

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra veterinárních disciplín**



**Změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů**  
**prasnic linie MeLiM**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Kristýna Strnadová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr., MUDr. Monika Červinková, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů prasnic linie MeLiM" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. 4. 2016

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Zároveň bych velmi ráda poděkovala své konzultantce RNDr. MUDr. Monice Červinkové, Ph.D., celému týmu laboratoře biologie nádorů ÚŽFG AV ČR v Liběchově a Ing. Lence Tůmové, Ph.D. za jejich přátelský přístup, ochotu a pomocnou ruku.

Velké dík patří také Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za jeho čas, který mi věnoval, za trpělivost při sonografických měřeních a ochotu při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za profesionální přístup a velmi cenné konzultace k morfometrickým měřením.

V neposlední řadě děkuji své rodině, svému příteli a přátelům za všestrannou podporu, kterou mi projevovali po celou dobu studia.

# Změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů prasnic linie MeLiM

## Souhrn

Melanom je nádorové onemocnění, které může kromě kůže napadat i jiné orgány, například oko, gastrointestinální a urogenitální trakt. Pro melanom je charakteristický jeho agresivní průběh a rezistence k terapii. Incidence tohoto onemocnění ve světě stále roste, a to je jedním z důvodů, proč se v současné době zvyšuje i počet studií prováděných na zvířecích modelech, které jsou tímto onemocněním postiženy. Jedním z příkladů vhodného zvířecího modelu pro studium tohoto nádorového onemocnění je linie prasat MeLiM (Melanoma-bearing Libechov Minipigs). U této linie prasat se vyskytuje dědičná forma melanomu. Zvláštností těchto prasat je, že u nich dochází ke kompletní spontánní regresi nádoru obvykle do tří měsíců po narození. Kompletní spontánní regrese nádoru se u člověka objevuje jen velmi vzácně. Byly však objeveny podobnosti v oblasti biochemie a histopatologie mezi melanomem vyskytujícím se u této linie prasat a melanomem postihujícím člověka. Díky těmto podobnostem je zvířecí model MeLiM velmi vhodný k výzkumu nádorového onemocnění.

Zvířecí model MeLiM je v oblasti reprodukce málo popsán. Lze se domnívat, že se u prasnic linie MeLiM s dědičnou formou melanomu vyskytují změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů a dochází k abnormalitám v meiotickém zrání oocytů. Cílem práce bylo zjistit, zda se u prasat linie MeLiM vyskytují změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů a dochází k abnormalitám v meiotickém zrání jejich oocytů.

Potvrdili jsme, že prasata linie MeLiM mají menší reprodukční orgány než běžně chovaná plemena prasat. Na vaječnicích prasnic této linie jsme pozorovali zvýšený počet ovariálních cyst, avšak oocyty získané od těchto prasnic nevykazovaly abnormality v meiotickém zrání, i když počet oocytů, které jsme získali, byl menší.

**Klíčová slova:** prasnice, oocyt, meiotické zrání, MeLiM, morfometrie

# Changes in functional morphology of reproductive organs in MeLiM sows

## Summary

A melanoma is a tumor disease, which can attack besides the skin also other organs, for example eye, gastrointestinal and urogenital tract. Aggressive progression and therapy resistance are characteristic for the melanoma. There is a continuous growth of the incidence of this disease in the world. That is one of the reasons why there is a growth in number of studies conducted on animal models, which are affected by this disease. MeLiM (Melanoma-bearing Libechov Minipigs) is great example of suitable animal model for studying this tumor disease. In these pigs occurs a hereditary melanoma. The peculiarity of this pig strain is, that there is described a complete spontaneous tumor regression usually within three months after birth. Complete spontaneous tumor regression is very rare in humans. However, there were discovered similarities between melanoma occurring in this pig strain and melanoma affecting humans in biochemistry and histopathology. The animal model MeLiM is very suitable for tumor disease research because of these similarities.

Reproduction in the animal model MeLiM is not well understood. It can be assumed, in the MeLiM strain sows with hereditary melanoma occurs changes in the functional morphology of the reproductive organs and there are abnormalities in meiotic maturation of oocytes. The aim of this study was to determine if there are changes in the functional morphology of the reproductive organs in the MeLiM strain sows and if there are abnormalities in meiotic maturation of oocytes.

We confirmed in our study that the reproductive organs in MeLiM strain sows are smaller than the reproductive organs in common strain of pigs described in the publications. On the ovary of sows were observed ovarian cysts, but there were no abnormalities in meiotic maturation of MeLiM oocytes, even when the number of oocytes was smaller.

**Keywords:** sow, oocyte, meiotic maturation, MeLiM, morphometry

# Obsah

1 Úvod.....	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....	10
3 Anatomie reprodukčních orgánů prasnice .....	11
3.1 Vaječník .....	11
3.1.1 Stavba vaječníku .....	12
3.1.2 Ovariální folikuly.....	12
3.1.3 Žluté tělísko .....	12
3.2 Vejcovod .....	13
3.3 Děloha .....	14
3.3.1 Děložní rohy .....	14
3.3.2 Děložní tělo.....	14
3.3.3 Děložní krček.....	14
3.3.4 Stavba děložní stěny .....	15
3.4 Pochva.....	15
3.5 Poševní předsíň .....	15
3.6 Vulva.....	16
3.7 Závěsy a vazy samičího pohlavního aparátu.....	16
4 Fyziologie reprodukčních orgánů prasnice .....	17
4.1 Hormony samičího pohlavního ústrojí.....	17
4.2 Ovulace .....	19
4.3 Vznik a zánik žlutého tělíska .....	19
4.4 Ovariální cyklus .....	20
4.5 Estrální cyklus.....	20

5	Oogeneze a folikulogeneze .....	22
5.1	Primordiální zárodečné buňky .....	22
5.1.1	Přeměna PGC v oogonie a následně v oocyty .....	23
5.2	Folikulogeneze .....	24
5.3	Růst oocyty.....	26
5.4	Zrání oocyty .....	27
5.4.1	Získ meiotické kompetence .....	28
5.4.2	Meiotické zrání .....	29
5.5	Regulace meiotického zrání .....	31
5.5.1	Cyklický adenosin monofosfát - cAMP.....	32
5.5.2	Maturation Promoting Factor - MPF .....	32
5.5.3	Mitogenem aktivovaná protein kináza - MAPK.....	33
5.5.4	Vápník.....	34
5.5.5	Oxid dusnatý .....	34
6	Zvířecí model MeLiM.....	36
6.1	Chov MeLiM miniprasat .....	37
6.2	Melanom .....	37
6.2.1	Spontánní regrese melanomu .....	38
7	Materiál a metody .....	39
8	Výsledky .....	43
8.1	Hodnocení meiotického zrání oocytů.....	43
8.2	Morfometrické a sonografické měření reprodukčních orgánů prasnic .....	45
8.3	Analýza sonografických snímků vaječníků .....	48
8.4	Statistická analýza dat .....	52

9 Diskuze.....	55
10 Závěr .....	59
11 Seznam literatury .....	60



# 1 Úvod

Melanom, nazývaný též maligní melanom či melanoblastom, je nádorové onemocnění, které je popisováno jako nejtěžší forma rakoviny kůže. Melanom je charakteristický svoji agresivitou, rezistencí k terapii a predispozicí k metastázám. Více než 95 % melanomů se vyskytuje na kůži, avšak může postihnout i jiné části těla, jako například oko, gastrointestinální a urogenitální trakt nebo lymfatické uzliny. Ke spontánní regresi melanomu, tedy ke kompletnímu vymizení nádorových buněk bez jakéhokoli terapeutického zásahu, dochází u lidí pouze velmi vzácně. Doposud byla kompletní regrese melanomu pozorována pouze u 40 případů. Částečná regrese melanomu se objevuje častěji, uvádí se v 10 – 35 % všech případů. S přibývajícím počtem lidí v populaci s diagnózou maligního melanomu dochází k intenzivnějšímu studiu nádorů a hledání efektivních technologií jak nádorová onemocnění léčit.

Pro studium tohoto onemocnění a získání nových léčebných technik se v minulých letech začaly hledat vhodné zvířecí modely. Jedním z těchto zvířecích modelů je linie prasat MeLiM (Melanoma-bearing Liběchov Minipigs). U těchto prasat dochází ke kompletní spontánní regresi nádoru bez jakéhokoli terapeutického zásahu v 94 %. Mechanismus, jakým dochází ke kompletní regresi nádoru, však není zcela znám. Výsledky studií ukazují, že zde pravděpodobně hraje roli imunitní odpověď namířená proti buňkám melanomu. Melanomy linie prasat MeLiM vykazují s melanomy vyskytujícími se u lidí podobnosti v oblasti histopatologie a biochemie, což činí tento zvířecí model velmi vhodným ke studiu tohoto onemocnění.

Organismus prasat linie MeLiM, který se na začátku svého života potýká s nádorovým onemocněním a jeho následnou spontánní regresí prochází řadou změn. Proto je zde předpoklad, že by se tato událost mohla promítnout i na reprodukčních orgánech, jejich funkčních vlastnostech a na meiotickém zrání oocytů získaných od takovýchto prasat.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce bylo ověření hypotézy, podle které se u prasnic linie MeLiM s dědičnou formou melanomu vyskytují změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů a dochází k abnormalitám v meiotickém zrání oocytů.

### 3 Anatomie reprodukčních orgánů prasnice

Samičí pohlavní orgány představují ústrojí, které se podílí na reprodukci samičích pohlavních buněk a na vytváření vhodného prostředí pro oplození vajíčka a jeho další vývoj. Pohlavní orgány samice lze rozdělit na orgány pro tvorbu zárodečných buněk a orgány pro jejich odvádění, respektive uchovávání. Samičí pohlavní buňky vznikají ve vaječnicích, samičích pohlavních žlázách. Mezi orgány, které transportují pohlavní buňky od vaječníku a uchovávají je, patří vejcovod a děloha (König *et* Liebich, 2002).

Samičí pohlavní orgány tvoří párové pohlavní žlázy – vaječnice, párové vejcovody, děloha, pochva, poševní předsíň a vulva. Pochva a vulva kaudálně navazují na dělohu a tvoří samičí kopulační orgány (König *et* Liebich, 2002). Kaudální část samičí pohlavní soustavy je uzpůsobena pro přijetí semene. Při vypuzování plodu plní funkci porodních cest (Najbrt *et al.*, 1982).

Vnitřní pohlavní orgány jsou podporovány širokým děložním vazem. Toto ligamentum lze rozlišit na část zvanou *mesovarium*, která podporuje vaječník, *mesosalpinx*, které podporuje vejcovod a *mesometrium* podporující dělohu (Hafez *et* Hafez, 2000).

#### 3.1 Vaječník

V době embryonálního vývoje vzniká vaječník oboustranně z genitálních lišt v bederní oblasti páteře. Dochází k migraci původních pohlavních buněk ze žloutkového váčku, které poté vytvoří tzv. kortikální provazce. Z těchto provazců se dále vyvíjejí jednotlivá stádia oocytů a jejich podpůrných (folikulárních) buněk až do stádia Graafova folikulu, který je ovulován (König *et* Liebich, 2002). Ovulace (uvolnění zralého vajíčka) probíhá na povrchu celého vaječníku (Reece, 2011).

Díky prominujícím folikulům připomíná vaječník prasnice hrozen vína (Hafez *et* Hafez, 2000). Délka vaječníku je 5 cm (Najbrt *et al.*, 1982).

Vaječnice jsou zavěšeny na vlastním okruží - *mesovariu* v dutině břišní za pravou a levou ledvinou (Reece, 2011).

### 3.1.1 Stavba vaječnicku

Na řezu vaječnickem lze pozorovat vnitřní dřev a vnější kůru (König *et* Liebich, 2002). Dřev vaječnicku je tvořena nepravidelně uspořádanou fibroelastickou tkání a rozsáhlým nervovým a cévním systémem, který vstupuje do vaječnicku skrze hilus (Hafez *et* Hafez, 2000).

Kůra tvoří převažující tkáň vaječnicku. Jsou zde přítomny ovariální folikuly a žlutá tělíska v různých stádiích vývoje (Hafez *et* Hafez, 2000). Vnější vrstvu dále obklopuje *tunica albuginea*, na jejímž povrchu se nachází jednovrstevný zárodečný epitel (König *et* Liebich, 2002).

### 3.1.2 Ovariální folikuly

Ovariální folikuly se u zvířat objevují po dosažení pohlavní dospělosti. Jednotlivé folikuly se liší svou velikostí a stupněm diferenciací oocytů uvnitř folikulu. Vajíčko je ve folikulu excentricky přiloženo ke stěně folikulu v místě zvaném *cumulus oophorus*. Je obklopeno vrstvou z jemných fibril, *zonou pellucidou*. Na *zonu pellucidu* přiléhají vrstvy folikulárního epitelu, které se nazývají *corona radiata* (König *et* Liebich, 2002).

König *et* Liebich (2002) rozlišují následující vývojová stádia folikulu - zárodečné, primární, sekundární, terciální a Graafovy folikuly.

Pouze malý počet embryonálně založených folikulů a také oocytů uložených v nich dosahuje stádia Graafova folikulu a ovuluje. Většina folikulů podléhá regresi, atrezii a degeneruje (König *et* Liebich, 2002).

### 3.1.3 Žluté tělísko

Po ovulaci vajíčka dochází k poklesu tlaku uvnitř dutiny a folikulární stěna kolabuje. Zároveň dochází k regresním a proliferacním procesům ve spojení s pučením cév, což vede ke vzniku žlutého tělíska (König *et* Liebich, 2002).

V období od 2. do 8. dne estrálního cyklu u prasnice prudce narůstá hmotnost žlutého tělíska a zvyšuje se i vylučování progesteronu. Do 15. dne, kdy začíná docházet k regresi žlutého tělíska, je relativně konstantní (Hafez *et* Hafez, 2000).

Žlutá tělíska prasnice mají třešňově červenou, světle šedočervenou, nebo krémovou barvu (Najbrt *et al.*, 1982). Jejich průměr je větší než průměr zralého Graafova folikulu (Hafez *et* Hafez, 2000).

Na žlutém tělísku lze pozorovat dvě stádia. Rané (proliferační) a pozdní (vaskularizační) stádium vzniku. Tato stádia jsou někdy nazývána též jako stádium rozkvetu a stádium regrese. Takové žluté tělísko, které tato stádia během estrálního cyklu prodělá, se nazývá *corpus luteum cyclicum*. V případě gravidity, kdy zůstává žluté tělísko aktivní delší dobu, je toto žluté tělísko označováno jako *corpus luteum graviditatis*. Někdy může žluté tělísko přetrvávat i při poruše cyklického průběhu sexuálních procesů, v takovém případě je označováno jako *corpus luteum persistens*. Mimo to může docházet také k cystické degeneraci žlutého tělíška – cysta žlutého tělíška (König *et* Liebich, 2002).

Pokud nedojde k oplození vajíčka, nastává regrese žlutého tělíška. Díky tomuto ději může dojít k dozrání ostatních větších folikulů. K zániku žlutého tělíška dochází působením prostaglandinů (PGF<sub>2α</sub>), které jsou produkovány dělohou (Hafez *et* Hafez, 2000).

## 3.2 Vejcovod

Vejcovod je párovým orgánem, který má úzký lumen a probíhá v kličkách v peritoneálním závěsu, v *mesosalpinx* (König *et* Liebich, 2002).

Sova *et al.* (1981) uvádějí, že délka prasečího vejcovodu je okolo 25 cm. Najbrt *et al.* (1982) uvádějí délku vejcovodu 15 – 30 cm.

Vyústující konec u vaječníku má tvar nálevky (*infundibulum tubae uterinae*), jejíž hlavní funkcí je přijímat ovulované vajíčko. Vnitřní povrch nálevky tvoří slizniční řasy (König *et* Liebich, 2002). Na povrchu je tato sliznice pokryta cylindrickým řasinkovým epitelem (Komárek *et al.*, 1964). Na okrajích nálevky vybíhají slizniční řasy v třásně - *fimbriae tubae* (König *et* Liebich, 2002). Tyto třásně (fimbrie) při ovulaci pomáhají nasměrovat vajíčko do vejcovodu (Reece, 2011).

Další částí vejcovodu je ampule (*ampulla tubae uterinae*), která tvoří mírně rozšířený úsek vejcovodu. V tomto místě dochází k oplození vajíčka. Vajíčko setrvává v ampule po několik dní, poté je transportováno delší, klikatou a úzkou částí vejcovodu – *isthmus tubae uterinae* až k hrotu děložního rohu. Samotný přestup vejcovodu v dělohu je plynulý (König *et* Liebich, 2002).

