**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**

# Vaginální cytologie u feny

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Kateřina Doudová**

**Vedoucí práce: MVDr. Romana Krejčířová**

**© 2016 ČZU v Praze**

**Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vaginální cytologie u feny" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4. dubna 2016 _____

**Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala MVDr. Romaně Krejčířové za odborné vedení při vypracování bakalářské práce.

# Vaginální cytologie u feny


**Souhrn**

Vaginální cytologie je mikroskopická vyšetřovací metoda, která slouží k vyhodnocení fází estrálního cyklu a z toho plynoucí možnost načasování vhodného termínu pro úspěšné krytí feny. Podstatou vyšetření je subjektivní hodnocení epitelu a morfologie buněk. Vaginální cytologii ovlivňují především hladiny pohlavních hormonů, které jsou typické pro jednotlivé fáze cyklu.

Během estrálního cyklu dochází k pravidelným fyziologickým změnám na vnitřních i vnějších pohlavních orgánech. Také chování feny, zejména s ohledem na odmítání či akceptování psů, je závislé na fázi cyklu. U fen se říje dostavuje obvykle dvakrát ročně, a to v 5 až 12 měsíčních intervalech. Pohlavní cyklus je členěn na jednotlivé fáze: proestrus, estrus, metestrus a anestrus. Z hlediska sexuálního chování feny je možné rozlišit celý estrální cyklus na období sexuální ochoty (proestrus, estrus) a období sexuální neochoty (metestrus, anestrus).

Proestrus začíná regresí žlutého tělíska a končí nástupem estru. Na konci proestru se objevuje LH vlna, po které v dalších 24 až 48 hodinách následuje ovulace. Proestrus je charakterizován progresivním zvětšením velikosti vulvy, vaginální epiteliální proliferací, rohovatěním epitelu pochvy a otokem vulvy. Pro tuto fázi jsou v cytologickém nátěru z pochvy typické parabazální a intermediální buňky, erytrocyty a leukocyty.

Estrus je období sexuální ochoty. V této fázi dochází k prasknutí dozrálého folikulu a následné ovulaci vajíčka. V cytologickém nátěru z pochvy jsou pro toto období typické dominující superficiální dlaždicovité buňky. Mohou se zde objevovat erytrocyty. V počátečním období estru se často vyskytují rovněž velké intermediální buňky.

V následující fázi, metestru, se postupně vyvíjí žluté tělísko. Cytologický nátěr z pochvy se vyznačuje přítomností velkého počtu neutrofilů, typické jsou parabazální a malé intermediální buňky.

V anestru se naplno projevuje luteální aktivita žlutého tělíska. Poševní cytologie je charakterizována nálezem parabazálních, malých intermediálních buněk a leukocytů.

Vaginální cytologie je snadná, rychlá, neinvazivní a levná metoda, která umožňuje identifikovat fáze reprodukčního cyklu u fen a diagnostikovat některé patologické stavy reprodukčního ústrojí (hormonální dysfunkce, zánětlivá a nádorová onemocnění).

Více než u ostatních domácích zvířat jsou u feny vyjádřeny vaginální cytologické změny, které korelují s každou fází estrálního cyklu.

**Klíčová slova:** fena, pochva, pohlavní cyklus, pohlavní hormony, cytologie

# Vaginal Cytology in the Bitch

**Summary**

Vaginal cytology is microscopic examination method which is used to evaluation phases of oestrus cycle and possibility of result time the best date for successful breeding. Substance of the examination is subjective evaluation of the epithelium and cell morphology. Vaginal cytology is influenced by levels of sexual hormones which are typical for individual phases of oestrus cycle.

Regular physiologic changes on internal and external sexual organs happen during oestrus cycle. Canine behaviour, espacially with regard on refusal or accept dogs, is depending on phases of interval. Oestrus is in the bitch usually twice a year, in 5 to 12 month cycles. Oestrus cycle is devided into individual phases: proestrus, estrus, metestrus and anestrus. In terms of sexual behavior of females the whole estrous cycle can be distinguished into a period of sexual willingness (proestrus, estrus) and the period of sexual reluctance (metestrus, anestrus).

Proestrus begins as a regression of the corpus luteum and finishes with onset of estrus. At the end of proestrus LH surge occurs after which further 24 to 48 hours ovulation follows. Proestrus is characterized by progressively increasing size of the vulva, vaginal epithelial proliferation, cornification epithelum of vagina and vulva swelling. For this stage parabasal and intermedial cells, erythrocytes and leukocytes are typical in the cytological smear of vagina.

Estrus is the period of sexual willingness. In this period matured follicle burst and subsequent egg ovulation. In this cytology smear dominating superficial squamous cells are typical for this period. There can observed erytrocytes. In initial period of estrus too large intermediate cells often appear.

In the next period, metestrus, the corpus luteum is gradually developing. Cytology smear from vagina is characterized by the presence of large numbers of neutrophils, typical are parabasal and small intermediate cells.

In anestrus manifests luteal activity of the corpus luteum. Vaginal cytology is characterized by finding parabasal, small intermediate cells and leukocytes.

Vaginal cytology is a simple, quick, noninvasive and inexpensive procedure that allows us to identify the stage of the reproductive cycle of bitches and to diagnose some pathologic conditions of the genital tract (hormonal dysfunctions, inflammatory or neoplastic diseases).

More than other domestic animals vaginal cytologic changes are expressed in the bitch which correlate with each phase of the estrous cycle.

**Keywords**: bitch, vagina, oestrus cycle, sex hormones, cytology

# Obsah

**1 Úvod ..... 1**

**2 Cíl práce ..... 2**

**3 Literární rešerše ..... 3**

3.1 Anatomická stavba pohlavní soustavy u feny ..... 3

3.1.1 Vaječník u feny (ovarium) ..... 4

3.1.2 Vejcovod u feny (tuba uterina, oviductus) ..... 5

3.1.3 Děloha (uterus) ..... 6

3.1.4 Pochva (vagina) ..... 6

3.1.5 Vulva (vateň) ..... 7

3.2 Hormony ovlivňující pohlavní soustavu feny ..... 8

3.2.1 GnRH (Gonadotropin releasing hormon) ..... 10

3.2.2 Gonadotropiny ..... 10

3.2.3 Estrogeny ..... 12

3.2.4 Progesteron ..... 13

3.2.5 Prostaglandiny ..... 14

3.3 Estrální cyklus ..... 14

3.3.1 Proestrus ..... 15

3.3.1.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v proestru ..... 16

3.3.1.2 Vliv proestru na chování feny ..... 18

3.3.2 Estrus ..... 18

3.3.2.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v estru ..... 18

3.3.2.2 Vliv estru na chování feny ..... 20

3.3.3 Metestrus ..... 21

3.3.3.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v metestru ..... 22

3.3.3.2 Vliv metestru na chování feny ..... 22

3.3.4 Anestrus ..... 22
3.3.4.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v anestru ..... 23
3.3.4.2 Vliv estrogenů na změnu epitelu pochvy v anestru ..... 24
3.4 Vaginální cytologie ..... 24
3.4.1 Podstata vaginální cytologie ..... 24
3.4.2 Způsob odebírání vzorků k cytologickému vyšetření ..... 25
3.4.3 Vyhodnocení vzorků vaginální cytologie ..... 25
3.4.4 Spolehlivost vyšetření ..... 30
**4 Závěr ..... 31**
**5 Seznam literatury ..... 32**

# 1 Úvod

Vaginální cytologie je vyšetřovací metoda, která slouží k vyhodnocení fází estrálního cyklu u feny. Jedná se o mikroskopické vyšetření stěru poševní sliznice. Každá fáze cyklu se vyznačuje odlišným obrazem vaginální cytologie. Na základě tohoto vyšetření je možné určit vhodný termín pro krytí feny s velkou pravděpodobností zabřeznutí.

Vaginální cytologie je ovlivněna řadou faktorů. K nejdůležitějším faktorům jsou řazeny hladiny pohlavních hormonů a s tím související změny v epitelu pochvy. Vaginální cytologie je metoda umožňující odhalit nastupující říji ještě před projevením jejich klinických příznaků.

Kladem této metody je její snadná proveditelnost a rychlost získání aktuálních výsledků.

# 2 Cíl práce

Cílem této práce je seznámit chovatele s problematikou vaginální cytologie. Součástí práce je popis působení hormonů na vaginální epitel, výskyt daných buněk v jednotlivých fázích estrálního cyklu a popis samotné metody vaginální cytologie.

# 3 Literární rešerše

## 3.1 Anatomická stavba pohlavní soustavy u feny

Reprodukční funkce u samice spočívají v tvorbě vajíček (oocytů) a zajištění vhodného prostředí pro růst a výživu plodu, který se vyvíjí po oplození zralého vajíčka spermií. Na konci březosti následuje porod a samice pokračuje po dobu laktace ve výživě svého mláděte (Reece, 2011). Samičí pohlavní orgány se dělí, podobně jako samčí, na orgány pro tvorbu zárodečných buněk a orgány pro jejich odvádění (König et Liebich, 2002).

Pohlavní ústrojí není pro vlastní organismus nezbytně nutné (Najbrt et kol., 1982).

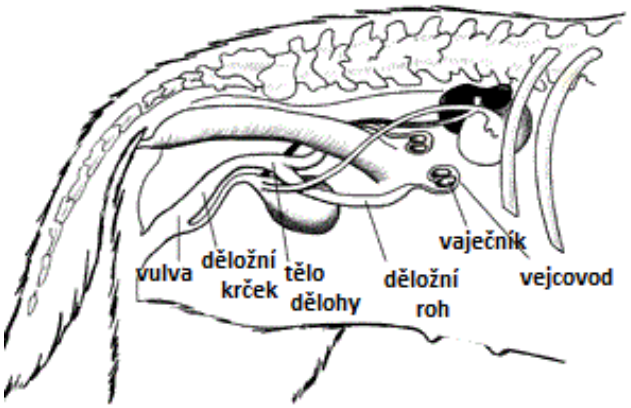
K samičím reprodukčním orgánům patří párové vaječníky a párové vejcovody, dále děloha, pochva a vulva (Reece, 2011).

Ve vaječnících dochází k tvorbě samičích pohlavních buněk (König et Liebich, 2002). V bohatě prokrveném vazivovém základu vaječníku jsou uloženy zárodečné buňky v primárních vaječníkových váčcích (Najbrt et kol., 1982).

