofýzu. Hormony adenohypofýzy většinou patří mezi tzv. glandotropní hormony, tj. hormony, které ovlivňují činnost jiných endokrinních žláz. Z hormonů ovlivňujících pohlavní cyklus zde secernují folikulo stimulující (FSH), luteinizační (LH) luteotropní hormon (LTH), který podněcuje tvorbu prolaktinu (Rokyta, 2000).

FSH stimuluje u samic růst a zrání folikulů na vaječníku (Elečko et Kudláč, 1987). Rovněž stimuluje tvorbu receptorů pro LH na granulózních buňkách folikulu (Reece, 2011). Spolu s LH pak podněcuje tvorbu estrogenů (Elečko et Kudláč, 1987). A zároveň má svou roli i při přetváření folikulů ve žluté tělíčko po ovulaci (England et Heimendahl, 2010).

LH navazuje na působení FSH a u samice vyvolává dozrání a ovulaci folikulů. Bezprostředně po ní působí na růst luteinové tkáně ve folikulu a tím stimuluje růst žlutého tělíčka (Elečko et Kudláč, 1987).

Prolaktin řízení sekrece tohoto hormonu se liší od jiných hypofyzárních hormonů. Podléhá četným fyziologickým vlivům a má např. cirkadiánní průběh, který stoupá během spánku (Roztočil et Bartoš, 2011). V luteální fázi spolu s LH, a do určité míry i s progesteronem působí výrazně luteotropně už od druhého týdne říjového cyklu a společně mají tuto nezbytnou funkci následujících 25 dnů (England et Heimendahl, 2010).

V neurohypofýze se z hormonů majících vliv na reprodukční cyklus tvoří oxytocin, který vyvolává kontrakce dělohy na konci březosti, po porodu spouští tvorbu mléka a velmi pravděpodobně má vliv i na vývoj mateřského chování u všech saveců (Rokyta, 2000).

4.1.4 Gonády

Gonády jsou vlastními výkonnými orgány reprodukční soustavy a jejich činnost je plně podřízena funkci hypotalamo – hypofyzárnímu systému. Vytvářejí mj. pohlavně specifické hormony, které podmiňují pohlavně specifické rozdíly v exteriéru samice a ovlivňují nejen látkovou výměnu, ale také pohlavní chování a vlastní funkci vývodných pohlavních cest. Zpětně pak tyto hormony ovlivňují činnost nadřazených center a jsou tak důležitou součástí auto regulativních principů pohlavní činnosti. Sexuální hormony vytvářené vaječníky v průběhu pohlavního cyklu jsou estrogény, progesteron a relaxin, v menší míře jsou to i androgeny (Rokyta, 2000).

Estrogény jsou vytvářeny v buňkách zrajícího folikulu a také v samotném vaječníku. Rozeznáváme tři základní přirozené estrogény – estradiol, estron a estriol. Jejich fyziologickým účinkem je jak stimulace růstu vývodných pohlavních cest samice, tak i vytváření sekundárních pohlavních znaků a také vývoj a růst vývodného systému mléčné žlázy (England et al., 2009). Jsou zodpovědné za psychické příznaky říje a vyvolávají morfologické a také funkční změny na vejcovodech, děloze a pochvě během fází pohlavního cyklu. Podněcováním syntézy bílkovin zasahují do látkového metabolismu a jsou nositeli zpětného vazebního mechanismu na hypotalamo – hypofyzární ose (Elečko et Kudláč, 1987). Estrogény vznikají tak, že luteinizační hormon (LH) stimuluje v buňkách theky tvorbu androgenů, FSH pak stimuluje v buňkách granulózy enzymatický systém aromatázy, a ta posléze mění androgeny v estrogény (Elečko et Kudláč, 1987).

Progesteron patří mezi nejvýznamnější přirozené gestageny. Kromě svého hlavního efektu, kterým je sekreční přeměna endometria dělohy má i další účinky: snižuje počet estrogenních receptorů a cestou negativní zpětné vazby snižuje produkci gonadotropinů v hypofýze (Roztočil et Bartoš, 2011). Tvoří se ve žlutém tělísku. Biologicky působí tak, že dokončuje změny pohlavního ústrojí vyvolané estrogény, ale především je důležitý pro vznik a zachování březosti (Elečko et Kudláč, 1987). Dočasně blokuje a zastavuje dozrávání dalších folikulů na vaječníku (Marvan et Hampl, 2011). Má významnou roli při vzniku alveolárního systému mléčné žlázy, je důležitý pro vznik mateřského pudu a velmi podstatnou úlohu hraje při ovulaci. Je stejně jako estrogény nositelem zpětné vazby na hypotalamus a má důležitý termogenní efekt (Elečko et Kudláč, 1987).

Mezi hormony ovlivňující řízení cyklu na hypotalamo – hypofýzo – ovariální ose patří i ovariální peptidy, a to inhibin a activin. Inhibin snižuje sekreci FSH. Jeho podíl na fyziologické regulaci FSH je nezpochybnitelný a během ovulačního cyklu jeho hladina

výrazně kolísá. Pokles hladiny inhibinu v periferní krvi je pak prvním příznakem poklesu ovariální funkce v souvislosti se stárnutím vaječníku. Activin naopak sekreci FSH zvyšuje (Roztočil et Bartoš, 2011).

4.1.5 Děloha

Vývodné pohlavní cesty umožňují samotný vznik a vývoj jedince. Se zřetelem k řízení pohlavní činnosti spočívá jejich význam zejména v produkci luteolytického faktoru – prostaglandinu $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), a tak se účastní samotného řízení pohlavního cyklu. Podráždění nervových zakončení v děloze a pochvě jsou přenesena do výše položených center a tím slouží k informovanosti o skutečném stavu pohlavní soustavy (Rokyta, 2000).

Prostaglandiny jsou biologicky aktivní lipidy, které mají svou funkci v průběhu mnoha reprodukčních procesů. Vyskytují se nejen v pohlavním ústrojí, ale také v jiných tkáních v těle. Jejich účinek je hormonům podobný, a jsou proto označovány jako tkáňové, nebo místní hormony. Jejich tvorba v endometriu ovlivňuje funkci žlutého tělíska - konkrétně navozuje jeho rychlou regresi a zastavuje produkci progesteronu. Tímto způsobem se podílí na nástupu porodu (Elečko et Kudláč, 1987).

4.2 Fáze říjového cyklu

Říjový cyklus feny se dělí na čtyři základní fáze: proestrus, estrus, metestrus a anestrus, které jsou blíže popsány v následujících podkapitolách.

4.2.1 Proestrus

Proestrus je na základě vnějších příznaků ohraničen objevením se krvavého výtoku z vulvy na začátku a nástupem svolnosti k páření (případně změnou charakteru výtoku) na konci této fáze (Svoboda, 2001). Trvá v rozmezí 5 - 20 dní a provázejí jej progresivními příznaky – zvětšení vulvy, proliferace vaginálního epitelu, zvýšení počtu epitelových buněk ve vaginálním stěru a vaginální sekrece pro psy atraktivních feromonů (Concannon, 2011). Hlavním příznakem je krvavý výtok z vulvy. Výtok může být rozličně vydatný. Příčina krvácení je diapedese a ruptury subepitelárních kapilár v děložní a poševní sliznici (Doležel et Kudláč, 2000). Diapedéza je proces, ve kterém pronikají krvinky stěnou neporušené cévy do mezibuněčného prostoru. Nebyly zjištěny žádné charakteristické změny červených krvinek v počtu či vzhledu v krevním obraze hárající feny (Pěčková, 2013).

Projevují se změny chování, ke kterým náleží zvýšený zájem o samce, častější značení močí a tendence toulat se (England et Heimendahl, 2010). Feny jsou pro psy atraktivní, avšak zprvu výskok nedovolí. Na vaječnicích probíhá růst frontálních 10 - 20 folikulů do velikosti 0,5 cm (Svoboda, 2001). Mikroskopickým vyšetřením stěru poševní sliznice – vaginální cytologií, lze zjistit pro toto období typické zvyšování buněk superficiálních, dosahujících na konci proestru až 80 %, na úkor snížení počtu buněk parabazálních a intermediálních. Výrazná je přítomnost erytrocytů (Doležel et Kudláč, 2000).

4.2.2 Estrus

V zevních příznacích tuto fázi charakterizuje svolnost k páření., případně žlutooranžový řídký výtok v menším množství. Délka říje činí obvykle 5 - 9 dní, může se však pohybovat mezi 3 - 21 dny (Svoboda, 2001). Na vývodných pohlavních orgánech ustupují příznaky estrogenizace. Výtok z vulvy slábne a nabývá slámové barvy. Podélné řasy v pochvě se snižují, otok přezky se zmenšuje. V počáteční fázi fena ještě vykazuje sníženou toleranci a akceptaci samce (England et Heimendahl, 2010). Nicméně feny jsou pro psy atraktivní, postupně samy psy vyhledávají, při vzeskoku stojí se zvednutým ocasem nahoru. Na tlak v bederní oblasti či dráždění v oblasti klitoris reagují stáním na místě a lordóze podobným prohýbáním (Doležel et Kudláč, 2000).

Pod vlivem estrogenu dochází k sekreci feromonů v sekretu vznikajícím ve vývodných pohlavních cestách a v moči. Feromony jsou detekovány čichovými orgány psa a jsou určeny ke zvýšení jeho sexuální aktivity (England et Heimendahl, 2010). Hormonální změny způsobí výrazný obraz vaginálních výtěrů, pokles hladiny estrogenu způsobuje snížení otoku a v důsledku toho je při endoskopickém vyšetření vaginální sliznice pozorováno jemné vroubkování. Maximální vroubkování se vyskytuje 4 - 5 den. Dochází i ke ztrátě napětí stydkých pysků. Tyto jevy jsou tak zásadní, že na základě jejich objevení se může být stanoven vhodný čas ke krytí či inseminaci. (England et Heimendahl, 2010).