Vejcovod je vystlán sekrečními a řasinkovými buňkami, které mu umožňují plnit jeho hlavní funkce, jako je vytváření vhodného prostředí pro vajíčko a transport spermií. Při transportu vajíčka a spermií se také zapojuje podélná a kruhová hladká svalovina stěny vejcovodu svými kontrakcemi (Reece, 2011).

### 3.3 Děloha

Prasnice má dvourohou dělohu (*uterus bicornis*), na které lze rozlišit dva děložní rohy (*cornua uteri*), děložní tělo (*corpus uteri*) a děložní krček (*cervix uteri*) (König *et* Liebich, 2002).

Děloha v těle samice plní několik funkcí. Endometrium a jeho sekrety mají hlavní roli v transportu spermií z místa ejakulace do místa oplození, tedy do vejcovodu. Děložní sekrety dále regulují funkci žlutého tělíska a iniciují implantaci, březost a porod (Hafez *et* Hafez, 2000).

#### 3.3.1 Děložní rohy

Děložní rohy prasnice jsou uspořádány v kličkách, podobných kličkám tenkého střeva. Jsou lokalizované v břišní dutině a mají mnohem tužší konzistenci než kličky střeva (König *et* Liebich, 2002).

Dle Komárka *et al.* (1964) je délka děložních rohů prasnice 80 – 140 cm. Schatten *et* Constantinescu (2007) uvádějí délku děložních rohů od 120 cm do 140 cm.

#### 3.3.2 Děložní tělo

Děložní tělo prasnice je krátký úsek pohlavních orgánů o délce 5 cm (Najbrt *et al.*, 1982). Podle Schatten *et* Constantinescu (2007) je délka děložního těla 6 cm. Kraniální úsek děložního těla je u prasnice rozdělen mediálním septem (König *et* Liebich, 2002).

#### 3.3.3 Děložní krček

Děložní krček tvoří silnostěnný a dobře hmatatelný uzávěr dělohy, který se otevírá pouze při říji a během porodu (König *et* Liebich, 2002). Sova *et al.* (1981) uvádějí, že délka děložního krčku je 13 cm, Najbrt *et al.* (1982) naměřili délku 15 – 20 cm.

Krček je tvořen slizničními řasami, které do sebe zapadají. U prasnice mají polštářkovitou podobu (*pulvini cervicales*). K optimálnímu uzávěru cervikálního kanálu přispívá sekret, který je tvořen cervikální sliznicí a tvoří hlenovou zátku (König *et* Liebich, 2002).

Mezi hlavní funkce děložního krčku patří napomáhání transportu spermií skrz hlen do dělohy, funguje jako rezervoár spermií a může hrát roli při selekci životaschopných spermií (Hafez *et* Hafez, 2000).

### 3.3.4 Stavba děložní stěny

Na řezu děložní stěny lze rozlišit tři vrstvy. Slizniční vrstvu (*endometrium*), svalovou vrstvu (*myometrium*) a serózní vrstvu (*perimetrium*). Sliznice, *endometrium*, vystýlá dělohu z vnitřní strany a její tloušťka je závislá na fázi pohlavního cyklu. Na jejím povrchu vyúsťují tubulózní žlázy - *glandulae uterinae*. Na sliznici navazuje dvouvrstevná svalová vrstva, *myometrium*. Vnitřní, silná cirkulární vrstva je od vnější podélné svalové vrstvy oddělena vazivem. Serózní vrstvu na povrchu dělohy pokrývá *tunica serosa* (König *et* Liebich, 2002).

### 3.4 Pochva

Pářící orgány, které slouží k zasunutí pyje při kopulaci, tvoří vlastní pochva, poševní předsín a vulva (Komárek *et al.*, 1964).

Část reprodukční soustavy, která sahá od zevního ústí děložního krčku po vyústění močové trubice, se označuje jako pochva, vagina (König *et* Liebich, 2002). U prasnice dosahuje pochva délky 10 – 20 cm (Najbrt *et al.*, 1982).

Vaginální stěna je tvořena epitelem, svalovinou a serózou. Svalovinu tvoří silná vnitřní kruhová vrstva a tenká vnější podélná vrstva (Hafez *et* Hafez, 2000). Sliznice pochvy je kryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem (Sova *et al.*, 1981).

Hranicí mezi pochvou a poševní předsíní je příčná slizniční řasa – panenská blána, *hymen*. Je zachována pouze u samic, které se dosud nepářily (Komárek *et al.*, 1964).

### 3.5 Poševní předsín

U prasnice je poševní předsín dlouhá asi 6 cm (König *et* Liebich, 2002; Najbrt *et al.*, 1982). Začátek poševní předsíně se nachází u vyústění močové trubice. Pod koncem tohoto vyústění je u prasnice ventrální výduť (*diverticulum suburethrale*). Na sliznici poševní předsíně jsou žlázy, které vylučují sekret napomáhající snižování tření pohlavních orgánů při kopulaci (König *et* Liebich, 2002).

### 3.6 Vulva

Vulvu tvoří z každé strany jeden stydký pysk (*labium vulvae*). Stydké pysky se setkávají v horní a dolní spojce (*commissura labiorum dorsalis et ventralis*). Dorsální komisura prasnice má zaoblenou, ventrální špičatou podobu. Ve ventrální komisuře je umístěn poštváček (*clitoris*), který je schovaný ve *fossa clitoridis* (König et Liebich, 2002). Poštéváček je vývojový zbytkem po základu samčího pyje. Tvoří ho houbovitě těleso houbovitě struktury s hojně inervovanou sliznicí (Komárek et al., 1964).

U prasnice jsou stydké pysky svařené, kožní přívěsek ve ventrální komisuře pysků je zahrocen, šiškovitě protáhlý (König et Liebich, 2002).

### 3.7 Závěsy a vazy samičího pohlavního aparátu

Závěsný aparát je jako celek označován jako široký děložní vaz (*ligamentum latum uteri*), který lze rozdělit na několik částí – *mesovarium*, *mesosalpinx* a *mesometrium*. Mezovariem (závěs vaječníku) procházejí cévy vaječníku. Mezosalpinx (závěs vejcovodu) je rozdělován na *mesovarium proximale et distale*. Prostor mezi *mesovarium distale* a *mesosalpinx* tvoří *bursa ovarica* obklopující vaječník. Na závěsu dělohy (*mesometrium*) jsou připevněny děložní rohy a děložní tělo. Na bázi děložního rohu přestupuje *tunica serosa* z jednoho rohu na druhý a vytváří mezi nimi *ligamentum intercornuale* (König et Liebich, 2002).



## 4 Fyziologie reprodukčních orgánů prasnice

Pro úspěšnou reprodukci je stěžejní výborný zdravotní stav zvířete. Během infekce, při vystavení stresu a narušení vnitřní homeostázy je reprodukční ústrojí prvním systémem v organismu, který přechází do útlumu (Schatten *et* Constantinescu 2007).

Na koordinaci a regulaci funkcí reprodukční soustavy se podílí nervový a endokrinní systém. Nervový systém kontroluje tělesné funkce skrze rychlé, elektrické nervové impulsy. Oproti tomu endokrinní systém využívá chemické posly nebo hormony k regulaci pomalých tělesných procesů jako jsou růst a reprodukce. Mimo hormony endokrinních žláz mají ve fyziologii reprodukčního systému významnou roli také růstové faktory, tedy látky, které kontrolují růst a vývoj orgánů a tkání (Hafez *et* Hafez, 2000).

### 4.1 Hormony samičího pohlavního ústrojí

Mezi základní hormony, které mají významnou roli ve fyziologii v reprodukční soustavě samic, patří gonadotropiny (FSH, LH), estrogeny a progesteron (Reece, 2011). Tyto hormony jsou vylučovány gonádami, které jsou pod hypofyzární kontrolou (Rastogi, 2007).

#### Gonadotropiny

Pojmem gonadotropiny jsou označovány folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Oba tyto hormony jsou secernovány buňkami předního laloku hypofýzy. Hlavní funkcí FSH je u samic růst folikulů na ováriu, LH je důležitý pro ovulaci a luteinizaci granulózy (vznik žlutého tělíska) (Reece, 2011).

Hladiny obou hormonů jsou řízeny negativní zpětnou vazbou z gonád (Reece, 2001) a vykazují mezi sebou antagonistické chování. Jakmile koncentrace LH stoupá, hladina FSH klesá (Rastogi, 2007).

Hypofýza se stává aktivní na začátku puberty a začíná vylučovat FSH. FSH má vliv na ovariální aktivitu a dochází ke stimulaci folikulárního růstu. Folikulární buňky okolo oocyty produkují samičí pohlavní hormony, estrogeny, které podporují růst folikulu a sekundární pohlavní znaky (Rastogi, 2007).

Ke zvyšování hladin hormonů FSH a LH dochází prostřednictvím estrogenů a naopak na snižování hladiny hormonů se podílí progesteron. Uvolňování FSH a LH z předního laloku hypofýzy je řízeno releasing hormony z hypotalamu. Mezi takovýto hormon patří GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon). Zvyšující se koncentrace estrogenů má za následek zvýšení citlivosti předního laloku hypofýzy vůči GnRH. Tato situace vede ke zvýšení uvolňování gonadotropinů. Progesteron snižuje citlivost předního laloku hypofýzy vůči GnRH a tím klesá koncentrace FSH a LH (Reece, 2011).

## **Estrogeny**

Estrogeny,  $17\beta$ -estradiol, estron a estriol mají klíčovou roli v pohlavním vývoji. Estrogeny v těle plní také metabolické a fyziologické funkce, v neposlední řadě mají také vliv na vývoj sekundárních pohlavních znaků samic (Lai *et al.*, 2002).

Jejich hlavní funkcí je stimulace buněčné proliferace a růst tkání, které mají vztah k reprodukci. Nejdůležitějšími a převládajícími estrogeny u samic je  $17\beta$ -estradiol u nebřezích zvířat a estron u březích. Estrogeny vyvolávají tyto tělesné pochody: stimulaci růstu endometriálních žláz, stimulaci růstu vývodných cest mléčné žlázy, zvýšení sekreční aktivity děložních žláz, navození sexuálního chování, regulaci sekrece LH předním lalokem hypofýzy, epiteliotropní aktivitu (při říjí epitel pochvy proliferuje a rohovatí) a další (Reece, 2011).

K syntéze estrogenů u samic dochází ve vaječnicích, v kůře nadledvin a v placentě. Produkci estrogenů potlačuje hladina FSH v těle (Rastogi, 2007).

## **Progesteron**

Progesteron je steroidní hormon, který obvykle vyžaduje předběžné působení estrogenů, což je také označováno jako priming. Estrogeny zcitliví, nebo nabudí tkáň pro přijetí signálu, který poskytuje progesteron. Mezi hlavní funkce progesteronu patří podpora růstu žláz endometria, stimulace sekreční aktivity vejcovodu k poskytnutí výživy pro vyvíjející se embryo před jeho implantací, stimulace růstu alveolů mléčné žlázy, brání děložním stahům během březosti a reguluje sekreci gonadotropinů (Reece, 2011).

Progesteron je syntetizován žlutým tělískem, kůrou nadledvin a placentou. V okamžiku, kdy je vylučován progesteron, přejímá endometriální tkáň sekreční funkci (Rastogi, 2007).

## 4.2 Ovulace

Ovariální folikul se neustále zvětšuje díky množení folikulárních buněk a folikulární tekutiny. Postupně přechází ve zralý, terciální, také označovaný jako Graafův folikul. Oocyty se z folikulů uvolňují prasknutím dozrálých folikulů. Prasknutí folikulu a uvolnění oocyty je označováno jako ovulace a dochází k ní nezávisle na pohlavním aktu, zpravidla v období říje (Sova *et al.*, 1981).

U prasnice dochází k ovulaci na obou vaječnicích a je uvolňováno 14 až 16 vajíček. Při uvolnění oocyty z folikulu do vejcovodu je oocyt pokrytý granulózními buňkami, které jej obklopovaly před ovulací. Tento buněčný obal je označován jako *corona radiata*. Oocyt je do vejcovodu splaven za pomoci třásní vejcovodu (Reece, 2011).

## 4.3 Vznik a zánik žlutého tělíska

Na vaječníku se po ovulaci v místě prasklého folikulu začíná vyvíjet žluté tělísko. Prasklý folikul se nejprve vyplní sraženou krví, buňky folikulární stěny se zmnožují, zvětšují a přeměňují se v luteální buňky. U prasnic se však v těchto buňkách nevyskytuje žluté barvivo (lutein) jako je tomu u jiných hospodářských zvířat (Sova *et al.*, 1981).

Vznik žlutého tělíska je iniciován preovulační vlnou LH a jeho existence je udržována působením LH. K zániku žlutého tělíska dochází v případě, že samice nebyla oplozena. Nebřezí děloha uvolňuje  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , který způsobí regresi žlutého tělíska (Reece, 2011).

Po degeneraci žlutého tělíska zůstává na vaječnicích tzv. jizva, *corpus albicans* (Rastogi, 2007).

## 4.4 Ovariální cyklus

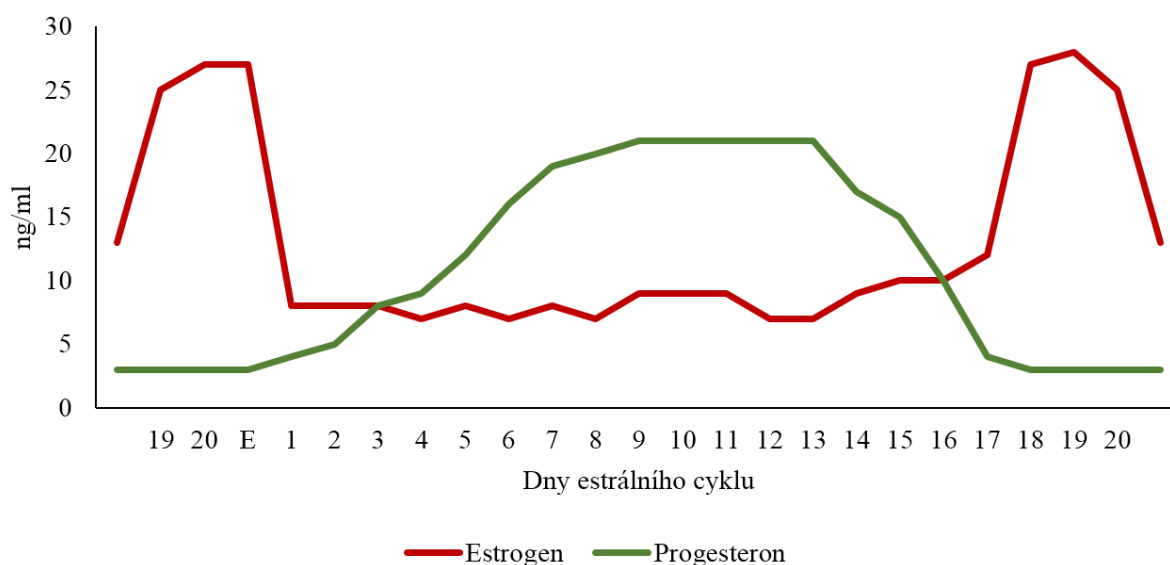
Ovariální cyklus představuje hormonální změny v průběhu cyklu uvnitř vaječníku. Působením  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dochází k luteolýze a regresi žlutého tělíska a sekrece FSH a LH stoupne díky snižování koncentrace progesteronu. LH stimuluje sekreci androgenů buňkami *theca interna* (obalu folikulu) a tyto androgeny difundují do granulózních buněk. FSH stimuluje přeměnu androgenů na estrogeny v granulózních buňkách a tím se koncentrace estrogenů postupně zvyšuje. FSH také stimuluje tvorbu receptorů pro LH na granulózních buňkách. Granulózní buňky tvoří tekutinu, která je bohatá na estrogeny a vytváří dutinu zvanou antrum. Zvyšování hladiny estrogenů spouští uvolnění předovulační vlny LH. Tato vlna podporuje zrání oocytů a má za následek dokončení meiózy do druhé meiotické metafáze. LH vlna také stimuluje intrafolikulární produkci prostaglandinů A a E (PGA a PGE), které se uplatňují při prasknutí folikulu. Dále dochází díky LH vlně k redukci počtu receptorů pro FSH na granulózních buňkách. Tím je minimalizována přeměna androgenů na estrogeny. V určitém okamžiku dojde k ovulaci a zbytek folikulu se přeměňuje na žluté tělísko, které secernuje progesteron, který způsobuje snížení uvolňování FSH a LH z předního laloku hypofýzy. Později podléhá žluté tělísko regresi a produkce progesteronu klesá. Pokles progesteronu má za následek vzestup sekrece FSH a LH a cyklus se opakuje (Reece, 2011).