Od vaječníků vedou orgány pro odvádění a uchovávání embryonálních buněk (vejcovod a děloha) (König et Liebich, 2002). Vejcovod začíná v blízkosti vaječníku, kde jedním koncem ústí volně do pobřišniční dutiny a druhým koncem do dělohy (Najbrt et kol., 1982).

Děloha je velmi rozšířená část vývodných samičích pohlavních cest. Její silná svalová stěna jí umožňuje značné rozšíření během březosti a svými silnými stahy při porodu vypudí zralý plod (Najbrt et kol., 1982).

Pochva navazující kaudálně na dělohu slouží jako porodní cesty i jako kopulační orgán. Samičí porodní pohlavní cesty končí v místě, kde do nich ústí močová trubice (Najbrt et kol., 1982).




Obr. 1: Rozmnožovací soustava feny. [cit. 2016-02-29].
Dostupné z: < http://www.peteducation.com/article.cfm?c=2+2083&aid=920>.

### 3.1.1 Vaječník u feny (ovarium)

Vaječníky u feny jsou uloženy vysoko dorzálně v bederní oblasti, kaudálně od ledvin (König et Liebich, 2002). Vaječník je párová žláza, ve které se vyvíjejí vajíčka a produkují pohlavní hormony (Reece, 2011). Vaječník u psa je dlouhý asi 1 – 2 cm a široký až 1,5 cm. Velikost se liší v závislosti na plemenu (Najbrt et kol., 1982).

Funkce vaječníků a sekrece jejich hormonů je zajištěna pomocí hormonů z hypofýzy (König et Liebich, 2002).

Povrch a tvar vaječníku je proměnlivý vlivem tvorby folikulů a žlutého tělíska (Najbrt et kol., 1982). Povrch vaječníků má epitelovou vrstvu, pod kterou je bělavý obal. Tento obal se skládá z kolagenního vaziva, které pokrývá celý vaječník. Pod tímto obalem je korová vrstva. Ta obsahuje velké množství folikulů v různém stádiu vývoje. Dřeň je v centru vaječníku. Obsahuje řídké kolagenní vazivo, nervy, krevní a lymfatické cévy (Reece, 2011). Vnější vrstvu vaječníku ohraničuje tunica albuginea, která je na povrchu pokryta jednovrstevnatým zárodečným epitelem (König et Liebich, 2002).

Folikuly uvnitř kůry jsou rozdělovány na 1) primární, 2) sekundární (rostoucí) folikuly a 3) měchýřkovité neboli Graafovy folikuly (Reece, 2011).

Primární folikuly jsou tvořeny jednou vrstvou plochých buněk folikulárního epitelu. Folikuly obklopují vajíčko. Primární folikul se zvětšuje polárním zmnožením buněk, až se přemění v sekundární folikul, ve kterém dochází ke vzniku štěrbinovitých prostorů vyplněných tekutinou. Tyto prostory splývají a postupně tvoří jednotnou dutinu folikulu.

Dalším zmnožením tekutiny a zesílením vnitřních vrstev stěny folikulu vzniká terciální folikul (Graafův folikul), který je připraven k ovulaci. Stěna Graafova folikulu je tvořena folikulárním epitelem, který obklopuje dutinu folikulu. Vajíčko je excentricky přiloženo ke stěně folikulu a je obklopeno vrstvou složenou z jemných fibril (zona pellucida). Na zonu pellucidu přiléhá několik vrstev buněk folikulárního epitelu – corona radiata (König et Liebich, 2002).

Póry zony pellucidy procházejí výběžky granulózních buněk a tak dochází k interakci mezi granulózními buňkami a povrchem oocytu. Spermie při oplození musí nejprve rozpoznat zonu pellucidu, následně k ní přilnou a přicházejí s ní do intimního kontaktu. Nakonec touto vrstvou projdou, aby dosáhly plazmatické membrány oocytu (Reece, 2011).

Přítomnost Graafova folikulu a zvýšená tvorba estrogenu vede k říji (svolnost k páření), zatímco progesteron připravuje dělohu pro implantaci oplozeného vajíčka (König et Liebich, 2002).

Současně s diferenciací ovariálních folikulů probíhají meiotické fáze rozmnožování a zrání oocytů. Primární oocyt u feny dokončuje první meiotické dělení (redukční dělení) až po ovulaci. Druhé meiotické (ekvální) dělení začne probíhat až po vniknutí spermie do oocytu během oplození ve vejcovodu. Pod vlivem luteinizačního hormonu (LH) hypofýzy dochází k prasknutí folikulu a je odstartována ovulace. Vajíčko, společně se svými okolními buňkami, je vyplaveno folikulární tekutinou z folikulární dutiny a dostává se do nálevky vejcovodu (König et Liebich, 2002). Po ovulaci se na vaječníku v místě prasklého Graafova folikulu začne vyvíjet kompaktní útvar s vnitřní sekrecí – žluté tělísko (Kudláč et kol., 1987).

### 3.1.2 Vejcovod u feny (tuba uterina, oviductus)

Reece (2011) popisuje vejcovod jako párovou zvlněnou hladkosvalovou trubici, která je vystlaná sliznicí a přivádí vajíčka od vaječníku do příslušného děložního rohu. Vejcovod dosahuje délky 5 – 10 cm (Najbrt et kol., 1982). Ovariální konec vejcovodu má tvar nálevky, kde je přijímáno ovulované vajíčko. Po nálevce vejcovodu následuje mírně rozšířený úsek vejcovodu (ampule), kde dochází k oplození (König et Liebich, 2002).

Stěna vejcovodu se skládá ze sliznice, svaloviny a pobřišnice. Sliznice je tvořena víceřadým cylindrickým epitelem s řasinkami. Svalová vrstva je z hladké svaloviny a zesiluje směrem k děloze (Najbrt et kol., 1982).

### 3.1.3 Děloha (uterus)

Děloha poskytuje prostor pro vývoj plodu. Pokud došlo k oplození vajíčka, vajíčko sestoupí do dělohy. Děloha je tvořena z krčku, těla a dvou rohů. Je vystlána bohatě žláznatou sliznicí (Reece, 2011).

Děložní rohy zasahují hluboko do břišní dutiny a jsou silné jako tužka (König et Liebich, 2002). Dle Najbrta et kol. (1982) jsou u feny děložní rohy dlouhé, rovnoměrně široké.

Děložní tělo je dlouhé asi 2 – 3 cm (Najbrt et kol., 1982).

Krček dělohy zasahuje kaudálně do pochvy (Reece, 2011). Děložní krček je silnostěnný, dobře hmatatelný uzávěr dělohy, jehož lumen se otevírá pouze při říjí a během porodu (König et Liebich, 2002). Hlen, který je viditelný při říji, je sekretem žlázových pohárkovitých buněk. Během březosti sekret těchto buněk vytéká do pochvy a zabraňuje proniknutí infekce z vaginy do dělohy (Reece, 2011).

Děloha je vystlána vysokou děložní sliznicí (endometrium), opatřenou víceřadým cylindrickým epitelem. Její tloušťka je závislá na stadiu cyklu. Na jejím povrchu ústí četné tululózní žlázy. Na endometrium navazuje dvouvrstevná svalová vrstva – myometrium. Myometrium je značně vyvinuté a bohaté na elastická vlákna. Povrch dělohy obaluje serózní povlak děložní (perimetrium). V děložním krčku je cylindrický jednovrstevný epitel (Najbrt et kol., 1982; König et Liebich, 2002).

### 3.1.4 Pochva (vagina)

Pochva je reprodukční orgán, který je uložen v pánvi a spojuje dělohu s vulvou (Reece, 2011). Dle Königa et Liebicha (2002) se jako vagina označuje oddíl kopulačního orgánu, který sahá od zevního ústí děložního krčku až po vyústění močové trubice.

Během kopulace slouží pochva jako příjemce samčího penisu. Pochva je vystlána sliznicí krytou vrstevnatým dlaždicovým epitelem bez žláz (Reece, 2011). Buňky, které pokrývají sliznici vaginy, se během cyklu mění v závislosti na hladině hormonů. Lze je použít jako spolehlivé indikátory při určování říje (König et Liebich, 2002).

Poševní předsíň začíná u vyústění močové trubice. U feny vyčnívá otvor močové trubice kousek nad úroveň dna předsíně. Sliznice poševní předsíně je zvlhčována žlázami, jejichž sekret snižuje tření pohlavních orgánů při kopulaci. Během říje vůně sekretu těchto žláz sexuálně

stimuluje samčího partnera. V laterální stěně poševní předsíně u feny je uloženo po jednom topořivém tělese (König et Liebich, 2002).

Kutánní sliznice poševní předsíně je růžově červená, pokryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem (Najbrt et kol., 1982). Poševní předsíň končí vnějším vyústěním a kaudálně přechází v pochvu (Reece, 2011).

Výstelku pochvy, poševní předsíně a vulvy tvoří rohovatějící vrstevnatý dlaždicovitý epitel, který je možno rozdělit na tyto základní vrstvy:

- stratum germinativum
  - stratum cylindricum seu basale (vnitřní bazální vrstva)
  - stratum spinosum: a) profudum (vnější bazální vrstva)
    b) superficiale
- stratum intraepiteliale seu granulosum
- stratum corneum

Každá z těchto uvedených vrstev je tvořena morfologicky charakteristickým typem buněk, jehož nález je v poševním nátěru specifickým odrazem hormonálního profilu jedince.
Nejvzdálenější vrstvou od lumina pochvy je vnitřní bazální vrstva, kterou tvoří jedna řada kubických až cylindrických buněk (bazofilní buňky), jež se prstencovitě zakotvují do bazální membrány, oddělující buňky od cévnatého vaziva. Bazální buňky vynikají vysokou mitotickou aktivitou a vytvářejí tzv. regenerační vrstvu poševní sliznice. Druhou vrstvu poševního epitelu (vnější bazální vrstva), tvoří několik řad kubických buněk (parabazální buňky). Pro tyto buňky je typické četné intracelulární můstky, často se jevící jako nerovnosti buněčné membrány. Střední a nejsilnější vrstvu poševního epitelu tvoří několik řad tvarově a velikostně vysoce variabilních buněk – intermediální buňky. Povrchová vrstva je tvořena superficiálními buňkami. Vrstvu tvoří několika řadami plochých polyedrických buněk, které podléhají rozsáhlé degeneraci jádra a cytoplazmy. Superficiální buňky jsou buňky odumírající nebo mrtvé, proto se také spontánně odlučují (Láznička, 1992).