Na vaječnicích folikuly zrychlují růst, v průběhu 2 - 5 dnů dosahují průměru 8 - 10 mm a ovulují (Svoboda, 2008). Po ovulaci na vaječniku v místě prasklého folikulu začne vyvíjet zvláštní útvar, s významnou vnitřně sekretonickou funkcí – žluté tělísko. To vzniká proliferací zbylých buněk zrnité vrstvy a vnitřního obalu folikulu, které se množí, značně zvětšují a nabývají polygonálního tvaru. Tyto buňky, které nazýváme luteinní, ukládají ve své cytoplazmě tukové kapénky a žlutý lipochrom lutein, který tak podmiňuje barvu celého tělíska. V důsledku proliferace luteinních buněk žluté tělísko postupně zaplní nejen původní dutinu folikulu, ale vyčnívá i nad povrch vaječniku v podobě kužele nebo stopkatého

hrbolku (Marvan et Hampl, 2011). Zajímavé je, že k luteinizaci stěny folikulu dochází ještě před samotnou ovulací, v tom okamžiku má v celém procesu své místo výrazný vzrůst koncentrace progesteronu v periferní krvi (England et Heimendahl, 2010). Další osud žlutého tělíska je pak závislý na tom, zda samice zůstala březí či nikoli (Marvan et Hampl, 2011) Pro vaginální cytologické vyšetření je typický až stoprocentní výskyt superficiálních bezjaderných buněk, téměř vymizení erytrocytů a vysoký eozinofilní index. (Doležel et Kudláč, 2000).

4.2.3 Metestrus

Metestrus, pořijová část luteální fáze, byla původně definována jako chování, které nastupuje, když končí říjové chování. Použitím morfologických kritérií, metestrus začíná, když je v 6. - 11. dni poprvé zaznamenán „metestrální“ vaginální stěr nebo je poprvé detekována „metestrální“ vaginální sliznice. Metestrus trvá, dokud nejsou příznaky luteální fáze zanedbatelné. Konec metestru a začátek anestru jsou definovány různě, jednak jako prodělávání histologické obnovy endometria, dále jako ústup zvětšení mléčné žlázy a v posledních letech jako pokles hladiny progesteronu pod asi 3 - 6 ng/ml. (Concannon, 2011). Tato tzv. luteální fáze pohlavního cyklu začíná vymizením svolnosti k páření, dále se zevně neprojevuje (Svoboda, 2001). Průměrná délka metestru je 65 dní s rozpětím 55 - 80 dní (Concannon, 2012).

Pohlavní orgány zcela ztrácí příznaky předchozí estrogenizace. Děložní krček se uzavírá a vyplňuje zátkou z hustého hlenu. Příčný a jednoduchý průběh děložních žlázek se zakřivuje a větví a žlázy naývají sekreční aktivitu.. Na začátku metestru jsou feny ještě pro psy atraktivní, avšak vzeskok již nedovolí. Výtok z pochvy nabývá povahy šedobílého hlenu a ustává (Doležel et Kudláč, 2000).

Na vaječnicích dominují žlutá tělíska, která se strukturálně i funkčně rozvíjejí do 20. - 30. dne po ovulaci, kdy dosahují velikosti kolem 10 mm. Po tomto termínu žlutá tělíska podléhají pomalé a postupné regresi a koncentrace progesteronu současně klesá až pod 1ng/ml na konci diestru, kdy žlutá tělíska funkčně zcela zanikají (Svoboda, 2001). Vaginální cytologií lze prokázat výrazný pokles počtu superficiálních buněk a zvyšování počtu buněk intermadiálních a parabazálních. Výrazné je zvýšení počtu neutrofilů (Doležel et Kudláč, 2000).

4.2.4 Anestrus

Anestrus je tzv. klidovou fází pohlavního cyklu fen. Klinicky nelze anestrus jednoznačně rozeznat od diestru (Svoboda, 2001). Jestliže předchozí cyklus byl zakončen

březostí, počátek anestrů zahrnuje laktaci. Délka anestrů se prodlužuje o délku laktace, díky čemuž v průběhu kojení neprobíhá ani proestrus ani estrus. Nástup fáze anestrů (po každé luteální fázi) nastává povinně a trvá minimálně 56 dnů, průměrně 126 - 140 dnů. (England et Heimendahl, 2010). To je možná důležité pro normální obnovu endometria, která je kompletní za 120 - 130 dní. Apoptický index a procento degenerovaných epiteliálních buněk endometria jsou vysoké během střední luteální fáze a nízké v raném anestrů a nepřítomné za 120 dní (Chu et al., 2006). Regenerace endometria po dlouhodobé stimulaci progesteronem je zakončena 130 - 150 den po nástupu říje, tedy přibližně ke konci 2. měsíce anestrů (Doležel et Kudláč, 2000).

V anestrů je pohlavní ústrojí ve fázi odpočinku a vnější i vnitřní rozmnožovací orgány mají nejmenší pozorovanou velikost v průběhu celého říjového cyklu. Stěna pochvy je relativně tenká. Endoskopickým vyšetřením vaginální mukózy zjišťujeme plochý vzhled vaginálních řas, které jsou tenké a červené (Nelson et Couto, 2014). Více zdrojů uvádí, že hladiny hormonů jsou na základní hranici (England et Heimendahl, 2010). Vaječníky jsou malé pouze s folikuly, které většinou nepřesahují průměr 2 mm (Svoboda, 2001). Vaginální cytologie prokazuje především intermediální a parabazální buňky (Doležel et Kudláč, 2000). Ojedinele se objevují neutrofilů a malé množství smíšených bakterií. (Nelson et Couto, 2014).

4.3 Endokrinologické řízení říjového cyklu

Činnost celého pohlavního ústrojí je složitý biologický proces tvořený vzájemně na sebe navazujícími úkony v časově posloupném pořadí. Musí být přiměřené intenzity, navzájem poměrně úzce související a časově korelující (Elečko et Kudláč, 1987).

V proestrů rostoucí folikuly zvyšují produkci i sekreci estrogenů (17 beta - estradiol). Koncentrace estrogenů v periferní krvi se zvyšuje z hodnoty kolem 15 pg/ml na začátku proestrů na hodnotu 60 - 120 pg/ml na jeho konci (Svoboda, 2001). Maximální sekrece estradiolu probíhá na konci proestrů (Doležel et Kudláč, 2000). Na každém vaječníku roste od dvou do osmi folikulů. Folikuly mají na začátku okolo 4. mm. Před předovulačním zvýšením LH dosahují folikuly velikosti okolo 6 - 9 mm. Současně s dozráváním folikuly začínají produkovat inhibin. V důsledku toho v pozdním proestrů hladina FSH přestává růst a může se začít snižovat (England et Heimendahl, 2010).

Počáteční fázi estrů charakterizuje zvýšení hladiny estrogenů, která se posléze snižuje s nástupem ovulace. V důsledku produkce estrogenů velikost folikulů dosahuje 9 - 12 mm, obvykle dosažení maximálního rozměru nastává mezi zvýšením LH a ovulací. Současně se zvýšením koncentrace estrogenů dochází k supresi vylučování LH a FSH

přes negativní zpětnou vazbu způsobenou estradiolem a inhibinem. Hladina estrogenů se snižuje a o den později nastává předovulační zvýšení hladiny LH. Koncentrace LH je obvyčejně zvýšená od 1. do 3. dnů. I přesto, že nejvyšší hodnoty může být doženo v každém z těchto tří dnů zdá se, že důležitým faktorem ovlivňujícím fyziologické jevy v tomto období je počáteční hladina LH spíše, než vrcholná koncentrace tohoto hormonu (England et Heimendahl, 2010).

Preovulační vlna LH v plodných cyklech vykazuje značnou variabilitu, často se pohybuje v rozmezí od 3. do 40. ng/ml, v průměru 13 ng/ml, a zřídka je nezjistitelná nebo nesplňuje výše uvedená kritéria. LH je typicky zvýšený nad 2 ng/ml po 1 - 3 dny, v průměru 2 dny, obvykle je maximální v prvních 12. až 18. hodinách (Concannon, 2011).

Vlna FSH je stejně výrazná, koncentrace vzrůstá zároveň s LH z méně než 50 ng/ml a dosahuje maxima 100 - 600 ng/ml 0 - 2 dny po dosažení maximální hladiny LH, a klesá pak pomaleji než LH (Concannon, 2012).

Začátek preovulační vlny LH nastává 0 - 3 dny (v průměru 1 nebo 2 různě dle studie) po maximu estradiolu. Tudíž estradiol zpočátku klesá před vzestupem hladiny LH a v některých cyklech do druhého vrcholu během nebo po preovulační vlně LH. S postupující luteinizací folikulu nastupuje sekrece progesteronu na úkor estrogenů. Tak koncentrace estrogenů klesá a koncentrace progesteronu se postupně zvyšuje na hodnoty 2 - 4 ng/ml. Od začátku proestru se postupně zvyšuje koncentrace testosteronu, která dosahuje vrcholu při LH vlně a poté rychle klesá. Ovulace u fen je spontánní a nevyžaduje stimulaci vyvolanou krytím (Concannon, 2012).

U feny obvykle dochází k několikanásobné ovulaci a histologická a laparoskopická vyšetření ukázala, že většina ovulací nastává mezi 48 - 60 hodinou po vrcholu LH, i když některé folikuly mohou ovulovat až do 96. hodin po vrcholu. Zajímavé je, že u některých fen dochází k velkým rozdílům v čase, ve kterém dochází k ovulaci v následujících cyklech. I když k ovulaci dochází obvykle 12 dní po začátku proestru, u některých fen může nastat v rozmezí od 5. do 25. dnů (England et al., 2009).