## 4.5 Estrální cyklus

V okamžiku, kdy samice dospěje do období puberty, vstupuje do svého produktivního života. Puberta je tedy období, kdy je zahájen reprodukční cyklus, někdy též označován jako estrální cyklus, který umožňuje samici příležitost k zabřeznutí. Estrální cyklus může ovlivnit mnoho faktorů jako je roční období, výživa, laktace, nebo zdravotní stav. Lze ho rozdělit na luteální a folikulární fázi. U prasnic s běžnou délkou cyklu 21 dní, trvá luteální fáze od prvního dne cyklu do 18. dne. V této fázi dochází k luteinizaci folikulu a následně k regresi žlutého tělíska v případě, že nedošlo k zabřeznutí prasnice. Jako folikulární fáze je označováno období od 18. do 21. dne estrálního cyklu, kdy dochází k recruitmentu („verbování“), vývoji a ovulaci nových folikulů. Folikulární fáze se dále rozděluje do čtyřech období, estru, metestru, diestru a proestru.

V období estru (21. den cyklu) je samice svolná k páření, hladina estradiolu ( $E_2$ ) dosahuje svého vrcholu a dochází k ovulaci. Po estru následuje metestrus (1. až 5. den při 21 denním cyklu), kdy klesá hladina estradiolu a naopak stoupá hladina progesteronu ( $P_4$ ) díky formování žlutého tělíska na vaječnku. V diestru (6. – 18. den) dosahuje hladina  $P_4$  svého vrcholu a hladina  $E_2$  své minimální koncentrace. V případě, že nedošlo k zabřeznutí, nastává proestrus. Pro období proestrus (18. až 21. den) je typický pokles hladiny  $P_4$  a vzestup hladiny  $E_2$ . Díky tomu dochází k formování nové kohorty folikulů, které budou ovulovat během období estru (Schatten *et* Constantinescu, 2007).

**Obrázek č. 1 Hladiny estrogenu a progesteronu během estrálního cyklu prasnic**



Kolísání hladin estrogenu ( $E_2$ ) a progesteronu ( $P_4$ ) v průběhu estrálního cyklu prasnic. E – doba estru.

## 5 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces, při kterém vznikají samičí pohlavní buňky, oocyty. Oocyty se vyvíjejí v ovariálních folikulech, funkční jednotce samičího reprodukčního systému, kde prochází celou řadou morfogenetických změn (Coticchio *et al.*, 2013). U prasat, podobně jako u primátů a dobytka, začíná oogeneze velmi časně a to již v prenatálním období (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Oogeneze začíná formováním primordiálních zárodečných buněk (Primordial Germ Cells - PGC) a pokračuje řadou jejich dalších buněčných přeměn (Wassarman *et Albertini*, 1994). Primordiální zárodečné buňky, prekursor oocyty, mají vysokou pohyblivost a jsou schopny odpovědět na chemotaxické stimuly, které jim umožňují migrovat. Migrují z místa svého původu do embryonálního epiblastu, genitální lišty (Picton *et al.*, 1998). V oblasti genitální lišty je možné primordiální zárodečné buňky u prasečího embrya pozorovat již 18 dní po páření (Black *et Erickson*, 1986).

Díky proliferaci primordiálních zárodečných buněk se z nich postupně stávají oogonie (fetální období), oogonie se dále přeměňují na oocyty (ve fetálním období) a z oocytů se v konečné fázi stávají neoplozená vajíčka (pohlavní dospělost) (Wassarman *et Albertini*, 1994).

### 5.1 Primordiální zárodečné buňky

Primordiální zárodečné buňky mají extraembryonální původ (Wassarman *et Albertini*, 1994; Vanderhyden, 2002). U savců jsou zárodečné buňky uloženy mimo gonády a poté migrují přímo do gonád, kde se diferencují do pohlavně specifických zárodečných buněk. Nicméně mechanismus migrace a proliferace primordiálních zárodečných buněk je zatím málo objasněn (Vanderhyden, 2002). Počet primordiálních zárodečných buněk markantně stoupá. Po 20. dni po páření se jejich počet pohybuje okolo 5 000 buněk, 50. den po páření se jejich počet pohybuje okolo 1 100 000 (Hunter, 2000).

Jakmile jsou gonády tvořeny somatickými a zárodečnými buňkami, začne se populace zárodečných buněk diferencovat a proliferovat. Na začátku mají PGC potenciál zahájit jak oogenezi, tak i spermatogenezi. O tom, v jaké buňky se budou dále diferencovat, rozhoduje gonadální prostředí (Voronina *et Wessel*, 2003).

Je známo, že existují látky, které jsou důležité pro migrační dráhu. Jedná se o složky extracelulární matrix a cytokiny. Bylo zjištěno, že dochází k určitým změnám v rozdělení tří glykoproteinů extracelulární matrix (kolagen IV, fibronectin a laminin) během migrace primordiálních zárodečných buněk. V průběhu migrace primordiální zárodečné buňky různě mění jejich sílu adheze ke každému z glykoproteinů. Další důležitou roli v proliferaci a přežití primordiálních zárodečných buněk hrají cytokiny (Vanderhyden, 2002).

### 5.1.1 Přeměna PGC v oogonie a následně v oocyty

Kolonizace PGC v genitálních lištách a následující formování primordiálních folikulů jsou nezbytné pro další přežití zárodečných buněk. Po kolonizaci genitálních lišt se zárodečné buňky nazývají oogonie (Vanderhyden, 2002). Oogonie vykazují charakteristickou morfologii, zahrnující přítomnost mezibuněčných mostů spojující sousedící zárodečné buňky, a vysokou frekvenci mitotického dělení (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Kromě již zmíněných oogonií se zde objevují také somatické buňky, které podporují následující vývoj oogonií. Tyto pregranulózní buňky se zde objeví z epiteliálních buněk, které se vchlípí do genitální lišty. Oogonie se postupně začnou asociovat s pregranulózními buňkami, což později vede k vývoji primordiálních folikulů. Každý primordiální folikul obsahuje jeden oocyt obalený v jedné vrstvě zploštělých pregranulózních buněk (Vanderhyden, 2002). U prasat se na ováriích fétu začínají formovat folikuly od 56. dne po páření (Bielanska-Osuchowska, 2006).

Jakmile je kolonizace kompletní, oogonie zahájí meiózu (Vanderhyden, 2002). Wassarman *et* Albertini (1994) se domnívají, že spuštění meiózy je zapříčiněno faktorem pocházejícím z *rete* ovarii nebo samotným kontaktem s *rete* ovarii. Zárodečné buňky se po tomto kroku nazývají oocyty (Vanderhyden, 2002). Savčí oocyty prochází fází leptotene, zygotene a pachytene první meiotické profáze a následně se zastaví ve stádiu diplotene (Picton *et al.*, 1998). Oocyty zůstávají v tomto stádiu až do doby, než budou plně dorostlé a dostanou signál k ovulaci (Vanderhyden, 2002). Oocyt savců může zůstat pozastaven ve stádiu diplotene první meiotické profáze i po několik desítek let (Picton *et al.*, 1998). Oocyty ve stádiu diplotene jsou větší než oogonie, mají více organel a procházejí genetickou rekombinací maternální a paternální DNA (Picton *et al.*, 1998). V tomto období dochází také k poklesu oogonií a ke ztrátě až 70 % zárodečných buněk v důsledku apoptózy. Ukázalo se, že smrt oogonií indukují například TGF-beta1, TGF-beta2 a Fas ligandy. Také se ukázalo, že absence pro-apoptotického faktoru Bax může potlačit apoptózu (Vanderhyden, 2002).

Po narození jedince zahájí oocyt svůj růst. Začátek růstu oocytu je zřejmě řízen vaječníky. Oocyt a jeho obklopující folikul rostou koordinovaně a postupují skrze řadu morfologických stádií. Růst probíhá nepřetržitě a končí buď ovulací zralého oocytu (neoplozené vajíčko) nebo degenerací (atrézií) oocytu a jeho folikulu (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Každý oocyt je umístěn ve svém buněčném folikulu, který roste současně s oocytem, od jedné vrstvy několika zploštěných buněk do několika vrstev kubických granulóznic buněk. Mezitím oocyt dokončuje svůj růst (Wassaman *et* Alberitini, 1994). Zvětšující se objem oocytu ve folikulu je důsledkem narůstajícího počtu buněčných příměsí (lipidové kapky, vakuoly a žlutkové inkluze) (Bielanska-Osuchowska, 2006). Když oocyt dosáhne konstantní velikosti, folikulární buňky procházejí rychlým dělením, které čítá více než 50 000 buněk a výsledkem je Graafův folikul (též nazýván jako antrální folikul, či terciální folikul). Oocyt zaujímá acentrickou pozici a je obklopen dvěma a více vrstvami granulóznic buněk. Vrstva granulóznic buněk, která je nejvnitřnější dostává cylindrický tvar a stává se *coronou radiatou*. Tyto buňky tvoří specializované mezibuněčné spoje (zvané gap junctions) s oolémou (Wassarman *et* Albertini, 1994).

U pohlavně dospělé samice plně dorostlé oocyty v Graafově folikulu pokračují v meióze a dokončují první meiotické redukční dělení těsně před ovulací. Oocyty procházejí jaderným vývojem z diplotene profáze I do metafáze II. V této fázi zůstávají ve vejcovodu až do doby stimulace ke kompletní meióze, ke které dochází při oplodnění nebo při partenogenetické aktivaci (Wassarman *et* Albertini, 1994).

## 5.2 Folikulogeneze

Folikulogeneze je proces zrání ovariálního folikulu. Folikul je součástí ovária a umožňuje mu plnit jeho dvě hlavní funkce v organismu, gametogenezi a steroidogenezi (Hafez *et* Hafez, 2000).

Při narození jsou u samic většiny savců na vaječnicích přítomny převážně primordiální folikuly. Každý z těchto folikulů obsahuje primární oocyt, který má zastavené meiotické zrání a je obklopen jednou vrstvou zploštělých pregranulóznic buněk. Během reprodukčního života se ze základny primordiálních folikulů vyvíjejí dominantní folikuly (Vanderhyden, 2002).



Folikulární vývoj je morfologicky charakterizován zvětšením průměru oocytů, synchronní proliferací granulózních buněk a výsledným zmnožením vrstev buněk, které obklopují každý oocyt. Vývoj folikulů zahrnuje recruitment primordiálních folikulů ze zásoby, následný růst folikulů, selekci dominantního folikulu, ovulaci a luteinizaci. Rostoucí folikuly podporují růst oocytu, jeho dosažení meiotické a vývojové kompetence. Granulózní buňky mají také své ustálené funkce, které spočívají v podpoře růstu oocytu a udržování zastavené meiózy (Vanderhyden, 2002). V minulosti byl oocyt považován pouze za pasivního příjemce vývojových signálů, které k němu byly vysílány granulózními buňkami. Podle Eppiga (2001) je komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami obousměrná.

Signalizační faktory, které si vyměňují granulózní buňky a oocyt se zdají být nepostradatelné pro navození a regulaci diferenciacie folikulu ze specifického vývojového stádia do dalšího stádia a tudíž pro vývoj oocytu, který bude kompetentní pro fertilizaci a následnou embryogenezi (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

Zpočátku je folikulární růst charakterizován přechodem granulózních buněk ze zploštělých na kubické. Pokračující růst má za úkol zvětšit průměr oocytu a zvýšit proliferaci granulózních buněk. Během prenatálního růstu folikulu, se buňky théky začínají spojovat s rostoucím folikulem, ačkoli zůstávají oddělené bazální membránou (Vanderhyden, 2002).

Buňky granulózy preantrálního folikulu jsou relativně homogenní proliferující buňky, které získávají receptory pro folikulostimulační hormon (FSH) a steroidní hormony. Pod vlivem FSH spustí granulózní buňky sekreci cyklinu D2 a folikul pokračuje v růstu. Přechod v antrální (Graafův) folikul je spojován s formováním dutiny naplněné tekutinou a s diferenciací granulózních buněk do dvou subpopulací: kumulární granulózní buňky (ty, které jsou nejvíce spojeny s oocytem a jsou s oocytem také ovulovány) a murální granulózní buňky (ty získávají odlišné funkce - zahrnují steroidogenezi a receptory pro expresi luteinizačního hormonu - LH (Vanderhyden, 2002). Dozrálý Graafův folikul obsahuje ve své stěně také thékální buňky, které tvoří vnitřní thékální vrstvu (*theca folliculi interna*) a zevní thékální vrstvu (*theca folliculi externa*). *Theca folliculi interna* je místem, kde dochází k syntéze androgenů. *Theca folliculi externa* obsahuje kolagen a hraje roli při prasknutí folikulu během ovulace (Coticchio *et al.*, 2013).

Růst, zrání, ovulace a luteinizace Graafova folikulu závisí na dostatečných koncentracích a adekvátních poměrech FSH a LH v séru. FSH má prioritní úlohu v iniciaci formování antra. Tento gonadotropin stimuluje mitózu granulóznic buněk a formování folikulární tekutiny. Dále FSH vyvolává senzitivitu granulóznic buněk na LH zvýšením počtu LH receptorů. LH receptory u prasnic vzrůstají z 300 (v malých folikulech) na 10 000 ve velkých preovulačních folikulech. Takovéto navýšení LH receptorů připravuje granulózní buňky na luteinizaci (Hafez *et* Hafez, 2000).

V případě nedostatečnosti FSH nebo přirozeným procesem folikulární selekce, některé folikuly, které začaly svůj růst, nedosáhnou ovulace a podléhají apoptóze nebo atrézii. V podstatě více než 99,9 % ovariálních folikulů, které jsou přítomny při narození díky folikulární atrézii, nikdy nedosáhnou ovulace. Tento proces je regulován endokrinními faktory, zejména FSH a LH a tyto signály jsou zprostředkované vaječníky pomocí různých parakrinních faktorů (Vanderhyden, 2002).

### 5.3 Růst oocyty

Současně s folikulárním recruitmentem (nábořem) oocyt vstupuje do fáze růstu, kde zvětšuje svůj objem, prochází replikací a reorganizuje organely v cytoplazmě. Tyto modifikace zahrnují vznik *zona pellucida*, intenzivní syntézu RNA a akumulaci molekul pro následnou embryogenezi (Picton *et al.*, 1998).

Jedna z nejnápadnějších změn, ke kterým dochází v oocyty během růstové fáze je jeho sekrece glykoproteinové membrány, *zona pellucida* (ZP). *Zona pellucida* utváří ochranný obal okolo oocyty a skládá se ze tří glykoproteinů, ZP1, ZP2 a ZP3. Přičemž exprese ZP2 se objevuje pouze v primordiálních folikulech. Tyto proteiny *zona pellucida* jsou nezbytné pro normální folikulární vývoj (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

V průběhu reprodukčního života savců ovária obsahují množství nerostoucích a rostoucích oocytů zastavených ve stadiu diplotene první meiotické profáze. Recruitment (nábor) oocytů je řízen gonadotropiny z hypofýzy. Obrovské zvětšení buněk oocyty svědčí o období intenzivní metabolické aktivity, která se odráží na změnách ultrastruktury oocyty - biogeneze některých nových organel. Například kortikální granula a *zona pellucida*, které jsou zapojeny v regulaci oplození, vznikají v oocyty během jejich růstové fáze jako první (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Během růstové fáze oocyty dramaticky vzrůstá počet mitochondriálních kopií a organely se stávají více vakualizované. Kromě vzrůstajícího počtu mitochondrií vzrůstá také počet ribosomů. Dále se s růstem oocyty také zvyšuje množství pórů v jaderné membráně a kolem jádérka se utváří chromatin, který je známkou dosažení zralosti. Na konci růstové fáze a těsně před meiotickým zráním oocyty je jádro charakteristicky velké a označuje se jako zárodečný váček (GV = Germinal Vesicle) (Picton *et al.*, 1998).