### 3.1.5 Vulva (vateň)

Samičí vnější genitálie se skládají z vulvy, která je tvořená stydkými pysky a klitorisem. U samic je vulva kaudální částí pohlavních orgánů (Reece, 2011). Zevně jsou stydké pysky kryty kůží s četnými potními a mazovými žlázami a chlupovými váčky s jemnými chloupky.

Kůže stydkých pysků uvnitř stydké štěrbiny postupně přechází v kutánní sliznici poševní předsíně. Stydké pysky jsou tedy v podstatě kožní řasou s bohatým podkožním vazivem. To obsahuje velké množství tukové tkáně, hladkosvalová vlákna a hluboce uložený hladký a žíhaný sval. Vulva se nachází těsně ventrálně od řitě. Stydká štěrbina je oddělena od řitního otvoru pouze úzkým pruhem kůže. Ta plynule přechází v kůži stydkých pysku na straně jedné a v kůži řitě na druhé straně. V hloubce jsou oba útvary vzájemně odděleny masou svalové a vazivové tkáně, která tvoří střed pánevní hráze (Najbrt et kol., 1982).

Samičí rudimentální analog penisu – poštěváček – je zakryt nejspodnější částí vulvy. V poštěváčku se nachází topořivá tkáň se senzitivním nervovým zakončením (Reece, 2011).

## 3.2 Hormony ovlivňující pohlavní soustavu feny

Klasicky byly hormony definovány jako chemické substance, produkované žlázami bez vývodu, které jsou uvolňovány do krve a jsou přenášeny do ostatních částí těla a mají specifické regulační účinky. Proto je mnoho látek, které vykazují aktivitu podobnou hormonům, považováno za hormony. Zařazeny k nim jsou však s rozpaky, neboť z uvedené definice nesplňují jedno nebo více kritérií. Proto by se raději měly hormony považovat za chemické regulátory. Hormony mohou být produkovány buď buňkami se specifickým umístěním ve zvláštních žlázách, nebo buňkami roztroušenými v mnoha tkáních těla (Reece, 2011).

V řízení nejdůležitějších funkcí v organismu má ústřední postavení hypotalamus (Kudláč et kol., 1987). Na hypotalamus funkčně navazuje hypofýza (podvěsek mozkový) (Reece, 2011).

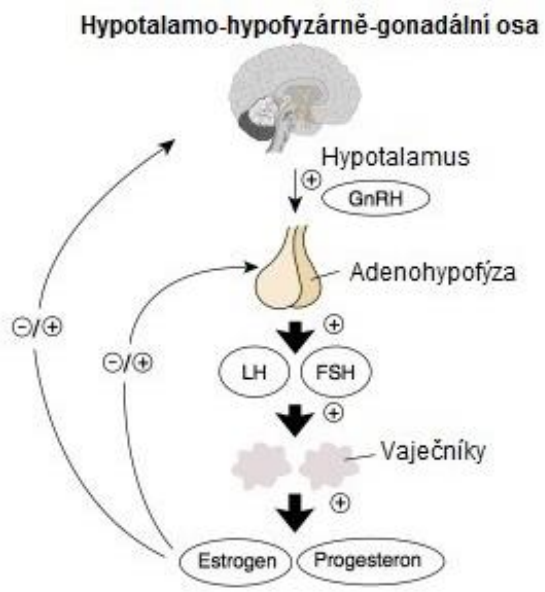
Hypofýza je významná žláza s vnitřní sekrecí a má dvě rozdílné části, adenohypofýzu (přední či žlázový lalok) a neurohypofýzu (zadní či nervový lalok) (Reece, 2011).

Adenohypofýza obsahuje pět různých buněčných typů, které secernují sedm hormonů. Mezi ně patří i gonadotropní buňky, které secernují folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). FSH u samic stimuluje oogenezi (růst a zrání vajíček). LH u samic způsobuje ovulaci a vývoj funkčního žlutého tělíska (Reece, 2011).

Vaječníky tvoří estrogeny a progesteron. Estrogeny vznikají ve vaječníkovém folikulu. Progesteron je tvořen v luteálních buňkách žlutého tělíska (Kudláč et kol., 1987). U všech zvířat estrogeny navodí svým účinkem svolnost k páření. U druhů jako je např.: fena, ovce, prasnice nebo kráva, působí na projevy ochoty k páření synergicky s estrogenem i progesteron (Reece, 2011).

V endometriu sliznice dělohy je vytvářen prostaglandin PGF2α. Z dělohy se dostává krví do vaječníku, kde díky své luteolytické funkci umožňuje dozrávání dalšího folikulu vaječníku. PGF2α navozuje rychlou regresi žlutého tělíska a zastavuje produkci progesteronu (Kudláč et kol., 1987).

Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální systém [obr. 2] představuje uzavřený funkční okruh, který prostřednictvím svých sekretů zajišťuje neustálou vzájemnou informovanost a rovnováhu – homeostázu. Nízká hladina určitého hormonu stimuluje a naopak vysoká hladina hormonu inhibuje činnost nadřazeného orgánu, a tím i produkci jeho hormonů. Vlivem uvolňujícího neurosekretu FSH přicházejícího do adenohypofýzy prostřednictvím portálního cévního systému za spoluúčasti hormonu štítné žlázy je vyvolána v bazofilních buňkách adenohypofýzy tvorba FSH a vlivem uvolňujícího neurosekretu LH v nepatrné míře také tvorba LH, které jsou vyplavovány do krevního oběhu. Na vaječnících dochází k růstu a zrání jednoho nebo více folikulů a v buňkách theca interna folikulu se vytváří hormon (17-β-estradiol), který vyvolává řadu fyziologických vnitřních a vnějších změn, označovaných souhrnně pojmem říje (estrus) a umožňující kopulaci. Vzestupné vylučování a zvyšující se hladina 17-β-estradiolu v krvi prostřednictvím hypotalamu na principu zpětné vazby v hypofýze způsobují snížení produkce FSH a naopak zvýšení tvorby LH. Tím dochází k dozrání folikulu a současně i k přeměně některých folikulárních buněk v buňky luteinové, a tak k nepatrné produkci progesteronu, který stimuluje pomocí hypotalamu tvorbu LH. Po dosažení optimálního poměru mezi FSH a LH dochází k ovulaci. Ovulace nastává asi po 30 hodinách od dosažení nejvyšší hladiny LH (LH peak), který u samic jednotlivých druhů zvířat přetrvává rozdílnou dobu a liší se i kvantitativně. Na místě ovulovaného Graafova folikulu se ihned začíná vytvářet žluté tělísko a jeho luteinové buňky produkují hormon progesteron. Působením progesteronu jsou dovršeny proliferativní změny na pohlavním ústrojí a jsou připraveny podmínky k přijetí oplozeného vajíčka a k jeho dalšímu vývoji. Činnost žlutého tělíska a vnitřní sekrece progesteronu jsou u domácích zvířat ovládány LH. Pokud nedojde k oplození a nevytvářejí-li se v děloze změny vyvolávané vyvíjejícím se embryem, činnost žlutého tělíska je přerušena prostaglandinem F2α a dochází k jeho regresi. Podle principu zpětné vazby prostřednictvím hypotalamu je podněcována v hypofýze tvorba FSH a dochází tak k obnovení pohlavního cyklu (Kudláč et kol. 1987).




Obr. 2: Hypotalomo-hypofyzárně-gonadální osa. [cit. 2016-02-02].
Dostupné z: < https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGD_Lecture_-_Endocrine_Development>.

### 3.2.1 GnRH (Gonadotropin releasing hormon)

Releasing hormony řídí uvolňování LH a FSH z předního laloku hypofýzy. Cévní systém, který spojuje hypotalamus a hypofýzu, se nazývá hypotalamo-hypofyzární portální systém. Kapilárami portální systém začíná i končí. Hypotalamické kapiláry přijímají sekrety z buněk hypotalamu, tzv. gonadotropin releasing hormon (GnHR). GnHR je vytvářen jako odpověď na nízkou hladinu LH a poté následuje zvýšení sekrece LH, podobně je tomu také u FSH (Reece, 2011).

### 3.2.2 Gonadotropiny

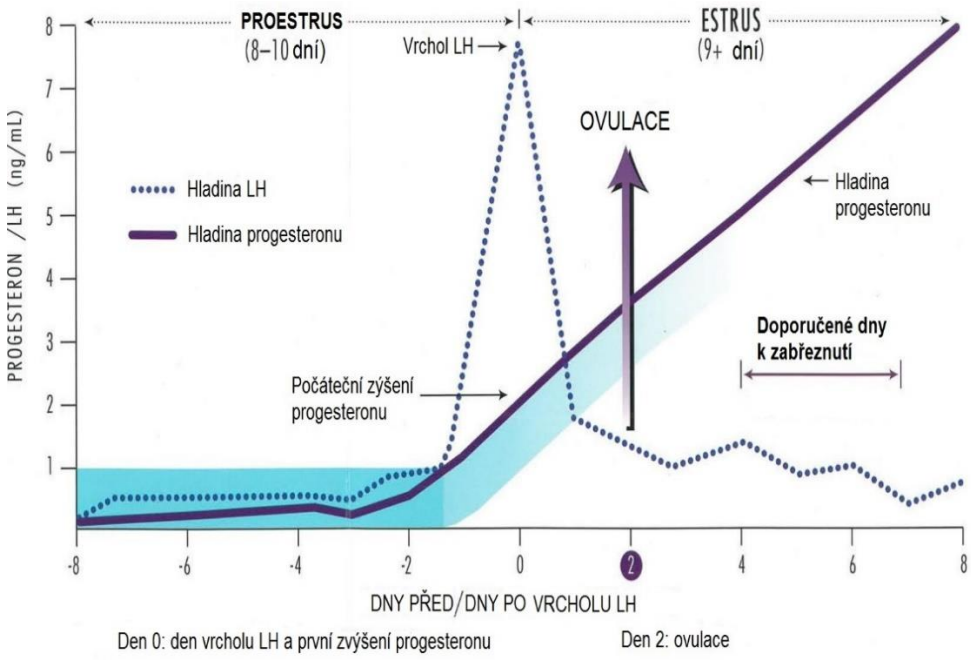
Luteinizační hormon (LH lutropin) a folikulostimulační hormon (FSH – folitropin) jsou společně nazývány gonadotropiny, a to pro jejich úlohy nebo vliv na buňky vaječníků a varlat, tedy uvnitř gonád. FSH a LH jsou hormony produkované buňkami předního laloku hypofýzy (Reece, 2011).