Základní kroky endokrinologického cyklu probíhají u psů i jiných druhů zvířat podobně, zejména předovulační vrchol LH, který nastupuje 2 dny před ovulací. Rozdíl u fen spočívá v tom, že ovulované oocyty se nacházejí v nezralém stadiu a nemohou být oplodněny (England et Heimendahl, 2010). Při ovulaci se uvolňují oocyty I. řádu, ve kterých se dokončuje v distální části vejcovodu v průběhu dvou až tří dnů první část meiotického dělení a dozrávají tak na oocyty II. řádu. (Svoboda, 2001).

Vajíčka, která zůstávají v porodních cestách si uchovávají životnost několik dní od momentu, kdy jsou schopné oplodnění, tj. nepodléhají degeneraci někdy až do 9 - 10 dne po ovulaci. V porovnání s jinými druhy to zjevné opoždění ve schopnosti oocytů být oplozeny současně s dlouhým časem jejich životaschopnosti má významný vliv na začátek a trvání fáze plodnosti. U všech druhů je fáze plodnosti shodná s okamžikem, kdy oocyty mohou být oplodněny. U feny začíná toto období 2 dny po ovulaci a trvá až do 5. dnů po ovulaci (England et Heimendahl, 2010).

Koncentrace progesteronu vzrůstá několik hodin před nebo v průběhu LH vlny a u feny, stejně jako u jiných druhů vzrůst koncentrace progesteronu ve folikulech je pravděpodobně důležitým faktorem ve vyvolání ovulace. Do konce říjového cyklu pak jeho hladina v periferní krvi dosahuje 10 - 25 ng/ml (okolo 10. dne). Předovulační vzrůst LH je často popisovaný jako hlavní jev říjového cyklu. S ohledem na to, že ještě po ovulaci feny vykazují reflex tolerance a akceptace, etapy březosti je lepší počítat se vztahem ke dni, kdy LH dosáhl vrcholu, než k prvnímu dni říje či ke dni krytí, jak je obvyklé u ostatních druhů (Concannon, 2012).

Vrchol LH kromě stimulace ovulace transformuje produkci steroidů v granulosačních buňkách z estrogenů na progesteron a mění folikul ve žluté tělísko. V tomto procesu se granulosační buňky kromě růstu mění na velké luteální buňky a buňky obalu folikulu se vedle proliferace mění v malé luteální buňky, přičemž podrobný charakter těchto změn nebyl u feny dosud popsán (England et Heimendahl, 2010).

U mnoha druhů po ovulaci velmi rychle odeznívá ochota k páření, naproti tomu u feny může svolnost ke krytí přetrvávat až 7 dní po ovulaci (England et Heimendahl, 2010). Přesně lze stanovit konec diestru pouze na základě průkazu snížení koncentrace progesteronu k bazálním hodnotám (méně než 1 ng/ml) (England et Heimendahl, 2010).

I když diestrus trvá 56 - 60 dní u březích a 60 - 90 dní u jalových fen, endokrinní stav u těchto zvířat je obdobný. Na vaječnicích dominují žlutá tělíska která se strukturálně i funkčně rozvíjejí do 20 - 30 dne po ovulaci, kdy dosahují velikosti okolo 10. mm a koncentrace progesteronu v periferní krvi kulminuje na hodnotách 30 - 60 ng/ml. Teoreticky luteální fáze začíná po ovulaci a v té době koncentrace progesteronu stále stoupá. Progesteron mění vlastnosti hlenu a snižuje dráždivost hladké svaloviny. Uvažuje se také o tom, že zpomaluje pohyb vajíček ve vejcovodech, a tím i uhníždění zárodků v děloze. Progesteron taktéž uzavírá děložní čípek a vytváří optimální podmínky pro uhníždění zárodků v děloze. Růst koncentrace progesteronu začíná několik hodin před nebo v průběhu předovulačního

vzestupu LH a do konce říjového cyklu (okolo 10. dne) dosahuje hladiny 10 - 25 ng/ml (Concannon, 2009).

Ve druhé polovině diestru v průběhu poklesu koncentrace progesteronu stoupá koncentrace prolaktinu. Přechodem do anestru koncentrace prolaktinu rychle klesá k nulovým hodnotám, při kterých přetrvává až do druhé poloviny následujícího diestru (Svoboda, 2001).

Na začátek anestru ukazuje pokles hladiny progesteronu pod 1 ng/ml. Fáze končí objevením se prvních příznaků proestru. Hypotalamo - hypofýzo - ovariální osa řídící pohlavní aktivitu je v relativním klidu, koncentrace hypofyzárních gonadotropinů i ovariálních steroidů se vesměs pohybují na bazálních hodnotách. (Svoboda, 2001).

V období anestru ale dochází k reakci hypotalamu. Okolo 60. dnů před následující ovulací začínají růst folikuly uvnitř vaječnicků. Poměrně vysoká koncentrace estrogenů může být pozorována v pozdním anestru, asi kolem 10 - 20 dne před začátkem proestru. I když nemáme mnoho informací o endokrinologických změnách ve fázi pozdního anestru je jasné, že v tom čase dochází ke zvýšení četnosti pulsačního vylučování LH a pulsačního vylučování FSH (England et Heimendahl, 2010).

5 Krytí feny

5.1 Stanovení optimální doby ke krytí feny

Reprodukce psů v současné době probíhá buď ve formě přirozeného páření, nebo inseminací čerstvým, či zmrazeným semenem (Svoboda, 2008). Stanovení optimální doby oplození feny činí v mnohých případech značné obtíže. Důvodem je velká fyziologická variabilita délky jednotlivých fází pohlavního cyklu, a ne vždy standardní projevy zevních příznaků říje. Pro určení vhodné doby ke krytí je využívána řada chovatelských postupů a vyšetřovacích metod, jež mají různou vypovídací schopnost (England et al., 2002).

Pokročilé stanovení optimálního času krytí či inseminace v průběhu říje patří mezi vysoce odborné činnosti. Pomáhá optimalizovat přirozené rozmnožování a určit vhodný čas pro umělou inseminaci. U patologických říjí pomáhá určit průběh ovulace a případně může pomoci stanovit příčinu infertility (Hošek, 2014). V přirozeném prostředí, kde jsou oba rodiče schopni fyziologického rozmnožování jsou využívány základní metody napomáhající k určení vhodného času ke krytí. (Hori et al., 2012).

Potřeba pokročilého stanovení času ovulace nastává zejména z těchto důvodů:

- a) chovatel má málo času a vyžaduje přesný čas krytí,
- b) nezabřezávající feny,
- c) feny s abnormálním cyklem,
- d) použití krycího psa se sníženou kvalitou semene,
- e) u často používaných krycích psů kde je předpoklad jednoho krytí,
- f) inseminace chlazeným nebo mrazeným semenem.

V rámci těchto důvodů jsou používány různé vyšetřovací metody a jejich vzájemné kombinace. Základní metody spadají do kompetence chovatele, pokročilejší, ke kterým jsou třeba i laboratorní vyšetření, zajišťuje veterinární lékař (Hošek, 2014).

5.1.1 Krytí na základě změn v charakteru výtoku

Optimální doba nakrytí je určována pomocí sledování změn krvavého výtoku na růžový, růžovožluté barvy až zcela světlý. Tento způsob ovšem nelze užít u všech fen, neboť u některých se během celého hárání nemusí krvavý výtok objevit vůbec. U jiných naopak přetrvává i ve fertilním období (Vitásek et al., 2001).

Na základě pozorování 390. estrálních cyklů od začátku objevení se krvavého výtoku u celkem 102 fen bylo konstatováno, že u 7,7 % fen dochází k ovulaci mezi 3 - 7 dnem, u 82,8 % mezi 8 - 14 dnem a u 9,5 % fen mezi 15 - 31 dnem (Hori et al., 2012).

5.1.2 Krytí na základě svolnosti k páření

Svolnost k páření je pozorovatelná přibližně v době LH peaku, přičemž samotné krytí by mělo následovat za 3 - 4 dny. U některých fen ovšem přetrvává neochota k páření i během vrcholu říje a jiné naopak jsou ke krytí svolné kdykoli (Vitásek et al., 2001). Navíc často dochází k tomu, že existuje velmi slabá korelace mezi činností endokrinního systému a zevními příznaky (England et al., 2009).

Chování mnoha fen nekoresponduje s hormonální hladinou a tato metoda má tedy poměrně malou vypovídající hodnotu pro úspěšné krytí. V některých případech je nástup estru a chování kolem něj rychlé a zcela zřejmé po krátkou dobu, a v některých naopak pomalé a jasné po dobu i několika dnů (England et al., 2002). Často není k dispozici ani vhodný testovací pes, případně fena akceptuje jen některého krycího psa a konkrétní chování pak může být spíše ve vztahu k tomuto psovi, než k aktuální fázi cyklu (Concannon, 2009). Dominantní feny nemusí projevovat svolnost k páření formou strnulého postoje vůbec, naproti tomu submisivní feny mohou naznačují svolnost i mimo období estru (Root Kustritz, 2001).

5.1.3 Krytí na základě délky hárání

Mnoho chovatelů se spoléhá na počítání dnů od začátku říje a věří, že k ovulaci feny dochází vždy po uplynutí přesně stanoveného počtu dní. Toto ale neplatí pro každé plemeno. Trvání říje je u fen variabilní. Zatímco „průměrná fena“ může mít plodné období 12. den od začátku hárání, není výjimkou ani fena, která je úspěšně nakryta i 30. den od začátku říje (England et al., 2002). Z tohoto důvodu nemusí být krytí mezi 12 – 16 dnem od začátku říje, což je běžně užívaná chovatelská praxe, zakončeno březostí (Kim et al., 2007). U některých fen tak může být krytí 10. den od počátku hárání opožděné, a u jiných naopak 15. den ještě předčasné (Vitásek et al., 2001).