## 5.4 Zrání oocyty

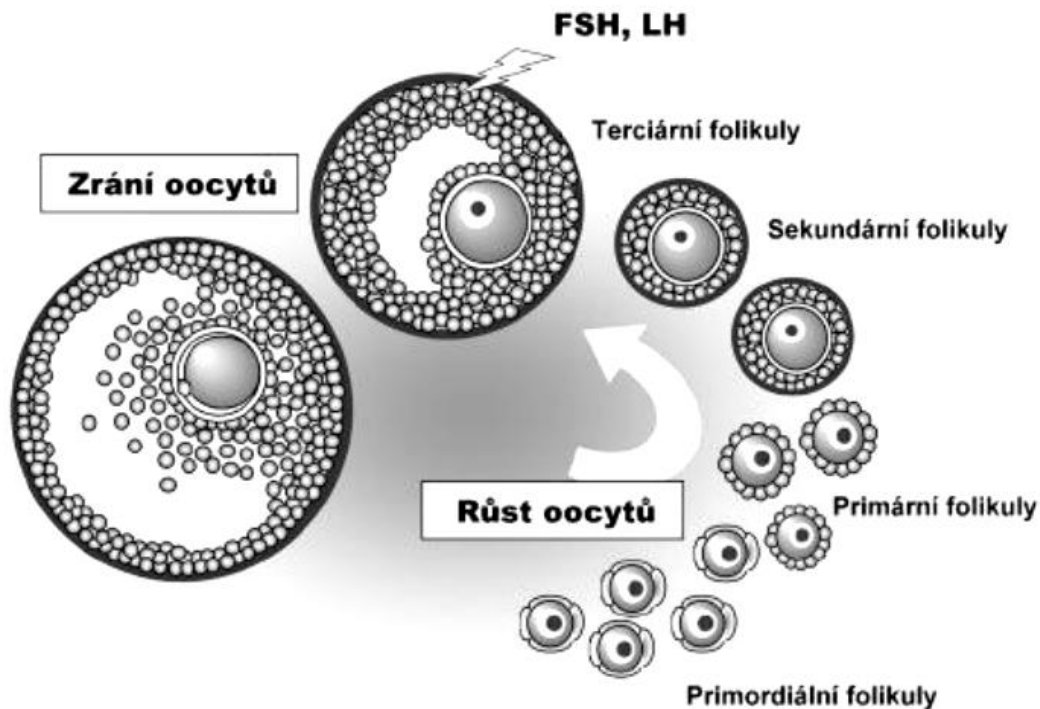
Zrání oocyty je komplexní proces, který zahrnuje jaderné a cytoplasmatické zrání. Jaderné zrání spočívá v chromozomální segregaci a cytoplasmatické zrání zahrnuje reorganizaci cytoplasmatických organel, transkripci mRNA a skladování proteinu (tyto proteiny jsou poté využity při oplození a v období časného embryonálního vývoje) (Landim-Alvarenga *et Maziero*, 2014). Při jaderném a cytoplasmatickém zrání hraje také důležitou roli folikulární tekutina, která se účastní fyziologických, biochemických a metabolických procesů (Hafez *et Hafez*, 2000).

Mechanismus zrání oocyty v *in vivo* a *in vitro* podmínkách zatím stále není kompletně popsán. Nicméně je všeobecně známo, že rozhodující roli při udržování meiotického bloku u savčích oocytů má cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Vzestup hladiny cAMP uvnitř oocyty je nezbytný k udržení blokace meiotického zrání. Naopak při poklesu koncentrace cAMP v oocyty dochází k obnovení meiózy. Tato koncentrace cAMP v oocyty je regulována rovnováhou dvou typů enzymů, adenylát cyklázou (AC) a fosfodiesterázami (PDEs), které jsou zodpovědné za syntézu a degradaci cAMP (Landim-Alvarenga *et Maziero*, 2014).

V rostoucích a dominantních folikulech oocyty zůstávají zastaveny ve stádiu diplotene meiotické profáze. *In vivo* je obnovení meiózy zahájeno předovulační vlnou LH, která se objevuje pouze u plně dorostlých, meioticky kompetentních oocytů z dominantních (předovulačních) folikulů. Před a během LH vlny je oocyt obklopen kompaktní kumulární vrstvou. Během období mezi LH vlnou a ovulací oocyt prochází řadou výrazných změn a to nejen v jeho jádře, ale také v cytoplazmě (Van den Hurk *et Zhao*, 2005).

Pro dosažení dobré kvality prasečích oocytů a jejich schopnosti produkovat životaschopné potomstvo je zásadní kompletní naprogramování oocyty ještě před jeho opuštěním ovariálního folikulu. Takovéto naprogramování zahrnuje i jaderné a cytoplasmatické zrání (Hunter, 2000).

Obrázek č. 2 Schématické znázornění růstu a zrání oocyty.



Růst a vývoj oocyty je úzce spojen s folikulárním vývojem. V době, kdy začínají růst primordiální folikuly, rostou i oocyty. Ve stádiu terciálního folikulu oocyt odpovídá na stimulaci LH a FSH. S předovulační vlnou LH začíná zrání oocyty. Převzato z Miyano (2005).

#### 5.4.1 Zisk meiotické kompetence

Meiotická kompetence je schopnost rostoucího oocyty pokračovat v meiotickém dělení a dokončit jej. Oocyt získává meiotickou kompetenci obvykle během období formování antra (Vanderhyden, 2002). Objevuje se tedy v době, kdy oocyt doroste 80 % konečné velikosti (Thibault *et al.*, 1987).

Na meiotickou kompetenci má vliv velikost oocyty. Oocyt prasete o vnitřním průměru 110  $\mu\text{m}$  je pouze částečně kompetentní. Většina takovýchto oocytů zastaví své zrání ve stádiu metafáze I (Sedmíková *et al.*, 2003). Plně dorostlé oocyty, které mají průměr 120  $\mu\text{m}$ , jsou zcela meioticky kompetentní (Motlík *et al.*, 1984). U prasat dosahuje oocyt meiotické kompetence ve folikulu, který dosahuje průměru 3 mm a více (Marchal *et al.*, 2002).

## 5.4.2 Meiotické zrání

Meiotické zrání oocyty spočívá v přeměně plně dorostlých oocytů přítomných v Graafových folikulech do neoploďných vajíček, které se nacházejí těsně před ovulací. Tento proces je doprovázen předovulační vlnou gonadotropinů (folikulostimulační hormon - FSH a luteinizační hormon - LH). Meióza nikdy nepokračuje, bez toho aniž by došlo k této předovulační vlně. Vylučování gonadotropinů při ovulaci má také za úkol potlačit produkci faktorů inhibujících meiózu, které jsou produkovány granulózními buňkami (Hafez *et* Hafez, 2000). Výsledkem LH vlny je eliminace jedné nebo více inhibujících látek jako je například OMI (Oocyte Maturation Inhibitor). Eliminace těchto inhibujících látek dále vede k aktivaci cyklínů, fosfatáz a kináz, které jsou potřebné pro dosažení jaderného zrání (Hunter, 2000).

Meiotické zrání je charakterizováno rozpadem jaderné membrány oocyty (zárodečného váčku), kondenzací chromatinu, oddělení homologních chromozomů a vydělení prvního pólového tělíska. Takovéto ovulované vajíčko dokončuje meiózu (s oddělenými chromatidami a vydělením druhého pólového tělíska - druhé redukční dělení) po oplození (Wassarman *et* Albertini, 1994).

V *in vivo* podmínkách pokračují oocyty v meióze na základě odpovědi na specifické signály, nejčastěji hormonálního charakteru. V prostředí *in vitro* obnovují meiotické zrání po vyjmutí z jejich folikulárního prostředí (Sun *et* Nagai, 2003).

Během prvního meiotického dělení začíná kondenzace chromatinu, nastává zahájení rozpadu zárodečného váčku (GVBD), formování vřeténka a vydělení prvního pólového tělíska. Ihned poté oocyty vstupují do meiózy II a následně jsou opět zastaveny v metafázi II (MII). Teprve po stimulaci spermií oocyt pokračuje v meióze II a dokončí své zrání vydělením druhého pólového tělíska (Sun *et* Nagai, 2003). Spermie, která penetruje do oocyty, spustí kortikální reakci, která má za úkol blokovat proniknutí dalších spermií a zabránit tak polyspermii. Kortikální reakce spočívá v uvolnění kortikálních granul do perivitellinního prostoru. Tato kortikální granula změni strukturu *zona pellicuda* a tím znemožní dalším spermiím navázání na její povrch (Romar *et al.*, 2012). Nezralé oocyty ve stádiu zárodečného váčku nejsou schopny navodit kortikální reakci. Schopnost oocytů uvolnit kortikální granula a tím navodit kortikální reakci se začíná vyvíjet u oocytů ve stádiu GVBD a vyvíjí se až do stádia MII (Sun *et* Nagai, 2003).

Po penetraci spermie do oocytu dochází k dekonduzování chromatinu spermie a maternálních chromozomů a následně k jejich transformaci na samčí a samičí prvojádra, respektive dvě prvojádra s uloženým maternálním a paternálním genetickým materiálem (Sun *et* Nagai, 2003).

Zránění oocytu zahrnuje dva procesy: jaderné a cytoplazmatické zránění. Obecně ke zránění oocytu dochází, když je vyděleno první pólové tělísko (jaderné zránění) a oocyt je zastaven ve fázi MII. Ačkoli oocyty s dokončeným jaderným zráněním mohou být oplozeny, mohou být vývojově inkompetentní díky nedostatku některých cytoplazmatických faktorů potřebných pro plné cytoplazmatické zránění. To je důvodem, proč vývoj plného vývojového potenciálu vyžaduje synchronní jaderné a cytoplazmatické zránění (Sun *et* Nagai, 2003).

### **Jaderné zránění**

Jaderné zránění trvá u prasete 44 hodin. Jedná se o sled událostí, které zahrnují dvě po sobě jdoucí dělení. Oocyty jsou po jaderném zránění zastaveny ve fázi MII až do doby oplodnění, kdy je aktivačním stimulem penetrace spermie. Penetrace spermie do vajíčka má za následek dokončení meiotického cyklu a je zahájen embryonální vývoj (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

Proces jaderného zránění začíná v okamžiku, kdy meióza vystupuje ze stádia diplotene. Jaderné zránění je signalizováno kondenzací chromosomů a rozpadem zárodečného váčku – GVBD (Landim-Alvarenga *et* Maziero, 2014). Motlík *et al.* (1984) uvádí, že k úspěšnému rozpadu zárodečného váčku dochází u oocytů pocházejících z folikulů o průměru větším než 1 mm.

Po GVBD oocyt prochází metafází I (MI), anafází I (AI) a telofází I (TI), čímž končí první meiotické dělení. Poté rychle prochází fází MII druhého meiotického dělení, kde se opět zastavuje ve druhé meióze (druhá meiotická blokace) (Kubelka *et al.*, 2000).

Po dokončení prvního meiotického dělení se homologní chromosomy (2n) oocytu oddělí do dvou jader s n chromosomy v každém jádru (MI). Cytoplasma se asymetricky rozdělí na dvě buňky. Jedna obsahuje téměř všechnu cytoplazmu (tzv. sekundární oocyt) a druhá velmi malá buňka utvoří první pólové tělísko (Landim-Alvarenga *et* Maziero, 2014).

## Cytoplasmatické zrání

Cytoplasmatické zrání zahrnuje strukturální a molekulární změny, které probíhají v oocytu v období od stádia GV do konce fáze MII. Ultrastrukturální změny v cytoplazmě zahrnují migraci několika organel. Mitochondrie a Golgiho aparát, které jsou v nezralých oocytech lokalizovány na periferii, se přesunují do perinukleárního postavení. Kortikální granula, která pocházejí z Golgiho aparátu a jsou původně situována v centru oocytu, nyní migrují k periferii a zakotvují se do membrány oocytu (Landim-Alvarenga *et* Maziero, 2014).

Molekulární změny, ke kterým dochází během cytoplasmatického zrání, spočívají v několika krocích, v transkripci, uložení a zpracování mRNA, která bude později využita k syntéze proteinů. Tyto proteiny budou poté přímo ovlivňovat jednotlivé buněčné děje, jako jsou oplození, formace prvojádra a začátek embryogeneze (Crocomo *et al.*, 2013).

V případě oplození je cytoplasmatické zrání důležité pro získání podmínek pro blokaci polyspermie, k dekonenzaci penetrovaných spermatozoí a k vytvoření prvojádra (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

## 5.5 Regulace meiotického zrání

U většiny savců je meióza zahájena již v samičích zárodečných buňkách během fetálního období. Proces meiózy je zastaven v profázi I v době narození jedince. Toto zastavení může být zapříčiněno buď absencí nezbytných proteinů, které regulují buněčný cyklus, nebo přítomností látek zastavujících meiózu, případně působením obou možností (Vanderhyden, 2002).

Je všeobecně známo, že na regulaci meiózy se podílí kaskáda fosforylací a defosforylací (Van den Hurk *et* Zhao, 2005).

V následujícím textu jsou zmíněny pouze některé z faktorů, které ovlivňují meiotické zrání oocytu.

### 5.5.1 Cyklický adenosin monofosfát - cAMP

Udržení zastaveného meiotického zrání v meioticky kompetentních oocytech je závislé na vysoké hladině cAMP (Thibault *et al.*, 1987; Van den Hurk *et Zhao*, 2005; Zhang and Xia, 2012). Vysoké hladiny cAMP v oocytu mají za následek fosforylaci cyklin dependentní kinázy 1 - CDK1 (Zhang *et Xia*, 2012).

V minulosti se předpokládalo, že cAMP je produkován kumulárními buňkami a pomocí gap junctions se dostává do oocytu (Thibault *et al.*, 1987). Avšak Zhang *et Xia* (2012) uvádí, že cyklický AMP může být produkován jak folikulárními buňkami, které obklopují oocyt, tak i samotným oocytem.

Poslední studie předpokládají, že sám oocyt produkuje dostatečné množství cAMP k udržení zastavené meiózy prostřednictvím G proteinu, G-Protein-Coupled Receptor (GPR3 a GPR12). Tyto G proteiny působí na stimulaci alespoň jedné formy adenylátcyklázy 3 (Zhang *et Xia*, 2012).

Intraoocytární hladiny cAMP jsou syntetizovány G proteiny (Gs) za přítomnosti adenylátcyklázy a degradovány fosfodiesterázami (PDEs). Z toho vyplývá, že inhibice aktivity oocytární cAMP-fosfodiesterázy (PDE3A) je nezbytná pro udržení zvýšené hladiny cAMP (Zhang *et Xia*, 2012).

### 5.5.2 Maturation Promoting Factor - MPF

Obnovení meiózy je doprovázeno a regulováno značným zvýšením cytosolové kinázové aktivity oocytu. Stěžejní složkou této aktivity je cyklin B-p34<sup>cdc2</sup>, také označovaný jako MPF - Maturation Promoting Factor (Hunter, 2000).

Je známo, že MPF u prasečích oocytů usnadňuje obnovení meiózy (Sun *et Nagai*, 2003). Tento protein je zodpovědný za počátek zrání oocytu a také za aktivaci, která předchází, nebo se objevuje ve stejnou dobu s rozpadem zárodečného váčku (Van den Hurk *et Zhao*, 2005).

MPF je protein kináza zapojená do regulace buněčného cyklu. Aktivní MPF je schopný fosforylovat proteiny, které tvoří jaderný obal, a které se podílejí na kondenzaci chromatinu a reorganizaci cytoskeletu (Van den Hurk *et Zhao*, 2005). Aktivita MPF je v prasečích oocytech stanovována měřením kinázové aktivity histonu H1. Tato aktivita spouští řadu reakcí, které nakonec vedou k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a formaci vřetenka, tedy k událostem, které jsou rozhodující pro podporu úspěšného oplození a časného embryonálního vývoje (Hunter, 2000).



Je známo, že na udržení aktivity MPF má vliv Greatwall (GWL) kináza. Ta udržuje aktivitu MPF skrze regulaci protein fosfatázy 2A (Protein Phosphatase 2A - PP2A) (Zhao *et al.*, 2014).

Pokles aktivity MPF se objevuje současně s výstupem z metafáze I a II a značí tak, že inaktivace MPF je nezbytná pro další vývoj vajíčka (Hunter, 2000).