Podněcování růstu folikulů je hlavní funkcí FSH u samic (Reece, 2011).

Nárůst hladiny hormonu LH se označuje jako LH vlna a dochází k ní kolem 24 hodin před ovulací. LH vlna hraje důležitou roli při ovulaci a utváření žlutého tělíska (Reece, 2011).

Koncentrace FSH a LH mají v plazmě neměnnou a tonickou hladinu. Tonické hladiny se mohou zvýšit estrogeny a snížit progesteronem (Reece, 2011). Pulzace gonadotropinů je regulována zvyšující se hladinou estrogenů systémem negativní zpětné vazby (Hošek, 2014).

Obecně platí, že zvyšující se koncentrace estrogenů způsobuje zvýšení citlivosti předního laloku hypofýzy vůči gonadotropinům. Progesteron snižuje citlivost adenohypofýzy vůči GnRH a klesají koncentrace LH a FSH. Tyto vlivy, především u estrogenů, závisí na jejich postupně se zvyšující koncentraci během cyklu. To má za následek vzestup sekrece LH před ovulací. Naopak, pokud je koncentrace estrogenů na základní úrovni a trvá krátce, sekrece LH a FSH je potlačena (Reece, 2011).




Obr. 3: LH vlna v průběhu estrálního cyklu. [cit. 2016-03-11].
Dostupné z: <http://www.lovemypups.com/target_ovualtion_kit.htm>.

### 3.2.3 Estrogeny

Estrogeny u samic produkují vaječníky (granulózními buňkami folikulu), placenta a kůra nadledvin. Nejdůležitějšími a převládajícími estrogeny u samic domácích zvířat je 17β - estradiol a estron, a sice estradiol u nebřezích a estron u březích zvířat. Hlavní funkcí estrogenů je stimulovat buněčnou proliferaci a růst tkání, které mají vztah k reprodukci (Reece, 2011).

Působení estrogenu vyvolává tyto tkáňové odpovědi:

- stimulace růstu žláz endometria
- stimulace růstu vývodných cest mléčné žlázy
- zesílení sekreční aktivity děložních žláz
- navození sexuálního chování
- regulace sekrece luteinizačního hormonu (LH) předním lalokem hypofýzy
- regulované uvolňování PGF2α, uvolňovaného z nebřezí a březí dělohy
- časné spojení epifýz s těly dlouhých kostí, a tím je růst dlouhých kostí zastaven
- tvorba bílkovin
- zahájení epiteliotropní aktivitu (Reece, 2011).

Při říji se projevuje epiteliotropní funkce pochvy, kdy epitel pochvy rohovatí a proliferuje (Reece, 2011).

**Vliv estrogenů na chování feny**

Půl dne až tři dny po vrcholu estradiolu končí proestrus a tím i nástup přístupného chování feny k páření (Concannon, 2011).

**Estrogeny a estrální cyklus**

Koncentrace estradiolu se zvýší během 5 – 20 dnů proestru z před proestrálních hodnot v průměru o 5 pg/ml. Přibližně při 40 až 90 pg/ml koncentrace estradiolu vrcholí, což způsobuje významné vaginální epiteliální rohovatění a proliferaci buněk. Estrus nastupuje současně s klesající hladinou estradiolu (Concannon, 2009). Následné snížení hladiny estrogenů bylo současně pozorováno s vrcholem LH (Concannon et al., 1975).

### 3.2.4 Progesteron

Progesteron se chemicky podobá estrogenům. Je produkován žlutým tělískem ovárií, placentou a kůrou nadledvin a řadí se mezi steroidní hormony (Reece, 2011). Concannon (2011) uvádí, že progesteron u fen je ojediněle silný steroid. Aktivity, které jsou spojené s progesteronem, probíhají často společně s estrogeny. Obvykle vyžaduje předběžné působení estrogenů, které nabudí nebo zcitliví tkáň pro přijetí signálu, který poskytuje hormon progesteron.

Mezi funkce progesteronu se řadí:

- podpora v růstu žláz endometria
- stimulace sekreční aktivity vejcovodu a endometriálních žláz dělohy k poskytnutí výživy pro vyvíjející se embryo před jeho uhnízděním (implantací)
- stimulace růstu alveolů mléčné žlázy
- omezení děložních stahů během březosti (gravidity)
- řízení sekrece gonadotropinů (Reece, 2011).

**Vliv progesteronu na chování feny**

Je zřejmé, že preovulační progesteron hraje důležitou roli v nástupu behaviorálního estru u feny. Při stoupající a vysoké hladině progesteronu fena zůstává po dlouhou dobu vnímavá k páření (Chakraborty et al., 1980). Reece (2011) uvádí že, sekrece progesteronu je nutná pro stádium ochoty k páření, a i když hladina estrogenů klesá, trvá stadium ochoty k páření 7 - 10 dnů.

**Progesteron a estrální cyklus**

Hladina progesteronu v krvi se zvyšuje od LH vlny až do 18 hodin před porodem u gravidních cyklů nebo do 55 – 75 dnů u negravidních cyklů. Progesteron obvykle vrcholí při 15 – 85 ng/ml v 15 – 25 dnech po ovulaci a poté pomalu klesá (Concannon, 2009).

### 3.2.5 Prostaglandiny

Poprvé byly prostaglandiny izolovány z tekutiny přídatných pohlavních žláz a byly nazvány prostaglandiny pro jejich souvislost s prostatou. V dnešní době je známo, že jsou produkovány všemi tělesnými tkáněmi (Reece, 2011).

PGF2α se řadí mezi přírodní luteolytické látky (způsobující regresi žlutého tělíska), které ukončují luteální fázi estrálního cyklu a zahajují nový estrální cyklus, pokud nedošlo k fertilizaci. PGF2α je také částečně účinný při ukončení časné březosti. Okolo 14. dne po ovulaci, pokud nedošlo k zabřeznutí, je PGF2α uvolňován dělohou (Reece, 2011).

## 3.3 Estrální cyklus

Termín „estrální cyklus“ označuje fyziologické změny, jež je možné pozorovat na pohlavních orgánech a v chování u všech samic. Periody se vyskytují v intervalech charakteristických pro daný druh. Jeden interval cyklu je definován jako čas od počátku jednoho cyklu říje (svolnosti k páření) k dalšímu (ovulační interval) (Reece, 2011). Concannon (2009) podobně uvádí, že psí ovariální cyklus představuje „základní“ formu savčí aktivity vaječníků z některé z mnoha adaptací, které se vyvinuly u jiných savců, zvyšuje plodnost nebo se přizpůsobí enviromentálním tlakům.

Říji má fena obvykle dvakrát ročně (Reece, 2011).

Estrální cyklus může být rozdělen na několik stádií podle změn na vaječnících nebo podle chování feny. Proestrus je fáze, která začíná po regresi žlutého tělíska a končí nástupem estru. Rychlý vývoj folikulů během této fáze vede k ovulaci a k nastolení sexuální ochoty. Estrus je doba sexuální ochoty. Na konci říje se obvykle dostavuje ovulace. Časné postovulační období se nazývá metestrus. Je to období, během kterého se začíná vyvíjet žluté tělísko. Jako období nástupu plné luteální aktivity je označován anestrus, který začíná okolo 4. dne po ovulaci a končí regresí žlutého tělíska (Reece, 2011).

Ve folikulární periodě (proestrus a estrus) dominují estrogeny (Reece, 2011).

Z pohledu sexuálního chování zvířat se dají rozlišit na období sexuální ochoty v proestru a estru a období sexuální neochoty, což je luteální perioda, která zahrnuje metestrus a anestrus (Reece, 2011).

Puberta u fen se dostavuje 2 – 3 měsíce po dosažení tělesného rámce dospělých zvířat. V závislosti na plemeni se puberta objevuje mezi 6. a 12. měsícem věku (Reece, 2011).

Fena má neobvykle dlouhou periodu ovariální inaktivity, která se nevztahuje k fotoperiodě nebo k výživě. Proto se někdy označuje za monoestrickou. Estrální cyklus může proběhnout v průběhu celého roku. Od ostatních druhů se stádia estrálního cyklu u feny liší v délce trvání. Proestrus i estrus trvají od 7 do 10 dnů. Diestrus je delší a trvá 70 až 80 dnů (Reece, 2011). Dle Concannona (2009) se opakuje říje v 5 – 12 měsíčních cyklech, anestrus trvá 3 až 10 měsíců, za 1 – 3 týdnů folikulární fáze (proestrus) spontánně vede k preovulační LH vlně, ta odstartuje říji a ovulaci, a poté nastupuje přibližně 2 měsíční luteální fáze.

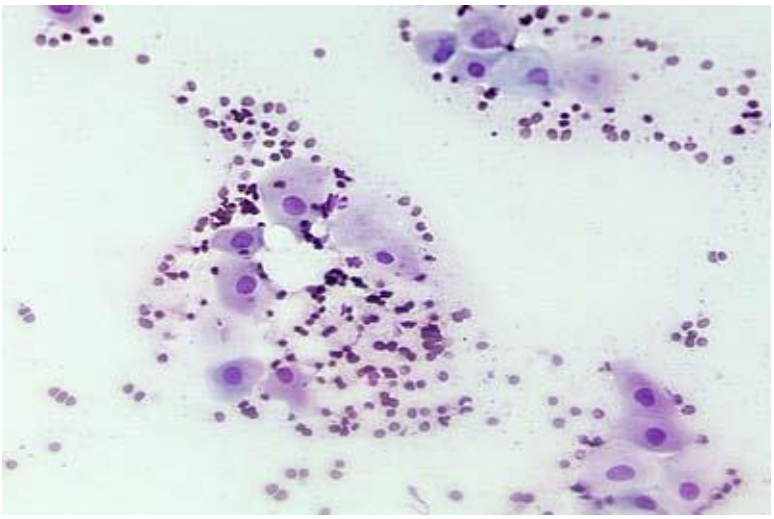
LH vlna se objevuje na konci proestru a v dalších 24 až 48 hodinách následuje ovulace. Během proestru může být fena sexuálně atraktivní pro psy, ale až po LH vlně je ochotná se pářit (Reece, 2011).