5.1.4 Metoda monitorování fáze estru z vaginální cytologie

Vaginální stěry, jejich barvení a následné mikroskopické vyšetření buněk odloučených ze stěny pochvy je jednoduchou metodou monitorování fáze estru (England et Heimendahl, 2010). Tato metoda podává více informací o estrogenizaci feny, méně však o ovulaci a časném diestru. Z tohoto důvodu může být interpretace nálezu nepřesná (Aydin et al., 2011).

Vzrůst hladiny estrogenů v periferní krvi ve fázi proestru a estru způsobuje proliferaci buněk poševní stěny. Počet různých typů buněk v nátěru tak spíše poskytuje obraz hormonálních změn probíhajících v organismu (England et Heimendahl, 2010). V průběhu estru se buňky přeměňují v ploché zrohovatělé, které jsou charakteristické absencí jádérka. Díky tomu je možno předpovědět nástup plodného období pomocí stanovení procentuálního zastoupení bezjaderných buněk. Krytí je doporučeno v době, kdy bezjaderné buňky tvoří 75 % z celkového počtu buněk v nátěru. Toto období se kryje s nástupem fáze plodnosti. Je ovšem třeba mít na paměti individualitu každé feny – vzhledem k tomu nelze spoléhat výhradně na tuto metodu. Ve skupině fen, inseminovaných pouze na základě cytologického vyšetření, z průběhu březosti vyplynulo, že tyto feny byly inseminovány zbytečně průměrně o dva dny dříve, než feny, u nichž bylo provedeno i stanovení hladiny progesteronu (Niżański et Klimowicz, 2005). Díky této metodě lze ovšem ušetřit peníze za předčasné vyšetření krve a stanovení hladiny hormonů či marné výjezdy za krycím psem (England et al., 2002).

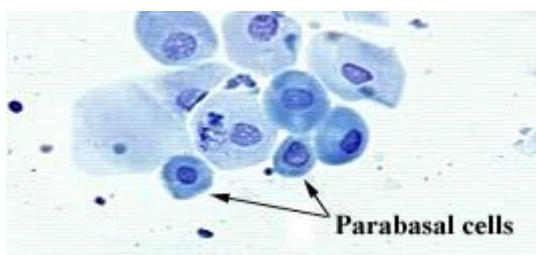
Vaginální stěr se nejčastěji barví metodou dle Giemsa Romanowského nebo rychlými barvicemi sety např. Diff - Quick nebo Hemacolor (Piaton et al., 2016). Giemsovo barvivo je roztok metylénové modři, azuru B a eosinu Y v metanolu a glycerolu. Barvení mikroskopických preparátů podle Giemsy je založeno na absorpci barviva organickými strukturami. Azur B barví modrošedě nukleové kyseliny, nukleoproteiny, granule bazofil a sekundární granula neutrofilů. Eosin Y barví oranžovo červeně hemoglobin a eozinofilní granula. (Julák, 2009).

Vzorek se odebírá navlhčenou vatovou tyčinkou ze stěny pochvy, mimo ústí močové trubice (Root Kustritz, 2011). Mírně se přitlačí k povrchu sliznice v caudodorsálním směru poševní klenby a poté se postupuje ve směru craniodorsálním směrem k páteři. Poté se lehkým otáčením tyčinky na podložním sklíčku otiskne (Aydin et al., 2011). Nechá se volně uschnout na vzduchu. Následuje barvení Diff – Qick: nátěr se ponoří do fixačního činidla - metanol 5x 1 s, poté do barvicí lázně s eozinem taktéž na 5x 1 s a nakonec do lázně

s azurem na 5x 1 s. Následuje oplach destilovanou vodou. Vzorek se nechá uschnout a pozoruje pod imerzí (England et Heimendahl, 2010).

Rozdělení buněk

Parabazálních buněk jsou nejmenší epitelové buňky, jež jsou typické pro vaginální nátěr. Jsou kulaté nebo téměř kulaté a mají velké jádro v poměru k cytoplazmě. Parabazálních buněk převládají na stěrech odebraných během diestru a anestru. Tyto buňky nejsou přítomné v průběhu říje (Bowen, 1998).

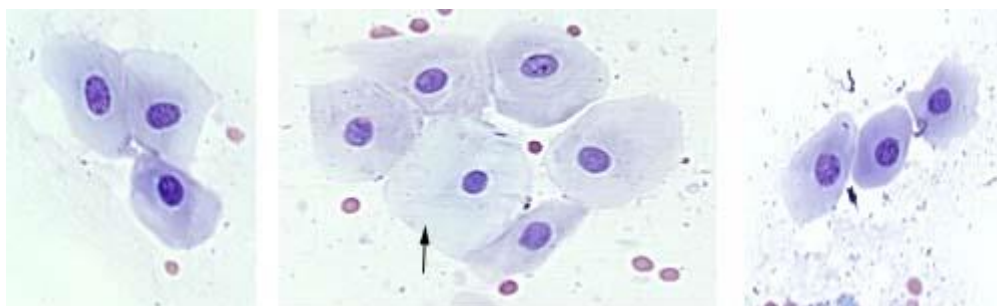


Obrázek 2: Parabazální buňky

Zdroj: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cells.html>

Intermediální buňky se liší ve velikosti a tvaru, ale typicky mají průměr dva až třikrát vyšší než parabazální buňky. Velká část odborné skupiny cytologů subklasifikuje intermediální buňky dle velikosti na: malé meziprodukty, jejichž tvar je téměř kruhový nebo oválný s velkými předními jádry, a velké meziprodukty, které mají polygonální tvar s malým poměrem jádra a cytoplazmy.

Intermediální buňky jsou převládající ve všech fázích cyklu kromě říje (Bowen, 1998).



Obrázek 3: příklad intermediálních buněk

Zdroj: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cells.html>

Povrchové buňky jsou největší buňky viditelné na vaginálním stěru. Jejich jádra buď chybí, nebo jsou pyknotická (velmi malá a tmavá). Povrchové buňky bez jádra se často označují jako "zcela zrohovatělé". Nejsou normálně vidět v průběhu anestrů a jejich zvýšená prevalence nastává během estruace. Přítomnost velkého množství povrchových buněk, nebo pouze povrchových buněk, je určující charakteristika cytologické říje a jejich náhlý a strmý pokles znamená nástup diestrů (Bowen, 1998).



Obrázek 4: Povrchové buňky

Zdroj: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cells.html>

5.1.5 Stanovení hladiny LH

Stanovení hladiny LH v krevním séru je velmi přesnou metodou udávající nástup ovulace. Nicméně její použití v řízení reprodukce, jak bylo již v 90. letech zmiňováno v americké literatuře, se v současné době v Evropě příliš nepoužívá (Santos et al., 2012). K vyšetření lze použít semikvantitativní test Wittnes LH (Hošek, 2014) příp. status LH (Nelson et Couto, 2014).

Fena musí být k odběru krve přivedena každý den, vzorky musí být odebírány denně v ten samý čas (England et al., 2009). LH peak může trvat jen 24 hod a u mnoha fen se jeho začátek nepodaří zachytit, jestliže se odběr provádí jen 1x denně (Nelson et Couto, 2014). Testuje se způsobem, kdy tři kapky krevního séra jsou umístěny do speciálního kontejneru v kitu a výsledek pak lze odečítat za 20 min. Pokud je barva testu shodná s barvou kontrolního proužku, je hladina LH nad 1 ng/ml (Santos et al., 2012).

Z endokrinologického pohledu je tento den označován jako den 0 ovulačního cyklu. Většina autorů uvádí, že po vrcholu LH nastane za 2 až 3 dny ovulace. Optimální doba ke krytí je pak 3. až 5. den u přirozeného páření. Tam, kde nelze zajistit přirozené páření, stává se dokonce ještě důležitějším přesně určit okamžik, kdy inseminovat feny v závislosti na druhu semene, které má být použito (čerstvé, chlazené nebo zmrazené sperma), neboť přežití spermií klesá s časem (Nižanški et Klimowicz, 2005). V případě použití čerstvého semene je doporučeno krytí 3. až 6. den po vrcholu LH peaku, je-li použito semeno chlazené

pak 4. až 6. den po LH peaku a při použití semene mraženého 7. až 9. den po LH peaku, tedy ode dne 0 (Payan - Carreira et al., 2011). Za nevýhodu této metody je možno označit subjektivní hodnocení výsledku testu osobou, která test provádí (Nelson et Couto, 2014). Laboratorní měření LH je v běžných podmínkách obtížné, neboť koncentrace LH v séru se může změnit během 20. min až trojnásobně (Jabor et Zámečník, 2002).

5.1.6 Stanovení hladiny progesteronu v krvi

Nejčastější příčinou nezabřeznutí feny je špatná organizace krytí (England et Heimendahl, 2010). Stanovení hormonálního profilu tak patří k základním diagnostickým metodám ve veterinární gynekologii. V reprodukci se nejčastěji uplatňuje stanovení hladiny progesteronu (P4) v krevním séru (England et al., 2002). Měření jeho koncentrace v periferní krvi je dobrou pomocnou metodou v mnohých případech, jež mohou nastat v reprodukčním období fen. Je rozhodující pro detekci ovulace a také např. při ovariální dysfunkci, k určení průběhu fáze estru a potvrzení luteolýzy v období před porodem (Brugger et al., 2011).