### **5.5.3 Mitogenem aktivovaná protein kináza - MAPK**

Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) je další kináza, která se zapojuje do procesu zrání oocyty. Vysoká aktivita MPF a MAP kinázy v oocytech, které jsou ve stádiu MII, funguje u savců jako cytotatický faktor (CSF) a způsobuje zastavení zrání ve fázi MII (Sun *et Nagai*, 2003). MAP kinázy fosforylují cytoskeletární proteiny a jaderná lamina, což je stěžejní pro buněčné meiotické dělení (Wehrend *et Meinecke*, 1998).

U prasečích oocytů se vyskytují dvě izoformy MAP kinázy, ERK1 a ERK2 (Inoue *et al.*, 1995). Toto označení vyplývá z akronymu ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), který MAP kináza získala (Whitaker, 1996).

MAP kináza působí na molekuly, které jsou lokalizovány v jádře nebo v cytoplazmě, včetně cytoskeletárních proteinů. Během zrání oocyty je nutná aktivita MAP kinázy pro udržování MPF aktivity, pro formování vřeténka a pro udržení zastavené metafáze II (Van den Hurk *et Zhao*, 2005). Na rozdíl od MPF aktivity, MAP kinázová aktivita zůstává vysoká i při vydělení pólového tělíska (Hunter, 2000). Dalším rozdílem je odlišný účinek tyrosinové fosforylace. Zatímco MPF je inhibován fosforylací tyrosinu, MAP kináza je touto fosforylací aktivována (Whitaker, 1996).

U prasečích oocytů je MAP kináza v období GV v inaktivované formě a je aktivována v období, kdy dochází k rozpadu zárodečného váčku (Sun *et al.*, 2001a). Blokování MAP kinázové aktivity má za následek zabránění rozpadu zárodečného váčku (Whitaker, 1996). MAP kináza je udržována vysoce aktivní i po oplození, kdy pokračuje druhé meiotické dělení a vyděluje se druhé pólové tělísko. Defosforylace MAP kinázy je detekována v momentě, kdy je utvářeno prvojádro (Sun *et al.*, 2001b).

## 5.5.4 Vápník

Vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) plní v těle důležitou funkci druhého posla v řadě fyziologických procesech. Zapojují se například při expresi genů, apoptóze, regulaci buněčného cyklu a v řadě dalších pochodech (Suizu *et al.*, 2002). Hladina vápenatých iontů v buňce probíhá v opakujících se vlnách. Toto kolísání hladiny vápníku je důležité pro znovuzahájení meiózy a k zahájení dalších dějů spojených s aktivací oocyty, jako je například kortikální reakce a vývoj prvojádra (Heytens *et al.*, 2008).

Kolísání hladiny intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  může spontánně aktivovat a regulovat meiotické a cytoplasmatické zrání oocyty. Na základě výsledku některých studií se předpokládá, že vzestup intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů spouští rozpad zárodečného váčku (GVBD) u prasečích oocytů (Krisher, 2004).

Vápník upravuje proteiny, které jsou přítomny v každém konkrétním bodu buněčného cyklu, stimulací fosforylační nebo defosforylační cesty, nebo aktivováním proteáz. Předpokládá se, že modifikace cyklinů vápníkovými signály za přítomnosti cyklin dependentních kináz je nutná pro plnou aktivaci MPF. Přičemž tento děj následně vede k rozpadu zárodečného váčku (Van den Hurk *et Zhao*, 2005).

Kolísání vápenatých iontů brání vzestupu hladiny MPF a umožňuje dosažení úspěšné aktivace oocyty (Heytens *et al.*, 2008).

Po fúzi spermie s oocytom při oplození, dochází taktéž ke kolísání hladiny volných intracelulárních vápenatých iontů. V důsledku proniknutí spermie do oocyty dochází opakovaně k vzestupu hladiny vápenatých iontů, což vede k uvolnění kortikálních granul do perivitelinního prostoru (tzv. kortikální reakce) a tím dochází k zabránění polyspermie (Asano *et Niwa*, 2004).

## 5.5.5 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je všudypřítomná signální molekula, která se účastní fyziologických a patofyziologických procesů zahrnující například i meiotické zrání oocytů u prasat (Tao *et al.*, 2005).

Je známo, že NO plní u zvířat funkci biologického posla. Pomocí oxidu dusnatého dochází k přenosu signálu mezi buňkami. Signál vyslaný buňkou produkující tento plyn penetruje skrz membrány a reguluje tak funkci jiné buňky (Dixit *et Parvizi*, 2001).

Oxid dusnatý je obvykle syntetizován z L-argininu (L-Arg), kyslíku (O<sub>2</sub>), tetrahydrobiopterinu (H<sub>4</sub>B) a nikotinadenindinukleotidfosfátu (NADPH) pomocí tří odlišných izoform NO syntáz (NOS). Mezi tyto izoformy NOS patří: nervová (nNOS), indukovatelná (iNOS) a endoteliální (eNOS). Jednotlivé izoformy NOS mají odlišné funkce v různých reprodukčních dějích (Goud *et al.*, 2014).

Tyto základní izoformy jsou kalcium-dependentní a kalmodulin-dependentní a produkují malé množství oxidu dusnatého. Savčí vaječníky exprimují z těchto tří izoform pouze eNOS a iNOS. Není však zcela objasněno, která z izoform NOS se zapojuje do meiotického zrání oocytů prasat (Tao *et al.*, 2005).

Oxid dusnatý je důležitou složkou oocytárního mikroprostředí a má širokou škálu působení. Má významnou úlohu ve vývoji oocyty od období oogeneze po oplození. Důležitou roli hraje při aktivaci a zrání oocyty, implantaci a časném embryonálním vývoji (Goud *et al.*, 2014). Studie prováděné na myších s knokautovaným genem pro eNOS ukazují, že během meiotického zrání byly myší oocyty zablokovány v metafázi I, nebo vykazovaly různé abnormality (Petr *et al.*, 2005).

NO se také zapojuje při vývoji a regresi žlutého tělíska (Catherine *et al.*, 2003), kontroluje mechanismus LH vlny, sexuální chování, syntézu estradiolu, a ovulaci (Dixit *et Parvizi*, 2001).

## 6 Zvířecí model MeLiM

Pod akronymem MeLiM (z anglického **M**elanoma-bearing **L**iběchov **M**inipigs) je skryt název pro linii miniprasat s dědičným melanomem, která byla vyšlechtěna selektivním křížením zvířat postižených kožním melanomem (Horák *et al.*, 1999). Do České Republiky byla importována první prasata v roce 1967. Jednalo se o dva kance a tři prasnice z Minesotské univerzity (Hormel Institute) a dva kance a čtyři prasnice z univerzity v Göttingenu (Institute for Animal Breeding and Genetics) (Baxa *et al.*, 2013). Tato prasata byla dále křížena s několika dalšími plemeny (Cornwall, Landrace, Vietnamské prase a Velké bílé prase) a podílela se tak na vzniku plemene MeLiM (Hruban *et al.*, 2004). Díky tomuto selektivnímu křížení byla linie miniprasat MeLiM vyšlechtěna během deseti let (Svoboda *et al.*, 2005).

K udržení stálého výskytu tumorem postižených zvířat byla použita devitalizační terapie. Tento chirurgický zákrok spočívá v ischemizaci nádoru použitím stehů vedených pod bázi tumoru. Nedochází však k vyjmutí tumoru, ale je ponechán na místě. Po léčbě byl pozorován rozpad buněk melanomu a postupná transformace tumoru do fibrosní tkáně (Hruban *et al.*, 2004). Horák *et al.* (1999) uvádějí, že po této terapii nebyly zaznamenány žádné recidivy.

Miniprasata MeLiM jsou velmi vhodným zvířecím modelem pro studium lidských melanomů díky podobnostem v oblasti histopatologie (Boisgard *et al.*, 2003) a biochemie (Borovanský *et al.*, 2003). U linie MeLiM je pozorován vysoký výskyt nádorů (57 % zvířat), typický progresivní růst (okolo 34 % zvířat uhyne obvykle během prvních 2 měsíců života), vývoj metastáz v orgánech a existence rozmanitých mnohonásobných pigmentovaných lézí (névy, povrchově se šířící melanom a nodulární melanom). Tyto poznatky činí linii prasat MeLiM vhodným zvířecím modelem pro studování lidských chorob (Fortýn *et al.*, 1998; Borovanský *et al.*, 2003; Geffrotin *et al.*, 2004; Vincent-Naulleau *et al.*, 2004; Svoboda *et al.*, 2005; Le Chalony *et al.*, 2003).

## 6.1 Chov MeLiM miniprasat

Miniprasata MeLiM jsou chována v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově (Hruban *et al.*, 2004). Dle standartní praxe jsou chovány prasničky (pohlavně dospělé samice s pravidelným estrálním cyklem) a prasnice po odstavu ve skupinách po 3 - 4 jedincích. Kanci jsou zde ustájeni individuálně (Baxa *et al.*, 2013).

## 6.2 Melanom

Melanom (také označován jako maligní melanom, či melanoblastom) je kožní nádor, který vzniká neoplastickou transformací melanocytů (Hruban *et al.*, 2004). Melanom, který se vyskytuje u této linie prasat, vykazuje znaky dědičného výskytu (Svoboda *et al.*, 2005). Kožní melanomy vyskytující se u MeLiM prasat jsou obvykle mnohočetné a projevují se jako hrbolaté nodulární formy. Tumory se objevují u tmavě zbarvených, černých nebo rezavě červených selat. Jsou přítomny při narození, nebo během prvních dvou měsíců života jedince (Svoboda *et al.*, 2005).

Nádory se vyskytují v podobě černě zbarvených lézí na kůži. Některé formy melanomů vyskytující se u lidí (například pigmentované névy, dysplastické névy, povrchově se šířící melanom a nodulární maligní melanom) byly nalezeny i u MeLiM prasat. Také všechna stádia tumoru, v humánní medicíně klasifikovaná podle Clarkovy stupnice (popisuje progresi nádoru pomocí histogeneze a chování tumoru), byla zjištěna i v prasečích melanomech (Hruban *et al.*, 2004).

Metastázy jsou široce rozšířeny v nejrůznějších orgánech a tkáních. Běžně se nacházejí ve slezině, lymfatických uzlinách a v plicích (Horák *et al.*, 1999). Fortýn *et al.* (1998) doplňují, že u vysoce postižených miniprasat se metastázy vyskytují i v místech trávicího traktu, slinivce břišní, játrech, ledvinách, thymu a dalších orgánech. Spojitost mezi počtem a velikostí kožních nádorů a rozsahem vnitřních metastáz nebyla nalezena (Svoboda *et al.*, 2005).

### 6.2.1 Spontánní regrese melanomu

Tento jev znamená částečné nebo kompletní vymizení melanomových buněk bez jakéhokoli terapeutického zásahu. Je to spojeno se schopností melanomu navodit imunitní odpověď vzhledem k rozpoznání tumoru specifických nebo s tumorem asociovaných antigenů (Paredes, 2007).

U prasat MeLiM, většina nádorů spontánně regreduje brzy po porodu (Boisgard *et al.*, 2003). Vincent-Naulleau *et al.* (2004) uvádějí, že ke kompletní regresi nádoru dochází v 94 %. Tento jev je doprovázen zplošťováním a depigmentací tumoru (Rambow *et al.*, 2008). Regresi doprovází také depigmentace chlupů, kůže a duhovky (Vincent-Naulleau *et al.*, 2004).

Na histologické úrovni můžeme pozorovat hustý infiltrát s vysoce pigmentovanými buňkami. V místě nádoru dochází k infiltraci nejprve melanofágy a poté lymfocyty, podobně jako je tomu v případě regrese melanomu u člověka. Nicméně v porovnání s lidmi se zdá být lymfocytární infiltrace u miniprasat opožděná (Rambow *et al.*, 2008).

Spontánní regrese melanomu u MeLiM je pravděpodobně způsobena imunitní odpovědí namířenou proti buňkám melanomu. Tuto skutečnost potvrzuje přítomností halo efektu (bělení) v okolí nádorů, který se vyskytuje na kůži starších prasat. Imunitní buňky pravděpodobně rozpoznají antigeny melanomu, což má za následek destrukci melanomových buněk. Už od počátku neoplastické transformace melanocytů na melanomové buňky spolu sdílejí stejný repertoár antigenů. Melanocyty jsou tudíž okolo kožních nádorů zničeny (díky imunitní odpovědi zprvu soustředěné na melanomové buňky) vytvořením halo efektu (Plánská *et al.*, 2015).

Spontánní regrese melanomu je pozorována i u některých lidských pacientů (Paredes, 2007). Částečná spontánní regrese melanomu je u lidí popsána v 10 až 35 % všech případů (High *et al.*, 2005). Naopak kompletní spontánní regrese je v humánní medicíně velmi vzácný úkaz, který byl popsán pouze přibližně ve čtyřiceti důkladně dokumentovaných případech (High *et al.*, 2005; Menzies *et al.*, 1997).

Důkladné porozumění mechanismům, které jsou zodpovědné za spontánní regresi, může přispět k vytvoření nových strategií v oblasti melanomové terapie. Z etických důvodů nemohou být prováděny studie na lidských pacientech a proto je zapotřebí vhodného zvířecího modelu, jakým je například právě linie prasat MeLiM (Plánská *et al.*, 2015).

## **7 Materiál a metody**

### **Získávání reprodukčních orgánů prasnic**

Reprodukční orgány byly získány z prasnic linie MeLiM. Porážka byla provedena v Liběchově, kde bylo poráženo celkem 6 prasnic ve stáří 8 až 9 měsíců. Z prasnic byly vyjmuty reprodukční orgány a uloženy do označených sáčků a termoláhvi, kde byla udržována teplota 38°C. Následně byly orgány převezeny do laboratoře.

### **Zpracování vaječnicků a kultivace oocytů**

Vaječníky byly skalpelem odděleny od vejcovodů a závěsných vazů a vyfoceny s přiloženým měřítkem na stativu s horním a spodním osvětlením. Následně byly vaječníky vloženy do nádoby se zahřátým fyziologickým roztokem o teplotě 38°C a nasnímány ultrasonografickou lineární rektální sondou o frekvenci 7,5 MHz MyLab<sup>TM</sup>30Vet (Esaote, Maastricht, Nizozemsko). Poté byly vaječníky vyjmuty z fyziologického roztoku a aspirací folikulární tekutiny z folikulu byly získány oocyty. Aspirace byla provedena pomocí jehly 20G a stříkačky o objemu 20 ml. Pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645, Japonsko) byly tenkou skleněnou kapilárou vybrány oocyty o velikosti 120 μm s kompaktním kumulem a neporušenou cytoplazmou. Vybrané oocyty byly přeneseny do modifikovaného kultivačního média M199 (složení média je uvedeno v tabulce č. 1), kde byly kultivovány po dobu 48 hodin v řízené atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při teplotě 38°C.

**Tabulka č. 1 Složení modifikovaného kultivačního média M199 pro *in vitro* zrání**

<b>Složka</b>	<b>g/100 ml média M199</b>
<b>HEPES</b>	0,15
<b>Laktát sodný</b>	0,06
<b>Pyruvát sodný</b>	0,025
<b>Gentamicin</b>	0,0025
<b>7% uhličitan sodný</b>	0,039 ml/l
<b>Fetální telecí sérum</b>	10% (w/v)
<b>eCG</b>	13,4 IU/ml
<b>hCG</b>	6,6 IU/ml

## **Hodnocení meiotického zrání oocytů**

Po kultivaci byly z oocytů mechanicky opakovaným pipetováním skrz skleněnou tenkostěnnou pipetu odstraněny kumulární buňky. Oocyty byly dále fixovány v kyselině octové a alkoholu v poměru 1:3 po dobu minimálně 24 hodin. Po uplynulé době byly oocyty obarveny 1% roztokem orceinu.

Oocyty byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Stádium jaderného zrání bylo hodnoceno podle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1986): oocyty ve stádiu zárodečného váčku – GV (Germinal Vesicle), oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení – MI a oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení – MII.



## **Morfometrické a sonografické měření reprodukčních orgánů prasnic**

Reprodukční orgány prasnic bez vaječníků byly očištěny od okolních zbytků tkáně a závěsných vazů. Morfometrická měření všech orgánů byla měřena v centimetrech. Na všech pohlavních ústrojích byla pravítkem měřena délka stydké štěrbiny a délka a šířka vulvy. Skalpelem byl veden podélný řez pochvou, aby mohla být změřena délka poševní předsíně.

V místě hymenálního prstence byla pomocí skalpelu provedena disekce vulvy s poševní předsíní od pochvy a dělohy. Takto oddělená pochva s dělohou, děložními rohy a vejcovody byla zvážena na váze.