### 3.3.1 Proestrus

Dle Groppettiho et al. (2015) je proetrus definován jako období mezi prvním dnem výskytu krvavého výtoku z vulvy až do chvíle těsně před LH vlnou. Hodnoty koncentrace progesteronu v krvi se pohybují pod 2 ng/ml, jsou spojeny s odpovídající vaginální cytologií a charakterizovány přítomností erytrocytů a směsí parabazálních, intermediálních a superficiálních buněk, společně s neutrofily a bakteriemi. Concannon (2011) uvádí, že proestrus nastane, když vnější znaky zvýšené estrogenizace jsou nejprve pozorovány jako otok (edém) vulvy, obvykle doprovázeny výtokem séra a krve z vulvy.

Během proestru fena odrazuje psí pokusy o páření (Concannon et al., 1975).

Endokrinologicky fyziologický proestrus končí preovulační LH vlnou (Concannon, 2011).



Obr. 4: Vaginální cytologie v proestru. [cit. 2016-03-05].
Dostupné z: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cycle.html>.

3.3.1.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v proestru

Proestrus trvá průměrně 9 dní a je charakterizován progresivním zvětšením velikosti vulvy a jejího turgoru, vaginální epiteliální proliferací, rohovatěním epitelu a otokem vulvy, počtem epiteliálních buněk ve vaginálním výtěru a vaginální sekrecí feromonů, která přitahuje samce (Concannon, 2011). Groppetti et al. (2015) uvádí, že během proestru jsou vaginální stěry charakterizovány heterogenní populací epiteliálních buněk, hlavně parabazálních a malých intermediálních buněk, EI (eozinofilní index) ≤ 20%, spolu s erytrocyty, leukocyty a bakteriemi.

Na základě zjištěných buněk lze vypočítat základní cytologické indexy, mezi které patří i eozinofilní index. Eozinofilní index = $\frac{acidofilní\ buňky\ x\ 100}{celkový\ počet\ epiteliálních\ buněk}$

Eozinofilní index dosahuje na vrcholu říje 60 – 100% (Svoboda et kol., 2001).

Před LH vlnou v proestru převažují na vaječnících střední folikuly s nezřetelnými theca vrstvami a velké folikuly se zesílenými granulózními záhyby a širokou dutinou.
Malé folikuly během proestru jsou tvořeny 10 až 14 vrstvami malých a kulatých bazofilních granulozních buněk. V proestru a raném estru se velké folikuly podobají, až na rozměry, středním folikulům v odpovídajících fázích (Groppetti et al., 2015).

V epitelu sliznice pochvy lze ojediněle nalézt neutrofilní granulocyty. Vaginální cytologii dominují polygonální intermediální buňky s jasnými obrazy jader. Cytologický obraz není neměnný a neustále se vyvíjí v závislosti na hormonálních změnách na vaječníku. V raném

proestru vedle intermediálních buněk se zde vyskytuje většinou ještě málo parabazálních buněk, které jsou rozeznatelné. Později v průběhu proestru počet velkých intermediálních jaderných buněk a superficiálních buněk roste a mohou být poprvé detekovány ve vaginálním stěru. V této fázi může ojediněle dojít k oplození (Wehrend et al., 2013).

**Časný proestrus** (1. - 3. den hárání = 4 až 13 dní před ovulací)

Láznička (1994) uvádí, že v časném proestru je vulva feny edematózně zduřela, pevná. Začíná se objevovat zřetelně krvavý (lakově červený) řídký výtok (kapka ve ventrální komisuře – fenka tzv. špiní). Hodnota progesteronu v krvi je 0,4±0,1 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je nulová.

**Střední fáze proestru** (4. - 6. den hárání = 3 až 7 dní před ovulací)

Ve střední fázi proestru Láznička (1994) popisuje zevní pohlavní orgány takto: vulva je edematózně zduřelá a pevná (dvojnásobně zvětšená). Fena má silný krvavý výtok, který je řidší (samovolně odkapává). Hodnota progesteronu v krvi je 0,4 až 0,8 ng/ml. Jen výjimečně dojde k zabřeznutí.

**Pozdní proestrus** (7. - 11. den hárání = 2 až 5 dní před ovulací)

Láznička (1994) popisuje zevní pohlavní orgány, v pozdním proestru, takto: vulva je edematózně zduřelá, poměrně ještě pevná (až dvojnásobně zvětšená). Množství krvavého výtoku se zvolna zmenšuje a výtok získává hlenovitý charakter (samovolně odkapává). Hodnota progesteronu v krvi je 0,7 až 1,2 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je velmi malá.

**Obsah progesteronu a estrogenů během proestru**

Proestrus je charakteristický svou vysokou hladinou estrogenů v krvi. Z bazální hodnoty 5 – 15 pg/ml se estrogeny zvyšují postupně až na hodnoty 45 až 120 pg/ml estradiolu 1 – 3 dny před LH peakem. Hladina LH se díky vysoké hladině estrogenů drží pod 1 ng/ml, ale objevují se pulzy LH v intervalu 60 – 90 min., které dosahují hodnot až 3 ng/ml. V tomto období hladiny LH představují 20 – 50 %, ale hladiny FSH 300 – 600 % anestrálních hodnot (Hošek, 2014).

3.3.1.2 Vliv proestru na chování feny

**Časný proestrus** (1. - 3. den hárání = 4 až 13 dní před ovulací)

Sexuální chování u feny zatím není v tomto období pozorováno, avšak začíná být atraktivní pro psy. Charakteristickým projevem je, že fena odmítá krytí a při pokusu o krytí před psy utíká nebo je napadá. Velmi často se čistí, začíná častěji a slabě močit (Láznička, 1994).

**Střední fáze proestru** (4. - 6. den hárání = 3 až 7 dní před ovulací)

Sexuální chování feny je výrazné, stává se atraktivní pro psy. Fena odmítá krytí, při pokusu o krytí bývá většinou silně agresivní. Je čistotná a často a slabě močí (Láznička, 1994).

**Pozdní proestrus** (7. - 11. den hárání = 2 až 5 dní před ovulací)

V pozdním proestru je sexuální chování u feny výrazné. Fena se stává velmi atraktivní pro psy, avšak stále odmítá krytí. Ke psům je pasivně tolerantní nebo hravá, bývá neklidná, neposlušná (vyhledává psy, láká je „pískáním“, pohyby, pachem). Často se čistí. Fena často a slabě močí (Láznička, 1994).

### 3.3.2 Estrus

Estrus (říje) je doba sexuální ochoty. Ovulace se dostavuje na konci říje, není to však pravidlem (Reece, 2011).

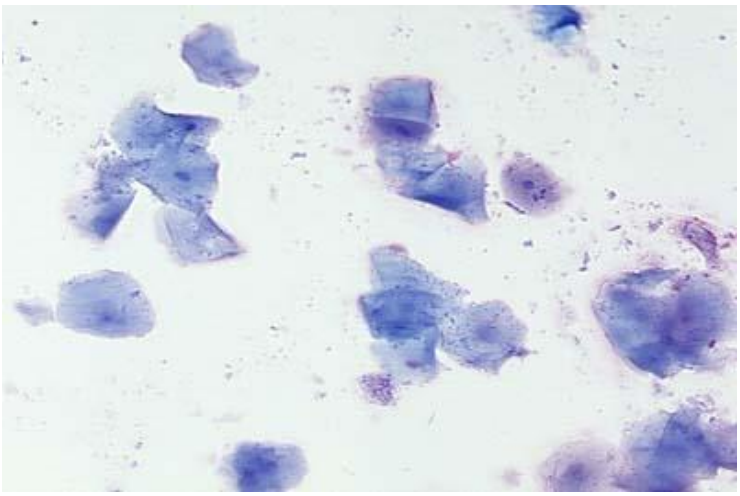
3.3.2.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v estru

Říje u fen nastává v reakci na pokles estradiolu, který obvykle začíná krátce před LH vlnou a pokračuje během celého estru. Počátek estru je usnadněný synergisticky rychlým nárůstem progesteronu plynoucím z LH vlny (Concannon, 2011).

Vzhledem k tomu, že u feny nastává říje, procento keratinizovaných buněk na vaginálním nátěru se zvyšuje, dokud nedojde k vrcholu rohovění, jež se shoduje s koncentrací progesteronu, který je potřebný k dosažení ovulace. V estru nejsou obvykle

přítomny erytrocyty či leukocyty a v cytologických nátěrech bývají jen jejich malé zbytky v porovnání s nátěry z proestru a metestru (Moxon et al., 2010).

Klesající hladina hormonu FSH a estradiolu (relativní pokles z maximálních hodnot) a narůstající hladina progesteronu (0,5 – 0,8 ng/ml, změna poměru E:P) uvolní vzedmutí vlny LH. Tato fáze bývá označována jako nultý den ovulačního cyklu (D0). Hladina LH se zvedá za půl dne až dva dny po dosažení vrcholu hladiny estradiolu, trvá 12 – 35 hodin. LH vlna dosahuje hodnot 3 – 40 ng/ml (v průběhu 13 ng/ml). K ovulaci u feny dochází za 2 – 3 dny po ukončení LH vlny, respektive do 60 hodin. Ovulace se teoreticky dá očekávat za 36 – 72 hodin od detekované vysoké hladiny LH (Hošek, 2014).



Obr. 5: Vaginální cytologie v estru. [cit. 2016-03-05].
Dostupné z: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cycle.html>.

**Časný estrus**

V časném estru se stále ještě vyskytují velké intermediální buňky vedle již velkého množství acidofilních superficiálních buněk s jádrem. V malém počtu se mohou vyskytovat anukleární buňky, případně i erytrocyty. Nejsou zde nalézány leukocyty (Láznička, 1992).

Vulva feny je měkce edematózně zduřelá, ochablejší až povadlá. Množství výtoku se zmenšuje a výtok získává hlenovitý lepkavý charakter. Výtok má barvu bledě rezavohnědou, prosvětlenou až podobnou masové vodě. Hladina progesteronu v krvi se pohybuje od 2 do 4 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je dobrá, může se začít s krytím (Láznička, 1994).