Stanovením konkrétní koncentrace progesteronu lze poměrně přesně určit fázi pohlavního cyklu feny a v průběhu hárání tak upřesnit optimální dobu k nakrytí či inseminace. Uplatňuje se především u fen, které nemohou opakovaně zabřeznout, příp. v situaci, kdy je potřeba z organizačních důvodů znát přesný termín ovulace, což je zejména v situaci, kdy je krycí pes obtížněji dostupný, např. z důvodu vzdálenosti. Také v případech, kdy je možno krýt jen jednou, je vhodné určit neoptimálnější dobu ke krytí s několikadenním předstihem. Nezbytnou se tato metoda stává v případě inseminace chlazeným či zmrazeným semenem, kdy vzhledem k nízké přežitelnosti spermií je úspěšné zabřeznutí závislé na přítomnosti již maturovaných oocytů ve vejcovodech feny (Payan - Carreira et al., 2011).

Stanovení hladiny progesteronu umožňuje zpřesnit tzv. nulový den cyklu, tj. termínu, ve kterém LH dosahuje maximální hladiny. V tom okamžiku dochází k vzestupu hladiny progesteronu nad bazální hodnoty. Analýza dynamiky změn hladiny progesteronu pak umožňuje stanovení optimálního dne k nakrytí feny (Root Kustritz, 2011). Porovnáním různých metod, jež se používají k určení optimální doby nakrytí se jeví stanovení hladiny progesteronu jako metoda nejpřesnější (England et Heimendahl, 2010).

5.2 Vyšetřovací metody pro stanovení hladiny progesteronu

Zvýšení hladiny progesteronu z bazální hodnoty nastává ve většině případů 2 dny před ovulací a dosahuje výrazně vyšších hladin v jejím průběhu. Tento vzestup je možno pozorovat během pravidelného monitoringu hladiny progesteronu v krevním séru, které tak umožňuje stanovit termín ovulace, potvrdit fakt, že k ovulaci došlo, a stanovit nejvhodnější čas k oplození. S ohledem na to, že počáteční vzrůst hladiny má progresivní průběh, vzorky krve mohou být odebírány co druhý nebo třetí den na rozdíl od každodenního odběru vzorků pro stanovení LH. (England et Heimendahl, 2010). Pravidelně je vhodné začít odebírat krevní vzorky od okamžiku, kdy vaginální stěry obsahují více než 70 % superficiálních bezjaderných buněk – to je bráno jako iniciální fáze vzrůstu hladiny progesteronu – obvykle nad 1,5 ng/ml. Každodenní sběr vzorků je vhodný u problematických žen a v případě použití inseminace (England et al., 2002).

V krvi se progesteron objevuje jak ve volné formě, tak vázaný na nosné proteiny. Více jak 90 % progesteronu je vázáno v plazmě na bílkoviny, které je potřeba z vazby cílenou reakcí uvolnit před jeho imunochemickým stanovením (Thomas., 1998). Progesteron může být stanoven různými laboratorními metodami, z nichž nejčastěji jsou užívány buď radioizotopová analytická metoda - RIA (Radio Immuno Assay) (Jabor et Zámečník, 2014), luminiscenční metody, mezi něž patří – CLIA (Chemi Lumminiscence Immuno Assay) (Nelson et Couto, 2014), fluorescenční enzymoimunologický test – FEIA (Fluorescence Enzyme Immunoassay) (Brugger et al., 2011) a semikvantitativní metodou - ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) (Nelson et Couto, 2014). Výše hladiny progesteronu může být udávána ve dvou jednotkách – ng/ml nebo nmol/l. Přepočítání probíhá podle vzorce $1 \text{ ng/ml} = 3,17 \text{ nmol/l}$ (England et Heimendahl, 2010).

5.2.1 Vyšetřovací metoda RIA (Radio Immuno Assay)

RIA (Radio Immuno Assay) je imunochemická analytická metoda, jejímž principem je kompetitivní reakce stanovovaného analytu a vhodného radioindikátoru o vazebná místa specifické protilátky. Kvantitativní vyhodnocení reakce je založeno na detekci radioaktivity. Vzorky a kalibrátory jsou inkubovány cca 3 h za stálého třepání při laboratorní teplotě (nebo 1 h při 37 °C) s ¹²⁵I - progesteronem ve zkumavkách, jež jsou potaženy králičí protilátkou vůči progesteronu. Pro vytěsnění progesteronu z bílkovin se používá danazol. Po inkubaci se obsah zkumavek dekantuje a měří se radioaktivita gama - počítacem (1 min). Signál je nepřímo úměrný koncentraci progesteronu ve vzorku (Thomas, 1998).

Hlavními výhodami této metody jsou vysoká citlivost a možnost automatizace. Za nevýhodu je nutno považovat nutnost separačního mezistupně, jakož i nákladné zařízení nutné pro provádění této metody a významná rizika spojená s manipulací s radioaktivní látkou (Jabor et Zámečník, 2014).

5.2.2 Vyšetřovací metoda CLIA (Chemi Lumminiscence Immuno Assay)

CLIA (Chemi Lumminiscence Immuno Assay) je jednostupňový kompetitivní zábleskový postup. Magnetické částice jsou potažené protilátkou vůči progesteronu a progesteron ze vzorku soutěží o její vazebná místa s progesteronem značeným izoluminolem. Imunoreakce probíhá 21 minut, po promytí se přidá startér a fotonásobičem se měří záblesk. Intenzita signálu je nepřímo úměrná hladině progesteronu. Citlivost je vyšší, než u RIA (Thomas, 1998).

5.2.3 Vyšetřovací metoda FEIA (Fluorescence Enzyme Immuno Assay)

FEIA (Fluorescence Enzyme Immuno Assay) je metoda zaměřená na měření fluorescence, které je silně ovlivňováno prostředím, ve kterém je fluorescenční látka měřena. Fluorescenční sonda je tvořena nejprve stabilním chelátem iontu vzácné zeminy konjugovaným s protilátkou nebo antigenem. Po proběhlé imunochemické reakci se tento chelát přemění na vysoce fluoreskující sloučeninu. Tyto sloučeniny mají dlouhodobou fluorescenci s velkým Stokesovým posunem fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a fluorescenčního spektra). Vzorek je pulsně excitován určitou vlnovou délkou světelného záření xenonovou výbojkou nebo laserem (frekvence 1 milisekunda). Detekce fluorescenčního záření je zaznamenávána se zpožděním několika desítek mikrosekund po dobu několika stovek mikrosekund. Takto se neregistruje parazitní fluorescenční záření biologického materiálu, jehož doba fluorescence se pohybuje v nanosekundách. Cyklus se opakuje 1000krát za sekundu. Fluorescence je změřena v kalibrátorech (5 až 8) a ve vzorcích. Pomocí kalibrační křivky je možno v jednotlivých vzorcích stanovit koncentrace stanovované látky (Jabor et Zámečník, 2014).

5.2.4 Vyšetřovací metoda ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)

ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovit ve vzorku koncentraci analytu. Indikátor imunochemické reakce je označen enzymem s vysokým číslem přeměny.

Metoda má heterogenní povahu, vyžaduje separaci volné a vázané frakce indikátoru. ELISA může být kompetitivní a nekompetitivní (Jabor et Zámečník, 2014). Enzymová imunoanalýza na mikrotitračních destičkách je kompetitivní postup, který používá zakotvenou králičí protilátku vůči progesteronu a do jamek se přidává vzorek nebo kalibrátor a progesteron značený POD. Po inkubaci a trojím promytí se přidá tetrametylbenzidin s H₂O₂ v dimetylsulfoxidovém pufru. Roztok se inkubuje 10 – 20 min třepáním, pak se pipetuje stop činidlo. Absorbance při 450 nm se měří do 20 min a je nepřímě úměrná koncentraci progesteronu ve vzorku. Celý postup probíhá za laboratorní teploty (Hannon et al., 2004).

Ve veterinární medicíně se objevilo několik ELISA testů ve formě sady, kde jsou výsledky hodnoceny po 30 - 45 minutách od odebrání vzorku. Jedná se o levnou a snadno proveditelnou analýzu, k níž nejsou nutná laboratorní zařízení, testování probíhá na veterinární klinice a je tedy celkově nenáročná na čas. Nicméně lékař má k dispozici pouze kvalitativní, nebo semikvantitativní výsledek, který má nižší vypovídací hodnotu a příliš se nehodí pro přesné předpovídání ovulace (Chapwanya et al., 2008). Jedním z minusů těchto rychlých testů je skutečnost, že vyhodnocení probíhá na základě změny barev testu. Koncentrace progesteronu je hodnocena podle kolorimetrické stupnice pro hodnoty odpovídající bazální hladině progesteronu (0 - 1 ng/ml), střední úrovni která odpovídá LH peaku (kolem 1 – 2,5 ng/ml) a období ovulace (2,5 – 8 ng/ml), a vysoké hladiny progesteronu době vhodné pro oplození (více než 8 nebo 10ng/ml) (Payan - Carreira et al., 2011). Jestliže hladina progesteronu vystoupí nad 10 ng/ml a krev je odebrána v tomto období, test poskytne výsledek „krýt ihned“, a tento výsledek bude doporučován další 2. měsíce. Tyto rychlé ELISA testy tedy poskytují správný výsledek pouze v případě, kdy se s testováním začne před ovulační fází a jakékoli další výsledky testů budou interpretovány na základě porovnání těchto předovulačních testů. Jestliže se na základě testu ukáže, že ovulace už proběhla, je třeba provést další doplňující vyšetření, např. cytologii pochvy, abychom se ujistili, že fena již není v metestru (England et Heimendahl, 2010).

Z jedné ze studií, jež testovala semikvantitativní testy vyplývá, že tato metoda odhaduje vyšší koncentraci progesteronu než RIA, a ukazuje tak, že doba vhodná k oplodnění nastává dříve, než tomu skutečně je (Payan-Carreira et al., 2011). Laboratorní vyšetření naopak velmi přesně označí zvýšení hladiny progesteronu (England et Heimendahl, 2010).