Po zvážení byly u každého pohlavního ústrojí získány ultrasonografické snímky jednotlivých částí pohlavního traktu. Snímky byly snímány v nádobě s fyziologickým roztokem ultrasonografickou lineární rektální sondou o frekvenci 7,5 MHz MyLab™30Vet (Esaote, Maastricht, Nizozemsko). U každého z šesti pohlavních traktů byly pořízeny celkem 4 sonografické snímky na předem vyznačených místech. Byla snímána tato místa: pochva, střed děložního krčku, děložní tělo a střed děložního rohu.

Následně byla jednotlivá ústrojí vyndána z fyziologického roztoku a rozložena na pevné podložce pro snadnější manipulaci. Skalpelem byl proveden podélný řez děložním krčkem vedený skrze děložní tělo až do místa bifurkace. Poté byla pravítkem změřena délka dílčích orgánů. Jmenovitě délka pochvy (od hymenálního prstence po první výrazný hrbol děložního krčku), délka děložního krčku, děložního těla, děložních rohů (měřeno na vnitřním zakřivení) a délka vejcovodů. U vejcovodů byl pravítkem měřen také jejich průměr.

## **Analýza sonografických snímků reprodukčních orgánů prasnic**

Pořízené snímky byly analyzovány pomocí softwaru MyLab™Desk, který byl vyvinut přímo pro použitou rektální sondu MyLab™30Vet. Všechna data byla vyhodnocena jednou osobou pro minimalizaci chyb vzniklých subjektivním hodnocením.

Sonograficky byl měřen průměr pochvy, děložního krčku, děložního těla a děložních rohů. Dále byla měřena tloušťka stěny těchto orgánů a také plocha měřeného sonografického řezu.

Na základě echotextury byly na snímcích vaječníků rozlišeny folikuly, žlutá tělíska, folikulární cysty a krvavé cysty. Tyto struktury byly dále sečteny a byl měřen jejich průměr.

Všechna sonografická měření byla prováděna celkem čtyřikrát a získaná data byla podrobena statistické analýze.

## **Statistická analýza dat**

Na data získaná z morfometrických a sonografických měření orgánů společně se záznamy z kultivace oocytů byla aplikována korelační analýza. Data byla zpracována v programu Statistica (ver. 10, StatSoft, ČR). Výsledkem této analýzy byl korelační koeficient, který může nabývat hodnot od -1 do 1. Při vyhodnocování výsledků byla brána v potaz kritická mez korelačního koeficientu. Dle tabulek pro příslušný počet analyzovaných dat a hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  měla tato mez hodnotu 0,8114.

## 8 Výsledky

### 8.1 Hodnocení meiotického zrání oocytů

Celkový počet oocytů získaný aspirací folikulární tekutiny z folikulů je uveden v tabulce číslo 2. Vaječníky prasnice P54 nesplňovaly vhodné předpoklady pro aspiraci a nebyl proto z jejich folikulů získán žádný obsah vhodný k analýze.

**Tabulka č. 2 Množství folikulární tekutiny a počet oocytů získaných od jednotlivých zvířat**

<b>Prasnice</b>	<b>Objem folikulární tekutiny [ml]</b>	<b>Počet oocytů</b>
<b>P53</b>	4	6
<b>P54</b>	0	0
<b>P55</b>	3	4
<b>P62</b>	6	4
<b>P74</b>	5	2
<b>P78</b>	5	1

Tabulka číslo 3 znázorňuje procenta jaderného zrání oocytů po 48 hodinách *in vitro* kultivace.

**Tabulka č. 3 Jaderné zrání oocytů po 48 hodinách kultivace**

	<b>n</b>	<b>Stádium zrání [%]</b>		
		<b>GV</b>	<b>MI</b>	<b>MII</b>
<b>P53</b>	6	33,3	0	66,7
<b>P54</b>	0	0	0	0
<b>P55</b>	4	0	0	100
<b>P62</b>	4	0	0	100
<b>P74</b>	2	0	0	100
<b>P78</b>	1	0	0	100

n – počet kultivovaných oocytů, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku (Germinal Vesicle), MI – oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení, MII – oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení

## 8.2 Morfometrické a sonografické měření reprodukčních orgánů prasnic

Nejprve byla provedena měření vulvy a poševní předsíně, jakožto vnějších vývodných pohlavních cest. Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 4.

**Tabulka č. 4 Morfometrie vnějších vývodných pohlavních cest**

Prasnice	Délka vulvy [cm]	Šířka vulvy [cm]	Délka stydké štěrbině [cm]	Délka poševní předsíně [cm]
P53	5,6	4,1	2,8	4,6
P54	4,9	4,0	2,8	4,3
P55	5,3	4,5	2,7	3,7
P62	5,3	4,9	2,5	5
P74	4,9	5,4	2,9	4,2
P78	3,8	3,8	2,0	4,6

Následně byla měřena délka pochvy. Z výsledků plyne, že délka pochvy reflektuje věkové rozdíly sledovaných prasnic. Prasnice P74 a P78, které jsou ze souboru zvířat nejmladší, měly také nejkratší pochvu. Minimální naměřená délka pochvy byla 7,7 cm a maximální 12,9 cm. Průměr pochvy se pohyboval mezi 1,47 cm a 1,82 cm. Tloušťka stěny nabývala hodnot od 0,17 do 0,23 cm. Plocha měřeného řezu, na kterém byla prováděna sonografická měření, byla 1,87 cm<sup>2</sup> až 2,89 cm<sup>2</sup>.

Sonografická měření děložního krčku byla prováděna v jeho středu. Délka děložního krčku dosahovala od 8,3 do 12,2 cm. Průměr děložního krčku se pohyboval mezi hodnotami 1,25 cm a 1,76 cm a tloušťka stěny byla 0,21 až 0,33 cm. Plocha řezu, na kterém byla prováděna měření, byla 1,24 až 2,80 cm<sup>2</sup>.

Délka děložního těla byla u nejmladších prasnic P74 a P78 prokazatelně nejkratší, 5,3 cm a 5,7 cm. Maximální naměřená délka byla 9,4 cm u prasnice P62. Průměr děložního těla se pohyboval od 1,48 cm do 2,28 cm. Stěna dosahovala tloušťky od 0,15 do 0,20 cm. Plocha měřeného řezu byla 1,90 cm<sup>2</sup> až 3,63 cm<sup>2</sup>.

Měření děložního rohu byla provedena v jeho středu. Délka se pohybovala od 30,7 cm do 85,7 cm a jeho průměr od 1,26 do 1,89 cm. Tloušťka stěny byla 0,17 cm až 0,20 cm. Plocha řezu byla 1,22 až 2,63 cm<sup>2</sup>.

Délka vejcovodu kolísala mezi 16,1 a 24,0 cm. Průměr vejcovodu byl naměřen u všech prasnic podobný, 0,3 až 0,6 cm. Pro lepší přehlednost těchto výsledků jsou v tabulce číslo 5 uvedeny průměrné hodnoty spolu se směrodatnou odchylkou.

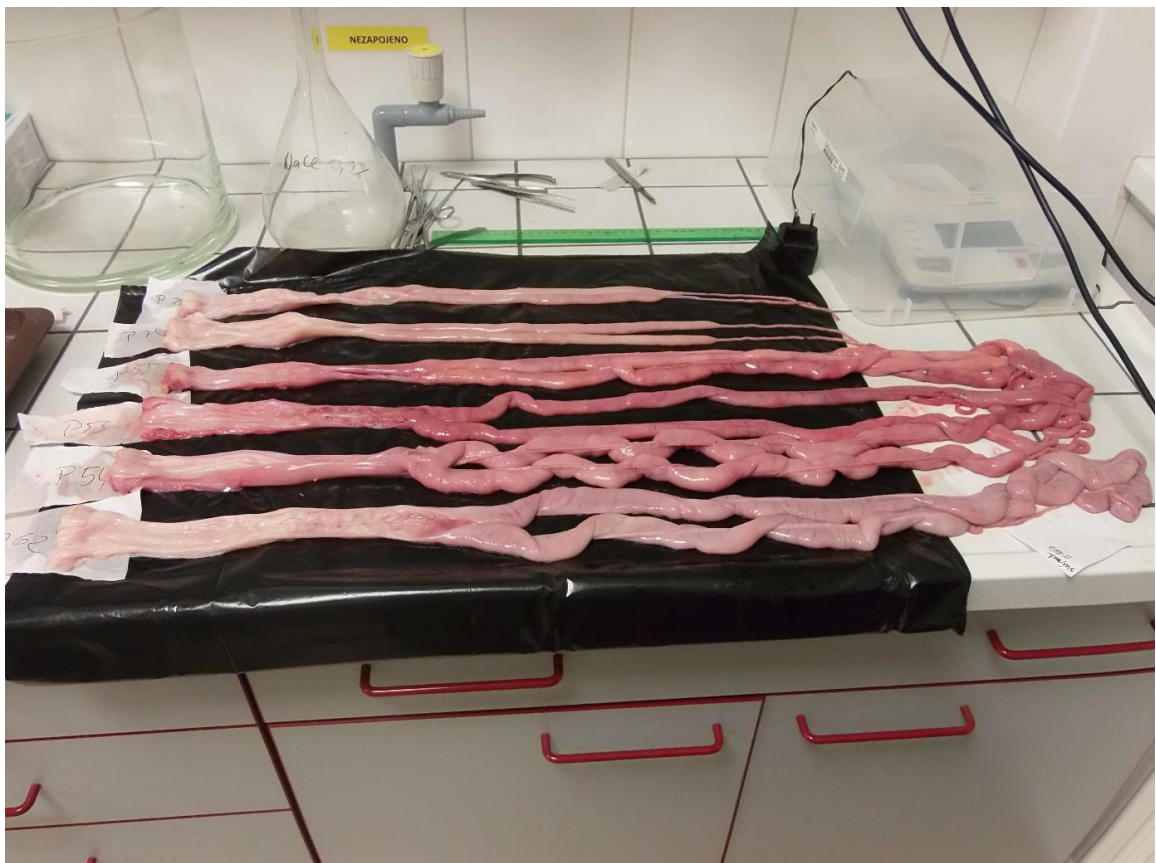
**Tabulka č. 5 Průměrné hodnoty reprodukčních orgánů sledovaných prasnic**

	Délka [cm]	Průměr [cm]	Tloušťka stěny [cm]	Plocha měřeného řezu [cm <sup>2</sup> ]
<b>Vulva</b>	4,97 ± 0,58	4,45 ± 0,56	-	-
<b>Stydká štěrbina</b>	2,62 ± 0,30	-	-	-
<b>Poševní předsíň</b>	4,40 ± 0,40	-	-	-
<b>Pochva</b>	10,63 ± 1,61	1,65 ± 0,13	0,20 ± 0,03	2,26 ± 0,35
<b>Děložní krček</b>	9,92 ± 1,27	1,51 ± 0,16	0,25 ± 0,04	1,91 ± 0,50
<b>Děložní tělo</b>	7,17 ± 1,36	1,75 ± 0,26	0,18 ± 0,02	2,42 ± 0,56
<b>Děložní roh</b>	55,98 ± 18,82	1,52 ± 0,25	0,18 ± 0,01	1,64 ± 0,48
<b>Vejcovod</b>	20,33 ± 3,07	0,45 ± 0,10	-	-

Hodnoty jsou vyjádřeny pomocí průměru ± S.E.M

Obrázek číslo 3 zachycuje pohlavní ústrojí prasnic zařazených do experimentu.

**Obrázek č. 3 Reprodukční orgány sledovaných prasnic**



### 8.3 Analýza sonografických snímků vaječníků

Před aspirací folikulární tekutiny z folikulů byly vaječníky vyfotografovány a sonograficky nasnímány v nádobě s fyziologickým roztokem. Na základě získaných snímků byly zjištěny počty folikulů, žlutých tělísek a cyst vyskytujících se na vaječnicích. Celkový počet folikulů a žlutých tělísek identifikovaných u každé prasnice je uveden v tabulce číslo 6.

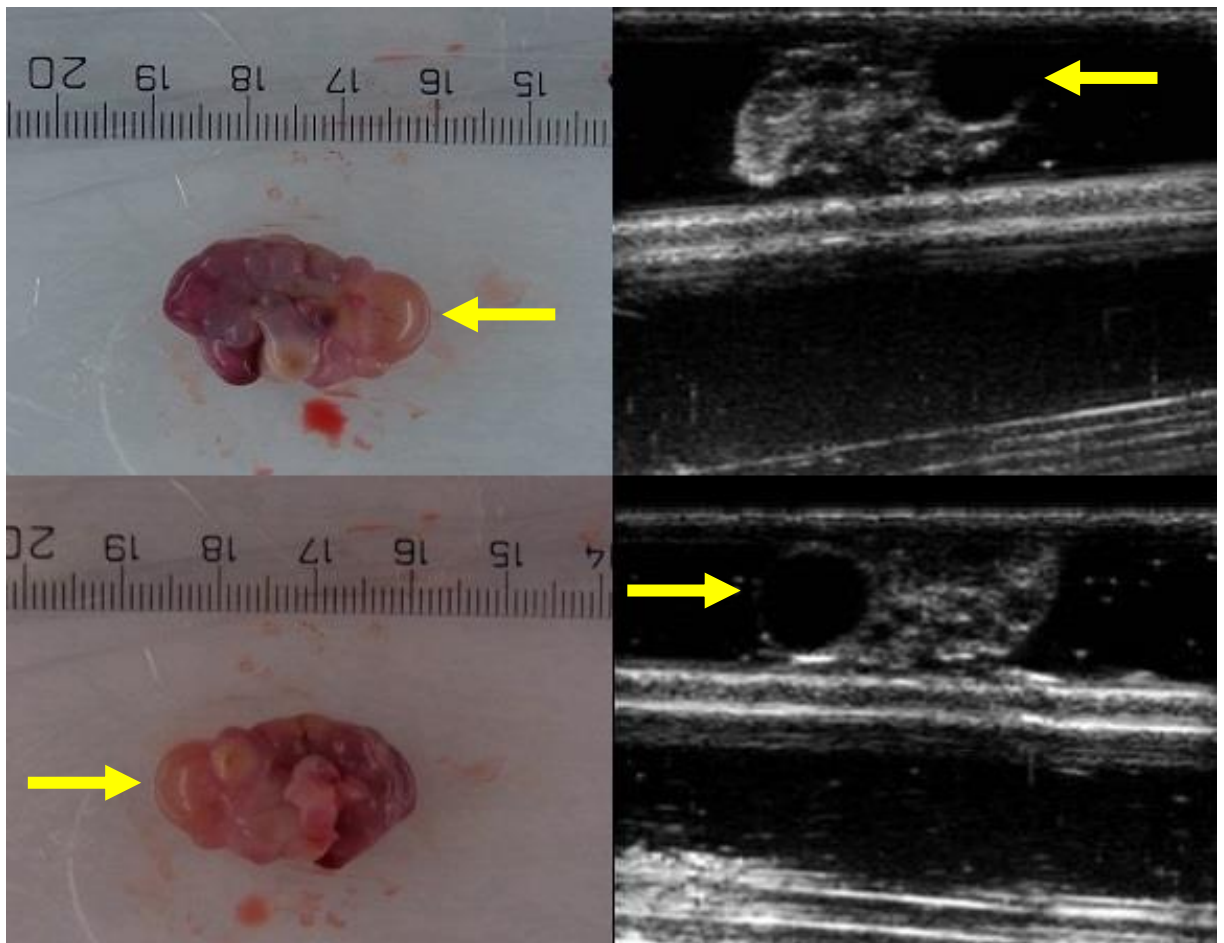
**Tabulka č. 6 Celkový počet folikulů, žlutých tělísek (CL) a cyst sledovaných prasnic**

<b>Prasnice</b>	<b>Počet folikulů</b>	<b>Počet CL</b>	<b>Počet folikulárních cyst</b>	<b>Počet krvavých cyst</b>
<b>P53</b>	34	5	1	1
<b>P54</b>	21	12	0	0
<b>P55</b>	30	11	0	1
<b>P62</b>	25	6	0	1
<b>P74</b>	26	0	0	0
<b>P78</b>	24	0	0	0

Folikulární cysta se vyskytovala pouze u prasnice P53. Na obrázku číslo 4 jsou zobrazeny fotografie a sonografické snímky vaječníku s folikulární cystou. Krvavé cysty byly pozorovány celkem tři, na vaječníku prasnice P53, kdy byl průměr cysty 8,3 mm, u prasnice P55 o průměru cysty 10,0 mm a u prasnice P62 s velikostí cysty 6,5 mm. Krvavou cystu prasnice P53 znázorňuje obrázek číslo 5. Vaječník s krvavou cystou prasnice P62 je zobrazen na obrázku číslo 6.