**Vrchol estru**

Ve vrcholném estru dominují až se 100% acidofilní, převážně anukleární superficiální buňky. Tato fáze, která je označována jako maximální zralost poševního epitelu, souvisí se svolností fen k páření. Je to tedy optimální doba k připouštění (popř. inseminaci). V době ovulace dosahují indexy povrchových a eozinolních buněk 90 – 100%, keratinizační index okolo 80%. V úrovni maximálních hodnot je také „karyopyknotický index“ (Láznička, 1992).

$$\text{Karyopyknotický index} = \frac{superficiální\ buňky\ s\ pyknotickým\ jádrem\ a\ bezjaderné\ x\ 100}{buňky\ s\ vezikulárním\ jádrem\ (intermediální)}$$

Na vrcholu říje dosahuje karyopyknotický index 90 – 100% (Svoboda et kol., 2001).

Vrcholný estrus se vyznačuje přítomností superficiálních buněk, většina z nich jsou bezjaderné a pozadí stěru je čisté a jasné. Během říje se erytrocyty mohou nebo nemusí vyskytovat (Post, 1985).

Láznička (1994) uvádí, že vulva je měkce edematózně zduřelá a je „zvadlá a suchá“. Množství výtoku se zmenšuje a výtok se stává hlenovitý až bledě rezavohnědý. Hladina progesteronu v krvi se pohybuje od 4 až do 10 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je vysoká.

**Pozdní estrus**

V pozdním estru dochází v poševním obraze k náhlému poklesu počtu superficiálních buněk (v průběhu 1 – 2 dní). K tomuto poklesu dochází přibližně 6 dní po ovulaci. Opět se mohou objevovat epiteliální buňky nižších vrstev a leukocyty. Tyto buňky mohou tuto změnu předcházet nebo naopak se za ní opožďovat. Nejčastěji je lze pozorovat již 24 – 40 hodin po ovulaci. Obvykle jeden den před touto změnou jsou pozorovány v poševním obraze shluky nebo řetízky buněk s menší zřetelností buněčných okrajů (Láznička, 1992).

V pozdním estru je, podle Lázničky (1994), vulva měkce edematózně zduřelá, „zvadlá“ a mírně se již zmenšuje. Lze pozorovat malé množství hlenovitého výtoku, který má barvu slámově žlutou. Hladina progesteronu v krvi se pohybuje nad 10 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je malá a krytí se nedoporučuje.

3.3.2.2 Vliv estru na chování feny

**Časný estrus** (12. - 14. den hárání = 1 až 3 dny před ovulací)

Sexuální chování u feny je výrazné. Fena je velmi atraktivní pro psy a sama psy vyhledává, tzv. se jim staví. Je svolná k páření, je neklidná a neposlušná. Fena se častěji čistí (Láznička, 1994).

**Vrchol estru** (15. - 20. den hárání = ovulace až 4-5dní po ovulaci)

Sexuální chování u feny je stále výrazné. Fena je velmi atraktivní pro psy a sama psy vyhledává, tzv. se jim staví. Je svolná k páření, je neklidná a neposlušná. Fena se čistí častěji (Láznička, 1994).

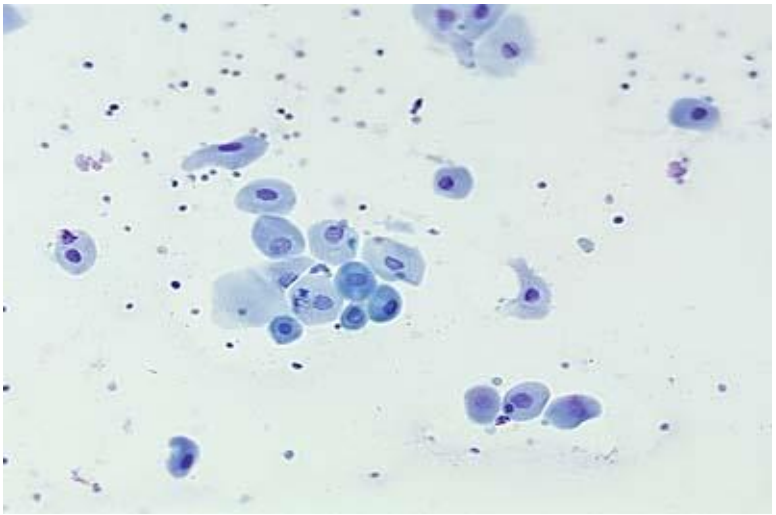
**Pozdní estrus – časný metestrus** (21. - 23. den hárání = 4 až 6 dní po ovulaci)

Sexuální chování je již méně výrazné. Fena je stále atraktivní pro psy. Bývá svolná k páření, ale může být již nervózní až agresivní. A stále se častěji čistí (Láznička, 1994).

### 3.3.3 Metestrus

Reece (2011) označuje metestrus za časné postovulační období, kdy se začíná vyvíjet žluté tělísko.

Termín „diestrus“ je užíván v některých veterinárních textech jako náhrada a synonymum metestru u fen. Napříč druhy se používá termín „diestrus“, který obvykle odkazuje na periodu luteální fáze. Autoři se tak vyhnou mylným názorům, že „metestrus“ se může týkat jen krátké periody po estru, tak jako v popisu cyklu u sudokopytníků a hlodavců (Concannon, 2011).



Obr. 6: Vaginální cytologie v metestru. [cit. 2016-03-05].
Dostupné z: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cycle.html>.

#### 3.3.3.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v metestru

Charakteristické pro první dny metestru jsou velké počty neutrofilů ve vaginálním nátěru a náhlá změna v obrazu buněk v rámci 24 – 48 hodin. Čas náhlé změny obrazu buněk se používá k výpočtu data narození mláďat – ovšem s velkou odchylkou od 51 – 60 dní (Wehrend et al., 2013).

Na počátku metestru převládají v poševním obrazu stále ještě superficiální buňky, avšak jejich počet je již snížen z původního maxima o více jak 20%. Následně začínají poměrně rychle přibývat buňky parabazální a hlavně malé intermediální. Jejich podíl v poševním obrazu se zvyšuje, z počátečních 5% na více než 10%, často více než 50%. Pro nátěr z metestru jsou typické parabazální buňky, tzv. pěnové a metestrální buňky (Láznička, 1992). Naproti tomu Wehrend et al. (2013) ve své publikaci uvádí, že se tyto buňky v metestru vyskytují ojediněle.

Počty leukocytů v prvních 10 dnech metestru rostou, poté opětovně klesají a po 20. dni jejich výskyt zcela zmizí. Se snížením počtu superficiálních buněk souvisí mimo jiné i pokles hodnot indexu povrchových buněk a eozinofilního indexu (Láznička, 1992).

Vulva je stále mírně měkce zduřelá a fena přestává „špinit“ (hlen je čirý). Hladina progesteronu se pohybuje nad 10 až 40 ng/ml. Pravděpodobnost zabřeznutí je nulová (Láznička, 1994).

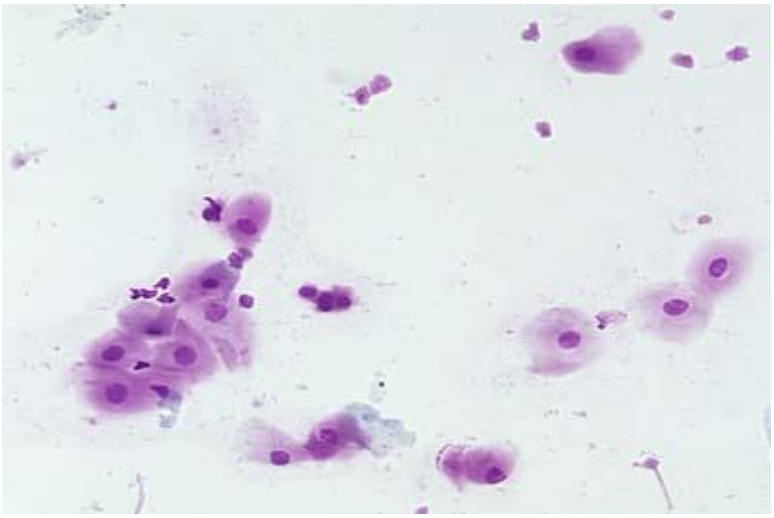
#### 3.3.3.2 Vliv metestru na chování feny

V období metestru je sexuální chování fen nevýrazné, avšak může přetrvávat po první tři dny metestru. Fena ještě bývá částečně atraktivní pro psy, ale odmítá páření (přičemž může být opět až agresivní vůči psům). Chování je již normální (Láznička, 1994).

### 3.3.4 Anestrus

Anestrus je charakterizován základní hodnotou koncentrace krevního progesteronu (< 2 ng/ml) a odpovídající vaginální cytologií charakterizované parabazálními a malými intermediálními buňkami (Groppetti et al., 2015). Celou klidovou fázi pohlavního cyklu provází typicky velmi málo jakýchkoliv buněčných elementů. Ojediněle se mohou nalézat pouze buňky parabazální, intermediární a leukocyty (Láznička, 1992).

Délka časného anestru a středního anestru je definována jako trvající 15 nebo 30 dní. Jako pozdní anestrus se označuje období od konce středního anestru do začátku dalšího proestru (Groppetti et al., 2010).



Obr. 7: Vaginální cytologie v anestru. [cit. 2016-03-05].
Dostupné z: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cycle.html>.

3.3.4.1 Fyziologické změny na vaginálním epitelu u feny v anestru

V anestru je vaginální epitel nízký a zahrnuje jen tři až čtyři vrstvy buněk (Wehrend et al., 2013). Během této fáze jsou obvykle přítomny velmi malé počty buněk (Post, 1985). Ve vaginální cytologii převládají zakulacené až ovoidní parabazální buňky s jejich jasným buněčným jádrem a homogenním obrazem cytoplazmy (Wehrend et al., 2013).

Doba počátku anestru závisí na tom, která kritéria jsou používána k vymezení konce luteální fáze. Nejlepší definice konce luteální fáze může být ta, kdy poprvé dosáhne úroveň koncentrace plasmového progesteronu pod 3 nmol/l. Délka anestru se podstatně liší mezi jednotlivými plemeny psů. Například u kolií interestrální interval trvá 36 týdnů, a u německého ovčáka trvá tento interval jen zhruba 20 – 22 týdnů. Přesto některá psí plemena, jako basenji a tibetský mastif, mají estrální cyklus jednou za rok (Okkens et Kooistra, 2006).