RIA je dnes snadno dostupnou vyšetřovací metodou, naneštěstí je její užití limitováno několika praktickými problémy, jako je např. použití gama-radioaktivních izotopů během diagnostického procesu. Častěji používanou metodou ve veterinární praxi je CLIA a v poslední době pak FEIA. Z porovnání CLIA a metody FEIA vyplývá, že FEIA metodou

dostáváme vyšší hladiny progesteronu, avšak ty jsou v korelaci v porovnání s metodou CLIA a tato metoda tedy je adekvátní pro sledování průběhu estrálního cyklu feny (Rota et al., 2016).

5.3 Stanovení vhodné doby krytí dle hladiny progesteronu

Nejlépeším způsobem stanovení termínu optimálního ke krytí je identifikace dne ovulace, což není vždy jednoduché. Cytologické vyšetření nátěru poševní sliznice je velmi významným prvkem v upřesňování průběhu říje. Dokáže velmi dobře určit začátek říje a také odhalit případné patologie. Nicméně často bývá cytologický obraz stejný po celou dobu samotného estru feny a vrchol samotné keratinizace buněk sliznice nastává v období D-5 až D+1 (Když za D-0 označujeme den ovulace.). Pokud tedy není zachyceno období zlomu proestrus – estru, těžko lze z pouhého vyšetření nátěru vaginální sliznice stanovit optimální dobu ke krytí. Z těchto důvodů je potřebné další vyšetření, a to stanovení hladiny progesteronu případně LH (England et Heimendahl, 2010).

Vyšetření by měla probíhat v logických krocích – začíná se podrobnou anamnézou a pokračuje vaginálním a cytologickým vyšetřením. Z hlediska normálně probíhající říje trvající asi 21 dní je vhodné zařadit vyšetření progesteronu kolem 8. a 9. dne říje (Root Kustritz, 2001). V poševním nátěru by mělo být 60 % (Santos et al., 2012) až 80 % keratinizovaných buněk (England et al., 2002). Vyšetření se pak provádí každých 48 hodin, ideálně každých 24 hodin.

Hladina progesteronu 1 - 2 ng/ml je většinou uváděna jako shodná s nejvyššími hladinami LH a výpočet ovulace tak lze hrubě odhadnout na +2 dny od tohoto okamžiku (England et Heimendahl, 2010). Protože je levnější a jednodušší změřit sérové koncentrace progesteronu než koncentrace LH v séru, sjednocený nárůst progesteronu s LH se běžně používá k odhadu dne 0 a naplánování inseminace (Kim et al., 2007). Výše hladiny progesteronu se pohybuje v období kolem vzestupu LH mezi 0,8 – 3 ng/ml, od 1,0 do 8,0 ng/ml v období ovulace a od 4,0 do více než 30 ng/ml ve fertilní fázi (Nelson et Couto, 2014). 48 hodin po ovulaci roste prudce až k hodnotám kolem 60 ng/ml (Reynaud et al., 2012).

Z různých pozorování vyplývá, že dynamika růstu hladiny progesteronu je velmi různorodá. Z tohoto důvodu jednorázový odběr krve, zhodnocení a stanovení termínu krytí nemusí vést k úspěchu. Je vhodné sledovat dynamiku vývoje hladiny progesteronu pomocí vícero vyšetření. Za jednoznačné potvrzení správného průběhu lze považovat zvyšování

hladiny progesteronu z bazálních hodnot k hodnotám svědčícím o formování funkčních žlutých tělísek (Nizański et Klimowicz, 2005).

Na základě zjištěných hodnot progesteronu je voleno vhodné schéma krytí podle způsobu oplodnění (England et al., 2002).

5.3.1 Přirozené krytí feny

V případě přirozeného krytí je použito schéma: hodnoty pod 2 ng/ml – opakované vyšetření krve za 3 - 5 dní, hodnoty 2 - 3 ng/ml opakování vyšetření nebo krytí za 3 - 4 dny, 4,6 - 8 ng/ml krytí za 1 - 2 dny, 8,1 - 16 ng/ml – okamžité krytí (England et Heimendahl, 2010).

5.3.2 Inseminace feny

Určit optimální čas k nakrytí a zaručit tak odpovídající plodnost je ještě důležitější v případě, kdy je fena z různých důvodů inseminována. Vhodný den pro inseminaci je určován v závislosti na druhu semene, které má být použito, tedy na tom, zda se jedná o semeno čerstvé, chlazené nebo zmrazené, neboť obvykle přežití spermií klesá s uplynulým časem (Payan-Carreira, 2011).

Čerstvé semeno Při použití čerstvého semene je doporučeno zahájit inseminaci v okamžiku, kdy hodnota progesteronu dosáhne 4 ng/ml a inseminovat obden, a to až 3x. Semeno je doporučeno deponovat buď transcervikálně nebo vaginálně. Obvykle se jedná o 1 - 4 den po ovulaci a hodnoty progesteronu se v tomto období pohybují mezi 8 - 15 ng/ml. Očekávaný čas přežití spermií je 4 - 6 dní a v tomto období se fertilita pohybuje mezi 80 až 90 % (Payan-Carreira, 2011).

Chlazené semeno Při použití chlazeného semene se doporučuje zahájit inseminaci 2 - 4 den po ovulaci, kdy se hodnoty progesteronu pohybují v rozmezí 8 – 15 ng/ml. Použije se jedna až dvě dávky semene v rozmezí 48 hodin a aplikují se buď transcervikálně nebo vaginálně. Spermie v tomto případě přežívají 24 – 72 hodin (Payan-Carreira, 2011).

Mrazené semeno V případě, že je k inseminaci užito mrazeného semene, by pak první inseminace měla být provedena v okamžiku, kdy jsou hodnoty progesteronu nad 8 ng/ml. Toto období nastává mezi 5 – 7 dnem po ovulaci. Inseminuje se dvěma dávkami v rozmezí 24 hodin a hladina progesteronu se pohybuje mezi 18 – 28 ng/ml. Spermie mají nejnižší

očekávanou dobu přežití, a to 12 až 24 hodin. Taktéž očekávaná fertilita je nižší, a to okolo 45 % v případě vaginální depozice a 67 až 84 % v případě depozice transcervikální či intrauterinní (Payan-Carreira, 2011).

U mrazeného spermatu je kapacitace spermií kratší i v důsledku sekundárních efektů, jež souvisí s procesem zamrazování. Je-li používáno sperma čerstvé či chlazené, měla by inseminace být provedena v den ovulace a druhá dávka by měla být aplikována od dva dny později. Naopak je-li použito zmražené sperma, je nutno počítat s dozráváním oocytů ve vejcovodech ženy a sperma by mělo být aplikováno 2 dny po ovulaci a druhá inseminace o 48 hod později (Nizański et al., 2004).

Úspěch inseminace, a tedy březost ženy v případě použití čerstvého semene úzce souvisí s kvalitou semene a vhodným časem inseminace. Jestliže je použito sperma chlazené, pak význačnými faktory ovlivňující úspěšné zabřeznutí je jak kvalita semene, tak místo, kam je deponováno. Pokud je použito sperma mrazené, pak intrauterinní metoda inseminace se jeví jako rozhodující pro úspěšné zabřeznutí (England et al., 2006).

6 Březost feny

6.1 Hladina progesteronu v době březosti

Po ovulaci dojde u feny k rychlé inhibici sexuálního chování, které koresponduje takřka současně se vzrůstem hladiny progesteronu v krevním séru. V tom okamžiku končí estrus a nastupuje buď březost, nebo fáze metestru. Tato fáze je v obou případech charakterizována růstem žlutého tělíska na vaječniku, a to na místě ovulovaného Graafova folikulu. Je nazývána fází luteální a teoreticky začíná bezprostředně po ovulaci (Concannon, 2011).

Žluté tělísko u fen vrůstá do parenchymu vaječniku a je endokrinologicky aktivní, produkuje zejména progesteron. Věk a hmotnost feny významně ovlivňuje počet vytvořených žlutých tělísek: u fen starších 2,5 roku a těžších než 20 kg jich byl pozorován větší počet, než u fen mladších a lehčích (Marinelli et al., 2009).

Po ovulaci progesteron v krvi stále stoupá. Mění sekreci sliznic a snižuje dráždivost hladkého svalstva. Předpokládá se, že tím zpomaluje průchod vajíček přes vejcovody, čímž oddaluje okamžik přechodu embryí do dělohy do okamžiku, než je děložní sliznice schopna je přijmout (de Gier et al., 2006). Jedním z jeho účinků je i zavírání děložního krčku, a následná podpora uchycení placenty (Verstegen - Onclin et Verstegen, 2008).

Růst hladiny progesteronu nastává několik hodin před, cca 4 – 12 (de Gier et al., 2006), nebo během předovulačního vzestupu LH a na konci říjového cyklu dosahuje hladiny 10 - 25 ng/ml. Progesteronový profil v krvi v časně luteální fázi je identický pro feny březí i nebřezí a je jen velmi málo rozdílu v průběhu luteální fáze mezi březí a nebřezí fenou (England et Heimendahl, 2010). Produkce progesteronu žlutým tělískem je sice výrazně vyšší u březích fen, ale biologické změny, jež provázejí březost, jako např. nárůst objemu krve, rychlejší metabolizování v perifériích a využívání placentou vede k podobným plazmatickým koncentracím nativního progesteronu v obou skupinách fen (Concannon, 2009). Ačkoli plazmatické koncentrace progesteronu zůstávají u obou skupin srovnatelné, vyhodnocení fekálních metabolitů progesteronu jasně odlišuje stav březosti. Pouze množství progesteronových metabolitů sledovaných ve výkalech umožňuje jasnou diferenciaci březích a nebřezích zvířat. Tento rozdíl se vyskytuje také u jiných druhů šelem a slouží ke sledování březosti. Ovšem toto je důvod, proč nemohou být u fen použity progesteronové testy stanovující plazmatickou koncentraci v krvi k detekci březosti (Verstegen-Onclin et Verstegen, 2008).