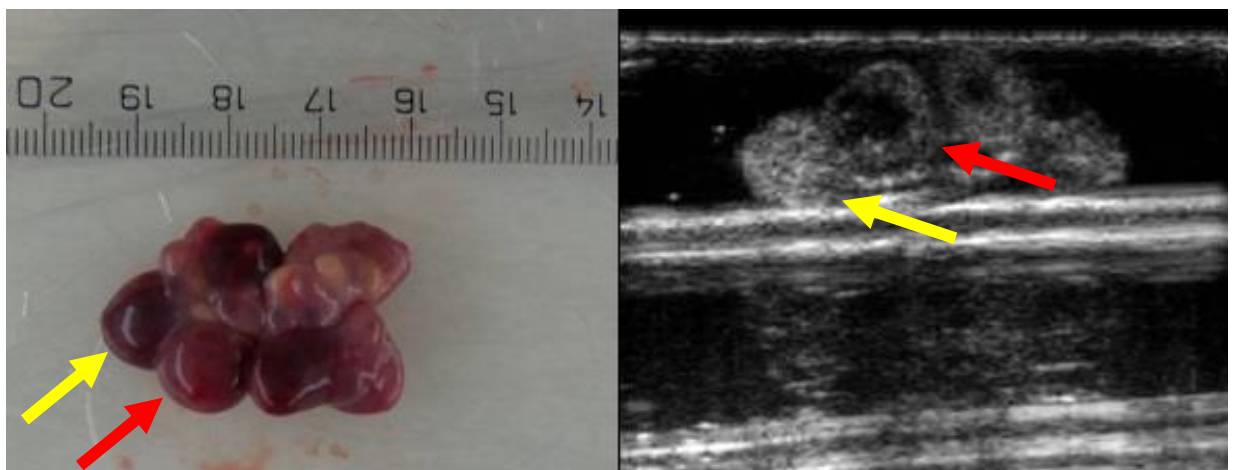


**Obrázek č. 4 Vaječník A prasnice P53**



Šipky na obrázku ukazují na folikulární cystu o velikosti 11,2 mm na vaječniku prasnice P53.

**Obrázek č. 5 Vaječník B prasnice P53**



Na obrázku lze vidět krvavou cystu (červené šipky) o velikosti 8,3 mm na vaječniku prasnice P53. Na sono snímcích je možné vidět její charakteristickou strukturu. Echotextura krvavé cysty je podobná echotextuře žlutého tělíska (žluté šipky), ale navíc obsahuje nepravidelnou malou dutinku uprostřed.

**Obrázek č. 6 Vaječník prasnice P62**



Na obrázku je šipkami znázorněna krvavá cysta prasnice P62 o velikosti 6,5 mm.

Ovariální folikuly byly sonograficky měřeny a rozděleny do 6 kategorií dle jejich velikosti. Nejvíce analyzovaných folikulů bylo v kategorii  $< 2$  mm. Konkrétní početní zastoupení v jednotlivých kategoriích je uvedeno v tabulce číslo 7.

**Tabulka č. 7 Počty folikulů v jednotlivých kategoriích dle velikosti**

<b>Prasnice / vaječník</b>	<b>&lt; 2 mm</b>	<b>2-2,9 mm</b>	<b>3-3,9 mm</b>	<b>4-4,9 mm</b>	<b>5-5,9 mm</b>	<b>6-7 mm</b>	<b>n</b>
<b>P53 / A</b>	10	2	2	1	0	0	15
<b>P53 / B</b>	8	5	5	1	0	0	19
<b>P54 / A</b>	7	4	2	0	0	0	13
<b>P54 / B</b>	6	1	0	1	0	0	8
<b>P55 / A</b>	7	2	2	3	0	0	14
<b>P55 / B</b>	4	5	4	2	1	0	16
<b>P62 / A</b>	0	3	1	1	4	7	16
<b>P62 / B</b>	3	2	3	1	0	0	9
<b>P74 / A</b>	0	3	6	2	0	4	15
<b>P74 / B</b>	3	2	2	3	1	0	11
<b>P78 / A</b>	4	4	3	2	0	0	13
<b>P78 / B</b>	0	4	6	1	0	0	11

n - celkový počet folikulů na vaječníku

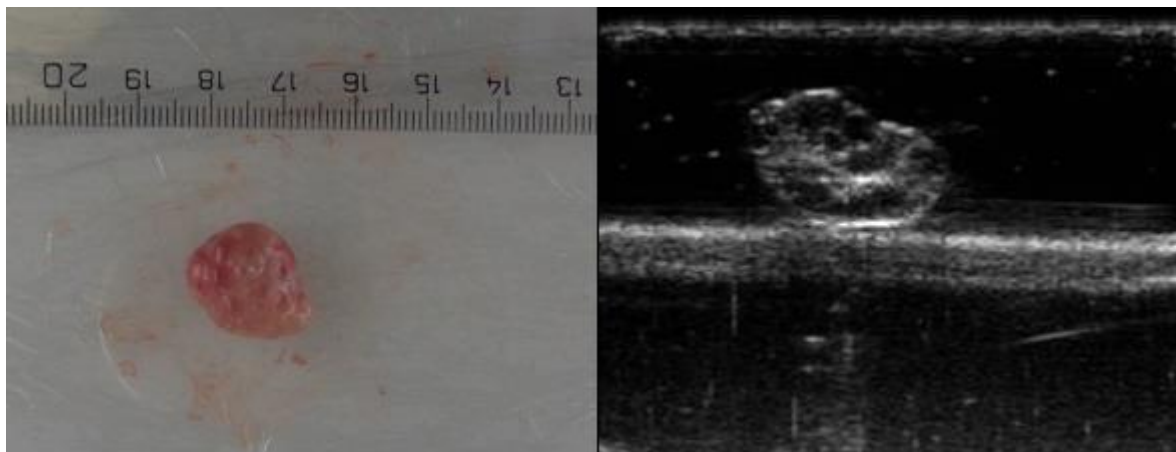
Žlutá tělíska byla sečtena a sonograficky změřena. Velikosti žlutých tělísek jsou shrnuty v tabulce číslo 8.

**Tabulka č. 8 Velikost žlutých tělísek**

	<b>Průměr CL</b>		
	<b>Minimum [mm]</b>	<b>Maximum [mm]</b>	<b>Průměrná hodnota [mm ± S.E.M.]</b>
<b>P53</b>	6,2	10,4	9,12 ± 1,36
<b>P54</b>	5,0	6,4	5,73 ± 0,88
<b>P55</b>	3,3	8,1	5,83 ± 1,13
<b>P62</b>	5,6	7,8	6,95 ± 0,35

U nejmladších prasnic P74 a P78 se na vaječníku nevyskytovala žádná žlutá tělíska. Na obrázku číslo 7 je fotografický a sonografický snímek vaječníku prasnice P78.

**Obrázek č. 7 Vaječník prasnice P78**



Na snímcích se vyskytují pouze malé folikuly, nepřesahující velikost 4,9 mm. Současně se zde nevyskytují luteinizované struktury ani ovariální cysty.

## 8.4 Statistická analýza dat

Do statistické analýzy byl mimo již výše popsané naměřené hodnoty zařazen také věk a hmotnost vnitřních vývodných reprodukčních orgánů prasnic jako důležité kritérium pro hodnocení změn na reprodukčních orgánech prasnic. V následující tabulce číslo 9 je proto uveden věk a hmotnost vnitřních reprodukčních orgánů (pochva, děložní krček, děložní tělo, děložní rohy a vejcovody).

**Tabulka č. 9 Věk prasnic v době pokusu a hmotnost jejich vnitřních reprodukčních orgánů**

Prasnice	Datum narození	Věk* [dny]	Hmotnost [g]
<b>P53</b>	8. 3. 2015	283	280
<b>P54</b>	8. 3. 2015	283	380
<b>P55</b>	8. 3. 2015	283	330
<b>P62</b>	14. 3. 2015	277	370
<b>P74</b>	28. 3. 2015	263	120
<b>P78</b>	3. 4. 2015	257	90

\* věk ke dni porážky, která byla provedena dne 16. 12. 2015

Pro zjištění závislosti morfometrických změn na počtu folikulů, počtu oocytů a dalších sledovaných parametrů, byly naměřené hodnoty podrobeny korelační analýze.

Výsledné korelační koeficienty pro první analyzovaný soubor dat jsou uvedeny v tabulce číslo 10.

**Tabulka č. 10 Korelační koeficienty sledovaných parametrů I**

	<b>Stáří</b>	<b>Hmotnost</b>	<b>Délka děl. rohu</b>
<b>Hmotnost</b>	0,91	-	-
<b>Délka pochvy</b>	0,78	0,87	0,75
<b>Délka krčku</b>	0,24	0,38	0,54
<b>Délka děl. těla</b>	0,72	0,90	0,68
<b>Délka děl. rohu</b>	0,83	0,68	-
<b>Délka vejcovodu</b>	0,50	0,51	0,51

Analýza byla provedena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , Hmotnost – celková hmotnost pochvy, děložního krčku, děložního těla, děložních rohů a vejcovodů.

Tabulka číslo 11 znázorňuje výsledné korelační koeficienty pro druhou analyzovanou skupinu, která se zaměřovala na data získaná z vaječníků.

**Tabulka č. 11 Korelační koeficienty sledovaných parametrů II**

	<b>Počet oocytů</b>	<b>Počet cyst</b>	<b>Stáří</b>	<b>Hmotnost</b>	<b>Délka děl. rohu</b>
<b>Počet folikulů</b>	0,43	0,65	0,35	0,02	0,70
<b>Počet CL</b>	-0,72	0,49	0,87	0,89	0,49
<b>Objem fol. tekutiny</b>	0,63	-0,50	-0,54	-0,47	-0,07

Analýza byla provedena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , Hmotnost – celková hmotnost pochvy, děložního krčku, děložního těla, děložních rohů a vejcovodů.

Největší závislost byla zjištěna mezi stářím prasnic a hmotností jejich vnitřních orgánů. Silná závislost byla zjištěna také mezi hodnotami délky děložního těla a hmotností vnitřních orgánů prasnic. Zde byl korelační koeficient roven 0,90.

Velmi nízká závislost, blíží se k 0 byla naměřena mezi hodnotami délky krčku a věkem sledovaných prasnic. Korelační koeficient byl 0,24.

Záporný korelační koeficient byl zjištěn například u závislosti počtu žlutých tělísek na počtu oocytů. Nabýval hodnoty -0,72, což značí silnou, ale nepřímou závislost jedné veličiny na druhé.

## 9 Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena na změny ve funkční morfologii reprodukčních orgánů prasnic, které jsou postiženy dědičnou formou melanomu. Morfometricky a sonograficky byly hodnoceny reprodukční orgány prasnic linie MeLiM. Sledovány byly také jejich pohlavní buňky, oocyty, které byly kultivovány v podmínkách *in vitro* a bylo hodnoceno jejich meiotické zrání.

Při sledování změn ve velikosti vnějších vývodných cest pohlavních orgánů, vulvy a poševní předsíně, nebyla mezi jednotlivými prasnicemi pozorována variabilita. Oproti publikovaným výsledkům jiných autorů byly námi sledované rozměry pohlavních cest menší. Poševní předsíň u sledovaných prasnic měla délku od 3,7 do 5,0 cm. König *et Liebich* (2002) i Najbrt *et al.* (1982) popisují délku poševní předsíně běžně chovaných plemen prasat okolo 6 cm.

Délka pochvy prasnic se pohybovala od 7,7 cm do 12,9 cm. Najbrt *et al.* (1982) uvádějí obecnou délku pochvy u prasnic 10 – 20 cm. Délka děložního krčku byla mezi 8,3 a 12,2 cm. Sova *et al.* (1981) uvádějí délku děložního krčku okolo 13 cm a Najbrt *et al.* (1982) dokonce 15 – 20 cm. V porovnání s našimi výsledky jsou i tyto orgány linie MeLiM menší.

Oproti tomu délka děložního těla, která měřila 5,3 až 9,4 cm, dosahovala naopak vyšších hodnot, než uvádějí Najbrt *et al.* (1982), kteří se zmiňují o délce 5 cm u běžných plemen prasat.

Délka vejcovodu byla naměřena 16,1 až 24,0 cm. Tento údaj plně koresponduje s obecně udávanou délkou vejcovodu v literatuře. Najbrt *et al.* (1982) uvádějí rozpětí délky vejcovodů mezi 15 – 30 cm.

Délka děložních rohů byla u této skupiny prasnic nižší, než je obecně uváděno. Komárek *et al.* (1964) uvádějí délku děložních rohů mezi 80 a 140 cm a Sova *et al.* (1981) dokonce 125 – 150 cm. Největší rozptyl v naměřených délkách jednotlivých orgánů však vykazovala právě délka děložních rohů. Nejkratší děložní rohy měly dvě z nejmladších prasnic, jejich délka byla 30,7 a 36,3 cm, oproti tomu u čtyřech starších prasnic byla délka děložních rohů mezi hodnotami 51,5 a 85,7 cm. Lze proto předpokládat, že na délku děložních rohů má vliv věk prasnice. Tento předpoklad potvrdila korelační analýza, která prokázala velmi silnou a zároveň přímou závislost mezi těmito veličinami.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že délky jednotlivých reprodukčních orgánů jsou menší, než délky uváděné v literatuře. Pouze velikost děložního těla byla v této práci naměřena větší. Délka vejcovodů se pak zcela shodovala s hodnotami v publikacích. Na základě korelační analýzy lze odlišné hodnoty ve velikostech orgánů vysvětlit nízkým věkem prasnic, které byly zařazeny do pokusu. Dalším možným důvodem v rozdílných velikostech orgánů může být způsob měření, individualita měřící osoby a také plemenná příslušnost měřených zvířat.

Minimální naměřené hodnoty měly ve většině případů prasnice P74 a P78, které jsou z vybraného souboru zvířat nejmladší. To napovídá možnou závislost mezi velikostí orgánů a stářím prasnic. Provedená korelační analýza tuto skutečnost potvrdila. Korelační koeficient na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pro závislost věku na hmotnosti vnitřních reprodukčních orgánů byl 0,91. Korelační koeficient může nabývat hodnot od -1 do 1, což naznačuje silnou závislost. V porovnání s kritickou mezí korelačního koeficientu pro počet analyzovaných dat lze potvrdit velmi silnou přímou závislost.

Velmi silná přímá závislost byla zjištěna také mezi hmotností vnitřních orgánů a délkou pochvy a délkou děložních rohů a věkem prasnic. Silně korelovala také délka děložního těla s hmotností vnitřních orgánů.

Oproti tomu nebyla prokázána závislost mezi délkou krčku a věkem prasnic a délkou krčku a hmotností vnitřních orgánů. Velmi slabá korelace byla zjištěna také mezi délkou vejcovodů a stářím prasnic. Hmotnost vnitřních orgánů ani délka děložních rohů na délku vejcovodů neměla vliv.

K morfologickým změnám dochází i na samotných vaječnicích. Mimo folikuly a žlutá tělíska byly na vaječnicích linie MeLiM pozorovány také cysty. Kauffold *et al.* (2007) rozdělují ovariální cysty na folikulární a luteální. Obecně jsou ovariální cysty anechogenní struktury naplněné tekutinou, které dosahují průměru 11 - 50 mm. Folikulární cysty pocházejí z neovulovaných folikulů a mají tenkou stěnu. Oproti tomu luteální cysty mají původ v již vyvinutých žlutých těliscích a mají silnou luteinizovanou stěnu. Jejich lumen může obsahovat i některé další struktury. Takové luteální cysty s příměsí jsou Kauffoldem *et al.* (2007) označovány jako tzv. krvavé cysty. Ty se pravděpodobně vyvinuly z přerostlých *corpora haemorrhagica*. Krvavé cysty mají podobnou echogenitu jako žluté tělísko, ale na rozdíl od žlutého tělíska obsahují malou nepravidelně utvářenou anechogenní dutinku. V rámci této práce byly krvavé cysty nalezeny u třech prasnic linie MeLiM.