Hladina progesteronu zůstává pod 1ng/ml s minimem okolo 400 pg/ml 30-40 dní před proestrem (Concannon, 2011). Ve stěně děložní probíhají po poklesu progesteronu na nulové hodnoty strukturální a funkční změny, které vracejí dělohu do stadia klidu po předchozí aktivizaci estrogeny a progesteronem (involuce dělohy) (Svoboda et kol., 2001).

3.3.4.2 Vliv estrogenů na změnu epitelu pochvy v anestru

Typické změny v buněčné morfologii jsou způsobeny především přítomností či nepřítomností estrogenu. Estrogeny vedou k proliferaci vaginálního epitelu, takže v anestru má vaginální epitel tři až čtyři vrstvy a v estru asi 20 vrstev epitelu. Podle názoru většiny autorů narůstající vrstvy buněk ochraňují vaginu při eventuálním páření (Wehrend et al., 2013).

## 3.4 Vaginální cytologie

Vaginální cytologie je snadná, rychlá, neinvazivní a levná metoda, která umožňuje identifikovat fáze reprodukčního cyklu u psů a diagnostikovat některé patologické stavy reprodukčního ústrojí (hormonální dysfunkce, zánětlivé a nádorové onemocnění) (Groppetti et al., 2012). Reece (2011) i Kustritz (2006) se shodují, že díky vyhodnocení vaginálního nátěru je možné stanovit fáze estrálního cyklu a určit nejvhodnější období pro připuštění. Ačkoli určení říje pomocí cytologického vyhodnocení vaginálních stěrů u fen se používá více jak 40 let, mnoho aspektů je doposud stále neznámo (Groppetti et al., 2012).

### 3.4.1 Podstata vaginální cytologie

Vaginální cytologie je subjektivní hodnocení epitelu a morfologie buněk. Jsou použity kritéria ke klasifikování buněk do skupin, díky kterým je umožněno určení fází cyklu (Moxon et al., 2010).

Více než u ostatních domácích zvířat jsou u feny vyjádřeny vaginální cytologické změny, které korelují s každou fází estrálního cyklu.

Hlavní cytologické změny na epitelu pochvy jsou:

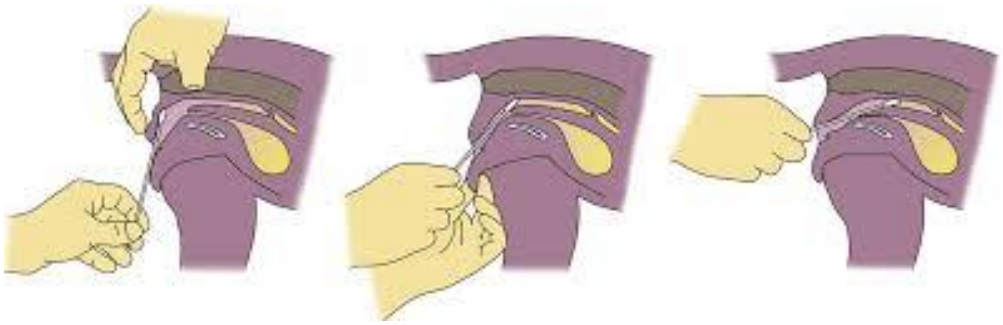
- zesílení a zrohovatění vaginálního epitelu
- vymizení leukocytů způsobené ztluštěním epitelu
- zjištění erytrocytů z vyvíjejícího se cévního (vaskulárního) systému endometria (Reece, 2011).

### 3.4.2 Způsob odebírání vzorků k cytologickému vyšetření

Dle Lázničky (1992) je nejpoužívanější metodou otisk vatovým štětečkem [obr. 8]. Odběr se provádí na stojící feně lehkým převalováním vatového tampónu zvlhčeného fyziologickým roztokem po vyšetřované sliznici. Odběrem vzorku vatovým otiskem dochází k setření hlubších vrstev epitelu, z tohoto důvodu se může stát tento způsob odběru pro feny méně příjemným. Na délku podložního sklíčka se převalováním tampónu ve třech řadách nanáší vzorek buněčného materiálu. Tímto postupem se získá tenký a rovnoměrný nátěr (Láznička, 1992).

Post (1985) popisuje další způsob získání stěru následovně: stěry se získají z vestibula použitím mikroskopického sklíčka. Stydké pysky vulvy jsou zevně masírovány a pak odděleny pomocí palce a ukazováčku. Mikroskopické sklíčko je pozvolna tlačeno na vnější povrch vestibulární sliznice. Stěr je vyroben položením sklíčka na další sklíčko a táhnutím přes povrch druhého sklíčka, které je potom usušeno na vzduchu a nabarveno.

Vzorky se také mohou získávat prostou aspirací poševního obsahu, po výplachu pochvy, stěrem skleněnou tyčinkou nebo zvlhčenou gumovou rukavicí (Svoboda et kol., 2001).



Obr. 8: Odebírání vzorku z poševní sliznice pomocí vatového smotku. [cit. 2016-02-02]. Dostupné z: <http://www.exodusbreeders.com/PDF_Canine/GeneralReproduction/2009CanineReproductionPages.pdf >.

### 3.4.3 Vyhodnocení vzorků vaginální cytologie

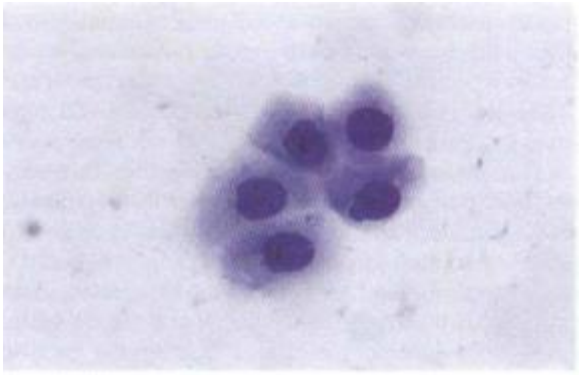
K posouzení kritérií vaginální cytologie patří klasifikování buněk poševní sliznice podle velikosti a tvaru, poměru jádro – cytoplasma, jakož i uspořádání a procentuální rozdělení buněk.

Mimo buněk sliznice jsou zde i erytrocyty a leukocyty (Wehrend et al., 2013). Nejběžnější hlediska jsou: stupeň zrohovatění nejvrchnějších vrstev buněk poševní sliznice, svědčící o fázi estrálního cyklu a výtok z pochvy. Stupeň zrohovatění se mění předvídatelným způsobem během celého estrálního cyklu (Kustritz, 2006).

Byly popsány čtyři typy buněk. Jedná se o parabazální a intermediální buňky (nerohovatějící typy buněk) a superficiální a anukleární dlaždicovité buňky (rohovatějící typy buněk) (Kustritz. 2006). Odlupující se epiteliální buňky byly klasifikovány jako superficiální, intermediální a parabazální buňky (Post, 1985).

**Bazální buňky**

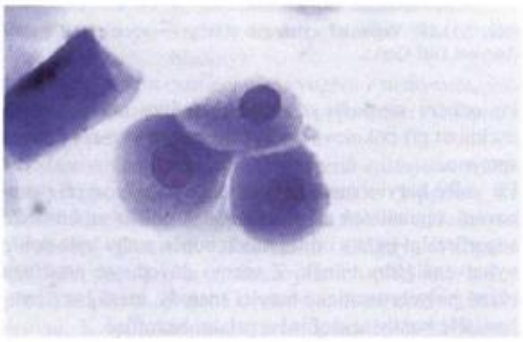
Basofilní bazální buňky jsou 10 – 20 μm velké, jsou kulaté až ovoidní a okrajové jádro ukazuje jasnou strukturu chromatinu (Wehrend et al., 2013).



Obr. 9: Bazální buňky, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)

**Parabazální buňky**

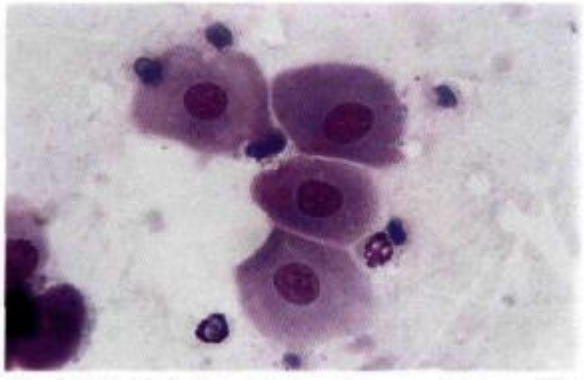
Basofilní, kulaté až ovoidní parabazální buňky, které mají velké jádro a malý obsah cytoplazmy, se podobají svým tvarem a charakterem jádra bazálním buňkám, jsou ale s 15 – 25 μm v průměru o něco větší (Wehrend et al., 2013). Parabazální buňky mají velké vezikulární jádro a jejich cytoplazma je o něco tmavší než cytoplazma u intermediálních a superficiálních buněk (Post, 1985).



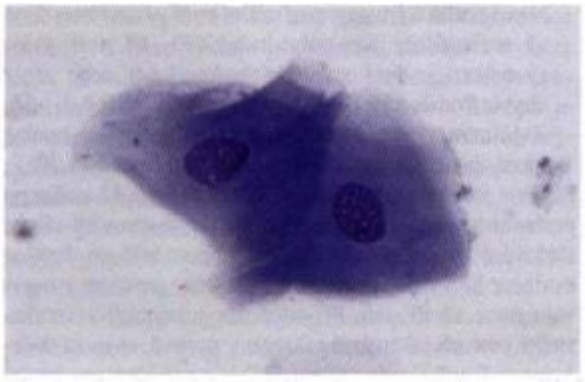
Obr. 10: Parabazální buňky, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)

**Intermediální buňky**

Průměrně velké basofilní intermediální buňky měří 20 – 60 μm, přičemž jak ve velikosti a tvaru se mohou značně lišit (Wehrend et al., 2013). Většinou mají kulatý tvar, ačkoli velké intermediální buňky mohou mít tvar polygonální (Post, 1985). Intermediální buňky jsou dvakrát tak velké ve srovnání s buňkami parabazálními (7 – 11 μm). Mají vezikulární jádro uložené na periferii. Mnozí autoři rozlišují intermediální buňky, v závislost na jejich velikosti, na malé (20 – 30 μm) a velké intermediální buňky (30 – 60 μm) (Wehrend et al., 2013).