V průběhu celé březosti je progesteron produkován výlučně žlutým tělískem. V této fázi je nejdůležitějším fyziologickým mechanismem udržujícím březost zabránění luteolýze a přeměna žlutého tělíska cyklického v tělísko gravidní. To po zbytek březosti zabezpečuje konstantní produkci progesteronu (Doležel et Kudláč, 1997), k udržení březosti je nezbytná hladina nad 2 ng/ml (Verstegen-Onclin et Verstegen, 2008).

Mezi 20 – 35 dnem po LH peaku dosahuje hladina progesteronu hodnot 15 - 90 ng/ml (Concannon, 2011). Luteální fáze trvá přibližně 63 dnů od ovulace do porodu, pokud ale fena není březí, je tato fáze o něco málo delší a trvá okolo 66 dnů (Verstegen-Onclin et Verstegen, 2008).

O uchování březosti na samém počátku rozhodují vztahy mezi oplozeným vajíčkem a sliznicí dělohy, a to prostřednictvím nervových impulsů v ní vznikajících, jež regulují funkci hypotalamo - adenohipofyzárně - ovariálního systému. Pro zachování březosti a vývoj plodu je kontinuální tvorba progesteronu v ovariích feny nezbytná, avšak bylo prokázáno, že po vytvoření placenty je březost možno udržet i po chirurgickém odstranění ovarií, a to injekčním podáváním progesteronu březí feně (Verstegen-Onclin et Verstegen, 2008).

V důsledku zvýšené sekrece progesteronu v první polovině březosti pravděpodobně stoupá sekrece prolaktinu, a to mezi 25 – 28 dnem od počátku březosti (Concannon, 2011). Následkem toho začíná ve druhé polovině březosti hladina progesteronu postupně klesat a prolaktin naopak neustále stoupá (England et Heimendahl, 2010). Pokud dojde k úplnému vyblokování prolaktinu z krve dříve než 25. den od LH peaku, má to za následek úplnou regresí žlutého tělíska. Na druhé straně v důsledku zjištění, že ani sekrece progesteronu, ani plazmatická koncentrace LH nemá podstatný vliv na změnu hladiny prolaktinu, jeho role se zdá být více zaměřena na zpomalování luteální regrese než že aktivně stimuluje syntézu progesteronu (Kowalewski, 2012). Nepřímé důkazy naznačují, že zvýšenou sekrecí prolaktinu ovlivňuje placentární relaxin, který se začíná objevovat v krvi mezi 25 - 30 dnem od LH peaku a jeho sekrece trvá až do porodu (Concannon, 2009).

Prolaktin je v krevním séru ve zvýšené míře přítomen nejen ve druhé polovině březosti, ale posléze i v době laktace. Vlivem různých faktorů, např. stresu a denní doby je jeho hladina nestálá a není tak vhodná k potvrzení březosti. Potlačení jeho sekrece prostřednictvím dopaminových agonistů nebo jiných mechanismů vede k zastavení funkce žlutého tělíska, což způsobí absenci sekrece progesteronu a následný potrat (Verstegen-Onclin et Verstegen, 2008).

K předčasné luteolýze a resorpci žlutého tělíska a tím k následnému potratu dochází také podáváním GnRH antagonistů, opakovaných vysokých dávek PGF2 α nebo jeho analogů, či antagonisty progesteronu (Concannon, 2009).

Hladina progesteronu zůstává konstantě vysoká po celou dobu březosti a k jejímu snížení dochází cca 18 hodin až 2 dny před nástupem porodu (Concannon, 2009).

6.2 Hormonální řízení porodu v návaznosti na progesteron

Stanovení hladiny progesteronu patří k nejpřesnějším metodám určení vhodného času porodu (Kutzler et al., 2003) a u problémových fen může sloužit k prevenci a minimalizaci reprodukčních ztrát. Přesná znalost délky gravidity tak může pomoci v plánování nevhodnějšího termínu provedení císařského řezu např. u obtížně rodících plemen, či u fen, u nichž se v minulosti objevily komplikace v průběhu porodu. Nikoli nepodstatnou roli hraje i u málopočetných vrhů, u nichž často dochází k protražované délce březosti, kdy hrozí odumření plodů (Okkens et al., 2001) . A konečně, pokrok v technikách asistované reprodukce jako je například estrální synchronizace a přenos embryí, vyžaduje přesnou předpověď ovulace, znalost gestačního věku a datumu porodu (Kim et al., 2007).

Klíčem k načasování trvání psí březosti není ani datum inseminace ani nástup říje, ale spíše preovulační LH peak a současné zvýšení sérových koncentrací progesteronu (Kim et al., 2007). Porod běžně nastává 65. den \pm 1 den po LH peaku, ne dřív jak 55. den a nejpozději 68. den po páření (Concannon, 2011). Březost po inseminaci se uvádí v rozmezí od 57. do 72. dnů. Rozptyl mezi těmito měřeními je přičítán potenciální 6. denní životaschopnosti spermií v samičím reprodukčním ústrojí. Délka březosti, měřeno od prvního dne diestru na základě poševní cytologie, má velký rozsah - 51 - 60 dnů, i když 80 % fen rodí 57. den (Kim et al., 2007).

Kutzler et al. (2003) byli schopni přesně předvídat datum porodu v rozsahu 65 \pm 1 den v 67 % případů, \pm 2 dny v 90 % a v rámci \pm 3 dnů ve 100 % případů posuzovaných fen, u nichž byla ve fázi estru z koncentrací progesteronu detekována hladina vyšší než 1,5 ng/ml a dále stoupala $>$ 3.0 ng/ml v příštím vzorku (Kutzler et al., 2003).

Březost je ukončena fetu - placentárním mechanismem, který uvolňuje velké množství děložního anebo placentárního PGF2 α a spočívá v jeho nárůstu 24 - 36 hodin před porodem (Concannon, 2009).

Prostaglandin F receptory jsou konstitutivně tvořeny v psím žlutém tělísku, jejichž růst je pozorován mezi 5. až 25.dnem březosti (Kowalewski, 2012). Jejich citlivost na PGF2 α

je snižována sekrecí progesteronu v první polovině březosti a začíná se zvyšovat po 35 - 40 dnech jejího trvání, což je jev důležitý pro pozdní fázi březosti, kdy placenta tvořící PGF 2α musí zabezpečit předporodní luteolýzu (Concannon, 2009). Ta vede k rychlému poklesu progesteronu z hladiny 4 - 10 ng/ml, až na hodnotu 1 - 2 ng/ml 8 - 12 hodin před porodem. Progesteron je termogenní hormon; jeho snížená koncentrace je následována sníženou rektální teplotou (Smith, 2007). Pokles hladiny progesteronu proto provází snížení tělesné teploty ženy o 1 - 2 °C 12 - 24 hodin před porodem (Verstegen - Onclin et Verstegen, 2008). Chovatelé v závěru březosti ženě mohou měřit teplotu dvakrát nebo třikrát denně a zaznamenat tak čas, kdy je rektální teplota 37,2 °C nebo nižší, a na základě tohoto měření očekávat nástup porodu během následujících 24 hodin. V indikovaných případech lze v tom okamžiku provést císařský řez (Smith, 2007).

7 Závěr

Výše popsané informace lze shrnout do několika bodů, při jejichž uplatnění v praxi nastává očekávaný vrchol chovatelské práce, kterým je úspěšný odchov zdravého a početného vrhu štěňat.

- Po potvrzení počínající keratinizace poševních buněk cytologickým vyšetřením je doporučován odběr krve veterinárním lékařem na stanovení hladiny progesteronu. Odběry krve by měly být prováděny optimálně denně nebo alespoň obden až do okamžiku, kdy začne hladina progesteronu stoupat, a na základě její výše je doporučen nejvhodnější čas k nakrytí feny.
- Podle způsobu oplodnění je doporučeno následující schéma krytí:

Přirozené krytí: hodnoty 2 - 3 ng/ml - opakování vyšetření nebo krytí za 3 - 4 dny, 4,6 - 8 ng/ml - krytí za 1 - 2 dny, 8,1 - 16 ng/ml – okamžité krytí.

Inseminace čerstvým semenem: hodnota progesteronu 4 ng/ml - inseminovat obden, a to až 3x.

Inseminace chlazeným semenem: hodnoty progesteronu v rozmezí 8 – 15 ng/ml. - inseminovat ihned a opakovat v rozmezí 48 hodin.

Inseminace mrazeným semenem: hladina progesteronu nad 18 ng/ml - inseminovat ihned dvěma dávkami v rozmezí 24 hodin.

- Monitorování hladiny progesteronu je dobrou pomůckou i pro stanovení termínu blížícího se porodu. V důsledku luteolýzy klesne jeho hladina z hodnot 4 - 10 ng/ml až na 1 - 2 ng/ml a porod tak lze očekávat v následujících 8 - 12 hodinách.
- V důsledku snížení hladiny progesteronu dochází k poklesu tělesné teploty feny o 1 - 2 °C cca 12 - 24 hod před porodem. Pokud chovatel měří tělesnou teplotu feny 2x denně cca od 58 dne od prvního krytí, je pokles tělesné teploty ve většině případů signálem, že během následujících hodin dojde k porodu.

8 Seznam literatury

Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T., Dinc, D. A. 2011. Determination of the Stages of the Sexual Cycle of the Bitch by Direct Examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances* [online]. 10 (15). 1962–1967. [cit. 2016-11-11]. ISSN: 16805593.

Dostupné z <<http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2011.1962.1967>>

Bowen, R. 1998. Cytologic changes through the canine oestrus cycle [online].