Dle Kauffolda *et al.* (2007) se ovariální cysty v běžných chovech prasat objevují v 7,6 – 30 % a ovlivňují reprodukci snížením počtu porodů a snížením počtu selat ve vrhu. Ze záznamů o počtech selat ve vrhu u linie MeLiM vyplývá, že prasnice chované v ÚŽFG AV ČR v Liběchově rodí průměrně 7,04 selat na vrh, včetně mrtvě narozených. Pro objektivní srovnání je třeba zdůraznit, že linie MeLiM byla vyšlechtěna z několika různých plemen, Cornwall, Landrace, Vietnamské prase a Velké bílé prase (Hruban *et al.*, 2004). Kupříkladu Putz *et al.* (2015) uvádějí průměrně  $12,77 \pm 3,64$  selat na vrh (včetně mrtvě narozených) u Velkého bílého prasete a  $11,9 \pm 3,31$  selat na vrh (včetně mrtvě narozených) u plemene Landrace. Na základě těchto poznatků se lze domnívat, že výskyt cyst na vaječnicích prasnic linie MeLiM může být jedním z důvodů nižšího počtu narozených selat v jejich vrzích.

Z dalších sonografických měření vaječníků vyplývá, že velikost analyzovaných folikulů u žádné z prasnic nepřesáhla 7 mm. Přičemž pouze na dvou ze sledovaných vaječníků byly přítomny folikuly o této velikosti. Na základě rozdělení folikulů do velikostních kategorií lze říci, že největší početní zastoupení se vyskytuje v kategorii pro folikuly menší než 2 mm. Současně se na vaječnicích vyskytovala žlutá tělíska, což napovídá, že všechny cyklující prasnice, v tomto případě čtyři prasnice z šesti, mohly být v luteální fázi estrálního cyklu, kdy se na vaječnicích prasnic neobjevují folikuly větší než 6 mm (Gee *et al.*, 1990).

Žlutá tělíska dosahovala menších průměrů, než je tomu u běžných plemen prasat. Jejich průměrné hodnoty kolísaly od  $5,73 \pm 0,88$  mm do  $9,12 \pm 1,36$  mm. Knox *et al.* (1999) definují velikost žlutých tělísek okolo 10 – 12 mm v průměru. Zdá se tedy, že velikost žlutých tělísek se u této linie pohybuje v menších hodnotách, než je tomu u běžných plemen prasat popisovaných v publikacích.

Na základě přítomnosti, či absence žlutých tělísek na vaječniku lze také posoudit, zda u sledovaných prasnic docházelo k ovulaci, či nikoliv. U čtyřech prasnic P53, P54, P55 a P62 byla na vaječnicích přítomna žlutá tělíska bilaterálně. U zbývajících dvou prasnic P74 a P78 se žlutá tělíska nevyskytovala ani na jednom z vaječníků. Právě tyto dvě prasnice byly ve věku 8 a půl měsíce a byly ze souboru zvířat nejmladší. Je známo, že běžná plemena prasnic dosahují pohlavní dospělosti obvykle okolo 8 měsíců věku (Oberlender *et al.*, 2014). Knox *et al.* (1999) popisují ve své studii sonografické snímky vaječníků prepubertálních prasnic. Dle jejich publikace se na vaječnicích prepubertálních prasnic vyskytují pouze malé (< 3 mm) až střední (3 – 6,5 mm) folikuly bez dalších ovariálních struktur, jako jsou žlutá tělíska apod. Na základě této teorie, průměru folikulů (nedosahovaly více než 4,9 mm

v průměru) a echotextury sonografických snímků těchto dvou prasnic lze tvrdit, že prasnice P74 a P78 byly ještě v prepubertálním období.

Z výsledků kultivace oocytů *in vitro* lze usoudit, že oocyty linie prasat MeLiM nevykazují abnormality v meiotickém zrání a jejich jaderné zrání tedy probíhá stejně jako u běžných plemen prasat. Pouze prasnice P53 měla narušenou schopnost jaderného zrání. Oocyty prasnice P54 nebyly kultivovány z důvodu nevhodných folikulů k aspiraci.

Při vyhodnocování korelační analýzy je důležité zmínit, že jeden zkoumaný parametr nemusí nutně ovlivňovat druhý analyzovaný parametr. Výsledky mohou být ovlivněné faktory nezahrnutými do analýzy. Také je potřeba uvést, že soubor dat podrobený pokusu byl v této práci malý a výsledky pokusů mohou být v důsledku toho zkresleny. Soubor dat byl limitován malým počtem prasnic v chovu této neobvyklé linie prasat. Pro získání více hodnot by bylo vhodné pokus například rozložit do delšího časového období. Na výsledky však může mít vliv i objektivnost osob provádějících měření a v neposlední řadě zkušenost se čtením v sonografických snímcích.

V případném navazujícím experimentu by bylo vhodné rozšířit tyto poznatky například o tělesnou hmotnost prasnic a také o vytvoření kontrolní skupiny. Díky těmto dalším informacím by bylo možné uskutečnit některé doplňující statistické testy, čímž by bylo zvýšeno množství signifikantních výsledků a míra jejich spolehlivosti. Zajímavou informací by také mohly být záznamy o přesném rozmístění nádorů v těle sledovaných zvířat a jejich celková zdravotní anamnéza.

## 10 Závěr

V této diplomové práci bylo prokázáno, že u prasnic linie MeLiM dochází ke změnám ve funkční morfologii reprodukčních orgánů. Reprodukční orgány sledovaných prasnic linie MeLiM byly menší, než reprodukční orgány běžných plemen prasat.

Výsledky naznačují, že meiotické zrání oocytů prasnic linie MeLiM probíhá bez abnormalit. Výsledky ukazují na potenciální vhodnost oocytů těchto prasat k dalším výzkumům. Bylo by proto zajímavé ověřit vývojovou schopnost oocytů na větším počtu vzorků v dalších experimentech. V budoucnu by bylo také velmi zajímavé zařadit oocyty linie prasat MeLiM do dalších výzkumů, které by mohly naznačit možnou aplikaci reprodukčních biotechnologií u této neobvyklé linie prasat.

## 11 Seznam literatury

- Asano, A., Niwa, K. 2004. Activation and Penetration In Vitro of Pig Oocytes Treated with Calcium Ionophore. *Journal of Reproduction and Development*. 50 (1). 77 – 85.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., Marsala, S., Weiss, A., Kubickova, S., Musilova, P., Vrtel, R., Sontag, E. M., Thompson, L. M., Schier, J., Hansikova, H., Howland, D. S., Cattaneo, E., DiFiglia, M., Marsala, M., Motlik, J. 2013. A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*. 2 (1). 47 – 68.
- Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6 (2). 161 – 193.
- Black, J. L., Erickson, B. H. 1986. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1). 45 – 55.
- Boisgard, R., Vincent-Nalleau, S., Leplat, J., Bouet, S., Le Chalony, C., Tricaud, Y., Horák, V., Geffroin, C., Frelat, G., Tavitian, B. 2003. A new animal model for the imaging of melanoma: correlation of FDG PET with clinical outcome, macroscopic aspect and histological classification in Melanoblastoma-bearing Libechov Minipigs. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 30 (6). 826 – 834.
- Borovanský, J., Horák, V., Elleder, M., Fortýn, K., Smit, N., Kolb, A. 2003. *Melanoma Research*. 13 (6). 543 – 548.
- Catherine, D., Epel, T., Epel, D. 2003. Nitric Oxide in Oocyte Maturation, Ovulation, Fertilization, Cleavage and Implantation: A little dab'll do ya. *Current Pharmaceutical Design*. 9. 399 – 409.

- Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. 2013. Oogenesis. Springer-Verlag. London. 364. ISBN: 978-0-85729-825-6.
  
- Crocomo, L. F., Marques Filho, W. C., Sudano, M. J., Paschoal, D. M., Landim-Alvarenga, F. C., Bicudo, S. D. 2013. Effect of roscovitine and cyclohexamide on ultrastructure of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*. 109 (2-3). 156 – 162.
  
- Dixit, V. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxid and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65 (1 – 2). 1 – 16.
  
- Fortyn, K., Horak, V., Hruban, V., Tichy, J. 1998. Exceptional occurrence and extent of malignant melanoma in pig. *Veterinárni medicína*. 43 (3). 87 – 91.
  
- Gee, C. M., Geissinger, H. D., Liptrap, R. M. 1991. Morphometric and steroid hormone changes associated with experimental anovulatory follicles in the sow. *Canadian Journal of Veterinary Ressearch*. 55 (3). 206 – 211.
  
- Geffrotin, C., Crechet, F., Le Roy, P., Le Chalony, C., Leplat, J.-J., Iannuccelli, N., Barbosa, A., Renard, C., Gruand, J., Milan, D., Horák, V., Tricaud, Y., Bouet, S., Franck, M., Frelat, G., Vincent-Nalleau, S. 2004. Identification of five chromosomal regions involved in predisposition to melanoma by genome-wide scan in the MeLiM swine model. *International Journal of Cancer*. 110 (1). 39 – 50.
  
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19 (10). 875 – 882.
  
- Goud, P. T., Goud, A. P., Najafi, T., Gonik, B., Diamond, M. P., Saed, G. M., Zhang, X., Abu-Soud, H. M. 2014. Direct Real-Time Measurement of Intra-Oocyte Nitric Oxide Concentration *In Vivo*. *PLoS ONE*. 9 (6).

- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 509. ISBN: 0-683-30577-8.
  
- Heytens, E., Soleimani, R., De Sutter, P. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 6 (4). 171 – 174.
  
- High, W. A., Stewart, D., Wilbers, Ch. R. H., Cockerell, C. J., Hoang, M. P., Fitzpatrick, J. E. 2005. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with nodal and/or visceral metastases: A report of 5 cases and assessment of the literature and diagnostic criteria. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 53 (1). 89 – 100.
  
- Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., Klaudy, J. 1999. Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cellular and Molecular Biology*. 45 (7). 1119 – 1129.
  
- Hruban, V., Horák, V., Fortýn, K., Hradecký, J., Klaudy, J., Smith, D. M., Reisnerová, H., Majzlík, I. 2004. Inheritance of malignant melanoma in the MeLiM strain of miniature pigs. *Veterinární medicína*. 49 (12). 453 – 459.
  
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (1). 122 – 130.
  
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3 (3). 265 – 271.
  
- Kauffold, J., Althouse, G. C. 2007. An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. *Theriogenology*. 67 (5). 901 – 911.

- Knox, R. V., Althouse, G. C. 1999. Visualizing the reproductive tract of the female pig using real-time ultrasonography. *Swine Health Prod.* 7 (5). 207 – 215.
  
- Komárek, V., Bukvaj, J., Hampl, A., Holman, J., Král, A., Ponižilová, E., Pravda D., Torda, M. 1964. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.* 387.
  
- König, H. E., Liebich, H. G. 2002. *Anatomie domácích savců 2. díl: Splanchnologie, cévní a nervová soustava. Hajko & Hajková. Bratislava.* 416. ISBN: 80-88700-57-4.
  
- Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science.* 82 (13). E14 – E23.
  
- Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosomes Condensation Activity. *Biology of Reproduction.* 62 (1). 292 – 302.
  
- Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. 2008. Estrogens in Relation to their Environmental Occurrence. *Critical Reviews in Toxicology.* 32 (2). 113 – 132.
  
- Landim-Alvarenga, F. C., Maziero, R. R. D. 2014. Control of oocyte maturation. *Animal Reproduction.* 11 (3). 150 – 158.
  
- Le Chalony, C., Renard, C., Vincent-Naulleau, S., Crechet, F., Leplat, J.-J., Tricaud, Y., Horák, V., Gruand, J., Le Roy, P., Frelat, G., Geffrotin, C. 2003. CDKN2A region polymorphism and genetic susceptibility to melanoma in the melim swine model of familial melanoma. *International Journal of Cancer.* 103 (5). 631 – 635.
  
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., Mermillod, P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology.* 57 (5). 1523 – 1532.

- Menzies, S. W., McCarthy, W. M. 1997. Complete regression of primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Surg*. 132 (5). 553 – 556.
- Miyano, T., 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 51 (2). 169–176.
- Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reviews of Reproduction*. 72 (1). 323 – 328.
- Motlík, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87 – 96.
- Najbrt, R., Bednář, K., Červený, Č., Kaman, J., Mikyska, E., Štarcha, O. 1982. *Veterinární anatomie 2*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 594.
- Oberlender, G., Pontelo, T. P., Miranda, J. R., Miranda, D. R., Zangeronimo, M. G., Silva, A. C., Rocha, L. G. P. 2014. Morphological and morphometric evaluation of prepubertal gilt ovaries, uterine tubes and uterus at different oestrus cycle stages. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34 (1). 83 – 90.
- Paredes, B. E., 2007. Regression in malignant melanoma. Definition, etiopathogenesis, morphology and differential diagnosis. *Pathologie*. 28 (6). 453 – 463.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005. Activation of Pig Oocytes Using Nitric Oxide Donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71. 115 – 122.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145 (1-2). 27 – 37.



- Plánská, D., Burocziová, M., Strnadel, J., Horák, V. 2015. Immunohistochemical Analysis of Collagen IV and Laminin Expression in Spontaneous Melanoma Regression in the Melanoma-Bearing Libechov Minipig. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 48 (1). 15 – 26.
- Putz, A. M., Tiezzi, F., Maltecca, C., Gray, K. A., Knauer, M. T. 2015. Variance component estimates for alternative litter size traits in swine. *Journal of Animal Science*. 93 (11). 5153 – 5163.
- Rambow, F., Malek, O., Geffrotin, C., Leplat, J.-J., Bouet, S., Piton, G., Hugot, K., Bevilacqua, C., Horak, V., Vincent-Naulleau, S. 2008. Identification of differentially expressed genes in spontaneously regressing melanoma using the MeLiM Swine Model. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 21 (2). 147 – 161.
- Rastogi, S. C. 2007. *Essentials of Animal Physiology*. New Delhi. 597. ISBN: 978-81-224-2429-4.
- Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing. Praha. 473. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Romar, R., Coy, P., Rath, D. 2012. Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. *Theriogenology*. 78 (5). 1126 – 1139.
- Schatten, H., Constantinescu, G. M. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 402. ISBN: 978-0-8138-1554-1.
- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. 60 (9). 1609 – 1620.
- Sova, Z., Bukvaj, J., Koudela, K., Kroupová, V., Pješčak, M., Podaný J. 1981. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 511.

- Suizu, F., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T., Tokumitsu, H., Hosoya, H. 2002. Characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I as a myosin II regulatory light chain kinase in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*. 367 (2). 335 – 345.
  
- Sun, Q.-Y., Lai, L., Bonk, A., Prather, R. S., Schatten, H. 2001a. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (2). 192 – 198.
  
- Sun, Q.-Y., Lai, L., Park, K.-W., Kühholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001b. Dynamic Events Are Differently Mediated by Microfilaments, Microtubules, and Mitogen-Activated Protein Kinase During Porcine Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biology of Reproduction*. 64 (3). 879 – 889.
  
- Sun, Q.-Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (5). 347 – 359.
  
- Svoboda, M., Eichlerová, K., Horák, V., Hradecký, J. 2005. Development of Haematological Indices in Melanoma-bearing Liběchov Minipigs. *Acta veterinaria Brno*. 74. 603 – 611.
  
- Tao, Y., Xie, H., Hong, H., Chen, X., Jang, J., Xia, G. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13 (2). 1 – 9.
  
- Thibault, C., Szöllösi, D., Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement*. 27 (5). 865 – 896.

- Vincent-Naulleau, S., Le Chalony, C., Leplat, J., Bouet, S., Bailly, C., Spatz, A., Vielh, P., Avril, M., Tricaud, Y., Gruand, J., Horak, V., Frelat, G., Geffrotin, C. 2004. Clinical and Histopathological Characterization of Cutaneous Melanomas in the Melanoblastoma-Bearing Libechov Minipid Model. *Pigment Cell Research*. 17 (1). 24 – 35.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.
- Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7 (1). 2006 – 2022.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The Mammalian Ovum; In: Knobil, E., Neill, J. D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 79 – 121.
- Wehrend, A., Meinecke, B. 1998. The Meiotic Cell Cycle in Oocytes of Domestic Animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 33 (3-4). 289 – 297.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*. 1 (1). 127 – 135.
- Zhang, M., Xia, G. 2011. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 69 (8). 1279 – 1288.
- Zhao, X., Yu, D., Feng, C., Deng, X., Wu, D., Jin, M., Wang, E., Wang, X., Yu, B. 2014. Role of Greatwall kinase in release of mouse oocytes from diplotene arrest. *Development, Growth & Differentiation*. 56 (9). 669 – 678.