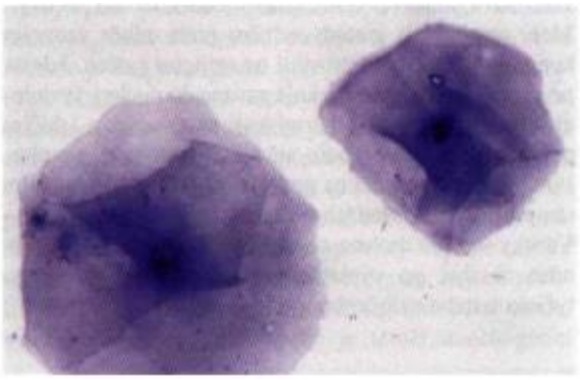
Obr. 11: Malé intermediální buňky, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)



Obr. 12: Velké intermediální buňky, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)

**Superficiální buňky**

Superficiální epitelové buňky mají polygonální tvar. Byly klasifikovány jako anukleární (dlaždicovité), pyknotické a jaderné buňky (Post, 1985). Superficiální buňky patří se svým průměrem od 35 – 60 μm k největším buňkám vaginálního epitelu (Wehrend et al., 2013).

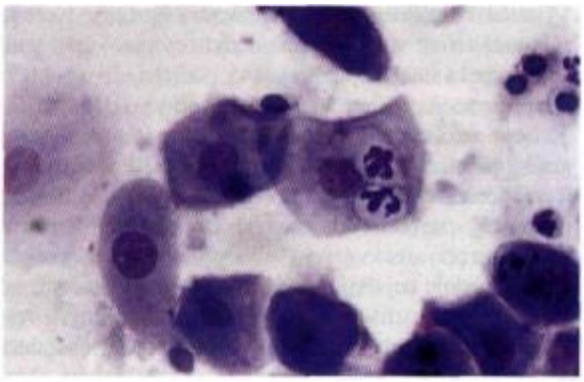


Obr. 13: Superficiální buňky, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)

**Další buňky nacházející se ve vaginálním stěru**

Ve vaginálním stěru se nacházejí mimo jiné i pěnové buňky, metestrální buňky, erytrocyty, neutrofily, stejně jako hlen a nečistoty (Post, 1985).

Pěnové buňky jsou parabazální nebo intermediální buňky s jasnou vakuolou v cytoplasmě, které se dají prokázat jen v metestru (Wehrend et al., 2013).



Obr. 14: Metestrální buňky s leukocyty, barvení Diff – Quik (Svoboda et kol., 2001)

**Erytrocyty**

Erytrocyty se mohou fyziologicky objevovat především v proestru jako následek diapedézy krve, mohou se však ojediněle objevovat až do metestru (Wehrend et al., 2013).

**Neutrofily**

Fyziologicky se neutrofilní granulocyty a lymfocyty vyskytují na začátku metestru a v malém množství v proestru a estru (Wehrend et al., 2013). Někteří autoři popisují neutrofily během celého proestru, ale ne v estru. Jiní autoři popisují neutrofily vždy ve folikulární fázi. V normálním vzorku při vaginální cytologii jsou lymfocyty a eozinofily nalézány vzácně (Groppetti et al., 2012).

Přítomnost neutrofilů ve větším počtu v proestru, estru nebo anestru označuje zánětlivé procesy v urogenitálním traktu (Wehrend et al., 2013). Ve skutečnosti vaginální sliznice není fyziologicky sterilní. U 60% klinicky zdravých psů se vyskytuje vaginální bakteriální populace, která se obvykle skládá z aerobních i anaerobních mikroorganismů, většinou jsou to příležitostné patogeny. Bakteriální druhy izolované od fen, které mají reprodukční poruchu, se významně neliší od zdravých fen. Avšak některé specifické mikroorganismy mohou způsobit neplodnost a infekční onemocnění (Groppetti et al., 2012).

Při posuzování roztěru musí být brán zřetel také na to, že zde mohou být nalézány bakterie. Obzvlášť v proestru a estru jsou dokázány často - a to i u zdravých fen – volné bakterie nebo bakterie v buněčném epitelu (Wehrend et al., 2013).

### 3.4.4 Spolehlivost vyšetření

Na základě jednoduchého provedení a nepatrného množství potřebného vybavení (zrcátko, bavlněné tampóny, podložní sklíčko, barvy, mikroskop) může být exfoliativní vaginální cytologie provedena v každé veterinární praxi. Díky rychlému zjištění výsledku je vaginální cytologie užitečnou součástí gynekologického vyšetření (Wehrend et al., 2013).

Dlouhá perioda estru a nepatrný vztah mezi charakteristickým chováním a dobou ovulace u fen mohou vést k problémům při určování nejvhodnější doby k páření. Páření feny v nevhodnou dobu může vést k podezření z neplodnosti, i když ve skutečnosti žádné problémy neexistují. Vyhodnocení vaginálních epiteliálních buněk cytologickou analýzou lze použít v kombinaci s dalšími diagnostickými prostředky k určení doby ovulace a díky tomu lépe určit optimální dobu pro páření (Moxon et al., 2010).

Pomocí cytologického vyšetření je možné velmi dobře určit začátek říje a případně odhalit patologie. Avšak cytologický obraz bývá často stejný celou dobu vlastního estru a vrchol keratinizace buněk vaginální sliznice se pohybuje v období pět dní před ovulací až jeden den po ovulaci. To znamená, že pokud se nepodaří zachytit období mezi proestrem a estrem, lze jen těžko z jednotlivého vyšetření uprostřed proestru nebo estru odhadnout, kdy bude optimální doba ke krytí. Z těchto důvodů je pro přesné určení optimálního času ke krytí nezbytné další vyšetření – stanovení hladiny progesteronu, eventuálně hladiny LH (Hošek, 2014).

Láznička (1994) uvádí, že ve spojení s řádnými anamnestickými a klinickými údaji může poševní cytologie dosáhnout požadované pozitivní diagnostické významnosti, tj. více než 70%.

# 4 Závěr

Cílem většiny chovatelů fen je odchov štěňat, jehož předpokladem je úspěšné nakrytí feny. Poměrně jednoduchou metodou stanovení plodného období je poševní (vaginální) cytologie. Jedná se o mikroskopické vyšetření stěru poševní sliznice feny.

Poševní cytologie popisuje souvislosti mezi změnami projevujícími se na stavu buněk poševní sliznice a změnami hladin pohlavních hormonů v těle feny během jejího pohlavního cyklu. Je to jedna z nejpoužívanějších metod, která slouží k rozlišení jednotlivých fází cyklu. V závislosti na fázi cyklu se mění charakteristický cytologický obraz poševní sliznice – počet buněk, jejich tvar a také jejich schopnost přijímat barviva. Touto metodou lze rovněž detekovat případné bakteriální infekce, které mohou být příčinou zánětů v pohlavním systému a tím i nezabřeznutí feny.

Výsledky cytologického vyšetření nejsou samy o sobě vždy naprosto přesné a spolehlivé. Proto je vhodné vyšetření epitelu poševní sliznice kombinovat a posuzovat ve spojitosti se zevními příznaky hárání, popřípadě využít stanovení hladiny pohlavního hormonu progesteronu. Výhodné je zejména z ekonomických důvodů zvolit variantu opakovaných vaginálních výtěrů a na základě těchto výsledků provést jednorázový odběr krve za účelem stanovení hladiny progesteronu k upřesnění optimální doby ke krytí i s několikadenním předstihem. Tento postup je výhodný zejména v případě, kdy chovatel je nucen i s fenou cestovat za krycím psem do vzdáleného místa.

# 5 Seznam literatury


Bednář, K., Červený, Č., Kaman, J., Mikyska, E., Najbrt, R., Štarha, O. 1982. Veterinární anatomie 2. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 596 s. ISBN: 07-006-82.

Concannon, P. W. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. Reproduction in Domestic Animals. 44 (2). 3–15.

Concannon, P. W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. Animal Reproduction Science. 124 (3-4). 200-210.

Concannon, P. W., Hansel, W., Visek, W. J. 1975. The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. Biology of Reproduction. 13 (1). 112-121.

Groppetti, D., Aralla, M., Bronzo, V., Bosi, G., Pecile, A., Arrighi, S. 2015. Periovulatory time in the bitch: What's new to know? Comparison between ovarian histology and clinical features. Animal Reproduction Science. 152 (1). 108-116.

Groppetti, D., Pecile, A., Arrighi, S., Di Giancamillo, A., Cremonesi, F. 2010. Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. Theriogenology. 73 (7). 927-941.

Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., Martino, P. A. 2012. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. Theriogenology. 77 (8). 1549-1556.

Hošek, L. 2014. Stanovení luteinizačního hormonu (LH) při časování říje u fen. Veterinářství. 64 (7). 501-506.

Chakraborty, P. K., Panko, W. B., Fletcher, W. S. 1980. Serum hormone concentrations and their relationships to sexual behaviour at the first and second estrous cycles of the labrador bitch. Biology of Reproduction. 22 (2). 227-232.

König, H. E., Liebich, H. G. 2002. Anatomie domácích savců. Hajko a Hajková. Bratislava. 436 s. ISBN: 8088700558.

Kudláč, E., Elečko, J. (eds.). 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 576 s. ISBN: 07-053-87.

Kustritz, M. V. R. 2006. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. Theriogenology. 66 (3). 567-574.

Láznička, A. 1994. Monitorování pohlavního cyklu fen. Veterinářství. 44 (1). 3-4, 45.

Láznička, A. 1992. Poševní cytologie v diagnostice reprodukčních stavů fen: Postgraduální a praktická příručka veterinárního lékaře. Vysoká škola veterinární a farmaceutická. Brno. 45 s. ISBN: není.

Moxon, R., Copley, D., England, G. C. W. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. Theriogenology. 74 (3). 479-485.

Okkens, A. C., Kooistra, H. S. 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. Reproduction in Domestic Animals. 41 (4). 291-296.

Post, K. 1985. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. The Canadien Veterinary Journal. 26 (3). 101-104.

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. 2., rozšířené vydání. Grada. Praha. 473 s. ISBN: 9788024732824.

Svoboda, M., Senior, D. F., Doubek, J., Klimeš, J. (eds.). 2001. Nemoci psa a kočky, 2. díl. Noviko. Brno. 2038 s. ISBN: 902595-3-7.

Wehrend, A., von Plato, K., Goericke-Pesch, S. 2013. Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation. Tierärztliche Praxis Kleintiere. 41 (4). 267-274.