[cit. 2016-11-30]. Dostupné z

<<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cells.html>>

Brugger, N., Otzdorff, C., Walter, B., Hoffmann, B., Braun, J. 2011. Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme – linked Fluorescence Assay. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 46 (5). 870–873.

[cit. 2016-09-05]. ISSN: 09366768.

Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.14390531.2011.01757.x>>

Concannon, P. W. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function.

reproduction in domestic animals [online]. 44. 3–15. [cit. 2016-08-20]. ISSN: 09366768.

Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>>

Concannon, P. W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* [online]. 124 (3–4). 200–210. [cit. 2016-08-20]. ISSN: 03784320.

Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010004124>>

Concannon, P. W. 2012. Research Challenges in Endocrine Aspects of Canine Ovarian

Cycles. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 47 (6). 6 - 12. [cit. 2016-09-05]. ISSN:

09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12121>>

Černý, H. 2002. *Veterinární anatomie pro studium a praxi*. Noviko. Brno. 528 s. ISBN: 8086542017.

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

Doležel, R., Kudláč, E. 2000. *Veterinární porodnictví*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinárního lékařství. Brno. 193 s. ISBN: 8085114917.

Elečko, J., Kudláč, E. (eds). 1987. *Veterinární porodnictví a gynekologie*. 2. vyd. SZN. Praha. 572 s. ISBN: 0705387.

England, G. C., Heimendahl, A. von. c2010. *BSAVA manual of canine and feline reproduction and neonatology*. 2nd ed. British Small Animal Veterinary Association. Quedgeley, Gloucester [England]. VIII, 230 p. ISBN: 9781905319190.

England, G. C. W., Burgess, C. M., Freeman, S. L., Smith, S. C., Pacey, A. A. 2006. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology* [online]. 66 (6–7). 1410–1418. [cit. 2016-10-31]. ISSN: 0093691x.

Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X06000434>>

England, G., Concannon, P. W., Vertegen III, J. 2002. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. International Veterinary Information Service [online]. Recent Advances in Small Animal Reproduction. Ithaca. 2002 (A1231.0602.). 1 - 11. [cit. 2016-10-17]. Dostupné z <www.ivis.org>

England, G. C. W., Russo, M., Freeman, S. L. 2009. Follicular Dynamics, Ovulation and Conception Rates in Bitches. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 44 (6). 53–58. [cit. 2016-09-05]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2009.01416.x>>

de Gier, J., Kooistra, H. S., Djajadiningrat – Laanen, S. C., Dieleman, S. J., Okkens, A. C. 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle - stimulating hormone, estradiol - 17 β , progesterone, prolactin, and α - melanocyte - stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* [online]. 65 (7). 1346–1359. [cit. 2016-09-05]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05003614>>

Hannon, H. W., Atkinson, M. A., Ball, D. J., Lorenz, R. G., Matsson, P. N. J., Moore, D. M., Whitley, R. J. 2004. Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, Fluorescence, and Luminescence Immunoassays: Approved guideline. NCCLS. Wayne, Pa. 52 p. ISBN: 156238533X.

Hori, T., Tsutsui, T., Amano, Y., Concannon, P. W. 2012. Ovulation Day After Onset of Vulval Bleeding in a Beagle Colony. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 47. 47–51. [cit. 2016-09-28]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12076>>

Hošek, L. 2014. Stanovení luteinizačního hormonu (LH) při časování říje u fen. *Veterinářství. Brno*. 64 (7). 501–506. ISSN: 05068231.

Chapwanya, A., Clegg, T., Stanley, P., Vaughan, L. 2008. Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology* [online]. 70 (5). 795–799. [cit. 2016-11-01]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X08002999>>

Chu, P., Lee, C. S., Wright, P. J. 2006. Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Theriogenology* [online]. 66 (6–7). 1545–1549. [cit. 2016-08-23]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X06000392>>

Jabor, A., Zámečník, M. (eds.). 2014. Encyklopedie laboratorní medicíny [online]. 12. vyd. SEKK. Pardubice. [cit. 2016-12-07]. ISBN: 80–238–9775–6. Dostupné z <<http://www.enclabmed.cz/>>

Julák, J. 2009. Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie. 2. vyd. Karolinum. Praha. 113 s. ISBN: 9788024611419.

Kim, Y. H., Travis, A. J., Meyers – Wallen, V. N. 2007. Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology* [online]. 68 (8). 1177 - 1182. [cit. 2016-12-15]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07005080>>

- Kowalewski, M. P. 2012. Endocrine and Molecular Control of Luteal and Placental Function in Dogs: A Review. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 47. 19–24. [cit. 2016-12-26]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12036>>
- König, Horst Erich., Liebich, Hans – Georg. 2002. *Anatomie domácích savců*. Bratislava. H & H. 416 s. ISBN: 8088700574.
- Marinelli, L., Rota, A., Carnier, P., Da Dalt, L., Gabai, G. 2009. Factors affecting progesterone production in corpora lutea from pregnant and diestrous bitches. *Animal Reproduction Science* [online]. 114 (1–3). 289–300. [cit. 2017-01-15]. ISSN: 03784320. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008004107>>
- Marvan, F., Hampl, A. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 5. Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 9788021321885.
- Nelson, R. W., Couto, C. G. c2014. *Small animal internal medicine*. 5th ed. Elsevier. St. Louis, Missouri. 1504 p. ISBN: 9780323086820.
- Niżański, W., Klimowicz, M. 2005. Skuteczność sztucznej inseminacji suk nasieniem świeżym przy zastosowaniu různých metod wyznaczenia terminu unasienniania. *Medycyna Weterynaryjna* [online]. 61 (1). 75–81. [cit. 2016-11-02]. Dostupné z <<http://medycynawet.edu.pl/index.php/archives/13/45-contents-medycyna-wet-61-1-1-72-2005>>
- Niżański, W., Klimowicz, M., Dubiel, A. 2004. Technika inseminacji domaczinej, dawka inseminacyjna i wyznaczenie optymalnego terminu unasienniania suk. *Medycyna Weterynaryjna*. 60 (9). 915–919. ISSN: 0025-8628
- Okkens, A. C., Kooistra, H. S. 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 41 (4). 291–296. [cit. 2016-08-20]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2006.00702.x>>
- Okkens, A. C., Teunissen, J. M., Van Osch, W., Van Den Brom, W. E., Dieleman, S. J., Koistra, H. S., Kooistra. 2001. Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. In: *Advances in Reproduction in Dogs, Cats and Exotic Carnivores: Journal of Reproduction and Fertility*. Oslo, Norway. 57. s. 193–197. ISSN: 0449-3087.
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin - Versini, I., Bretz - Grenier, M. F., Courtade - Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury - Feith, J., Vielh, P., Egelé, C., Bellocq, J. P., Michiels, J. F., Cochand - Priollet, B. 2016. Guidelines for May - Grünwald - Giemsa staining in haematology and non - gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFA). *Cytopathology* [online]. 27 (5). 359–368. [cit. 2016-11-11]. ISSN: 09565507. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/cyt.12323>>
- Pěčková, H. 2013. *Reprodukční cyklus feny*. Bakalářská práce. Brno. 34 s. Mendelova univerzita v Brně Agronomická fakulta Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Řezáč, CSc.

- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada. Praha. 473 s. ISBN: 9788024732824.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Saint – Dizier, M., Thoumire, S., Marnier, C., Tahir, M. Z., Meylheuc, T., Chastant – Maillard, S. 2012. Folliculogenesis, Ovulation and Endocrine Control of Oocytes and Embryos in the Dog. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 47 (1). 66–69. [cit. 2016-08-25]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12055>>
- Rokyta, R. 2000. Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech. 1. ISV nakladatelství. Praha. 359 s. ISBN: 8085866455.
- Root Kustritz, M. V. 2001. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management [online]. International Veterinary Information Service. Ithaka. Document No. A1221.0501. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z <www.ivis.org>
- Root Kustritz, M. V. 2011. Clinical canine and feline reproduction: evidence – based answers. Wiley - Blackwell. Ames, Iowa. 332 s. ISBN: 0813815843.
- Rota, A., Vannozzi, I., Marianelli, S., Gavazza, A., Lubas, G. 2016. Laboratory and Clinical Evaluation of a Feia Method for Canine Serum Progesterone Assay. *Reproduction in Domestic Animals* [online]. 51 (1). 69–74. [cit. 2016-09-02]. ISSN: 09366768. Dostupné z <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12647>>
- Roztočil, A., Bartoš, P. 2011. Moderní gynekologie. Grada. Praha. 528 s. ISBN: 9788024728322.
- Santos, N. R., Maenhoudt, C., Borges, P., Mir, F., Decrouy, D., Fontbonne, A. 2012. Evaluation of a commercially available luteinizing hormone test to determine the breeding time in the bitch. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Whistler. [online] [cit. 2016-10-20] Dostupné z <www.ivis.org>
- Smith, F. O. 2007. Challenges in small animal parturition—Timing elective and emergency cesarian sections. *Theriogenology* [online]. 68 (3). 348–353. [cit. 2016-12-26]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07001987>>
- Svoboda, M. 2001. Nemoci psa a kočky: II. díl. Noviko. Brno. 2038 s. ISBN: 8090259537.
- Thomas, L. (ed.). c1998. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. TH-Books. Frankfurt am Main. 1527 p. ISBN: 3980521540.
- Verstegen-Onclin, K., Verstegen, J. 2008. Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. *Theriogenology* [online]. 70 (3). 291–299. [cit. 2016-12-02]. ISSN: 0093691x. Dostupné z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X08002252>>
- Vitásek, R., Číhalová, P., Zajíc, J. 2001. Zkušenosti s určováním vhodné doby krytí fen na základě koncentrace progesteronu v periferní krvi. *Veterinářství*. 51(1), 9–11. ISSN 0506-8231