

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Histologie zárodečných buněk ve vaječníku štěněte v postnatálním období

Diplomová práce

Autor práce: Daniela Hartmannová

Vedoucí práce: prof. Ing. Jiří Rozinek, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Histologie zárodečných buněk ve vaječníku štěněte v postnatálním období 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4. 2013

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat panu prof. Ing. Jiřímu Rozinkovi, CSc. za uvedení do problematiky daného tématu, jeho cenné rady, ochotu a optimismus.

Dále také děkuji Ing. Magdaleně Hirschové za velkou pomoc při shánění materiálu, bez kterého by tato práce nemohla vzniknout.

Ráda bych také poděkovala panu MVDr. Ladislavu Mladému a MVDr. Igorovi Svobodníkovi za pomoc při shánění materiálu a informací z oblasti veterinární medicíny.

V neposlední řadě chci také velmi poděkovat celé mojí rodině a nejbližším za velkou podporu při studiu.

Souhrn

Vývoj vaječnicku a jeho funkční struktury, folikulu, je klíčovým jevem v rozmnožování všech savců. U hospodářských zvířat se setkáváme s velmi podrobným popisem vývoje vaječnicku v prenatalním a perinatálním období a máme tak ucelenou představu o tom, v jakém časovém úseku a jak dochází ke vzniku folikulů ve vaječnicku hospodářských zvířat. V literatuře zabývající se embryologií a histologií tento popis vývoje vaječnicku u feny chybí.

V obecné části této práce bylo hlavním úkolem shromáždit veškeré dostupné informace popisující vývoj vaječnicku v prenatalním, popř. postnatálním období. Vzhledem k tomu, že vývoj vaječnicku je u všech savců velmi obdobný, vycházeli jsme nejen z literatury veterinární embryologie a histologie, ale také z oblasti humánní medicíny. V praktické části jsme zpracovali vaječnický jedenácti štěňat různého věku a jedné dospělé feny do histologických preparátů, které jsme následně mikroskopovali a vyhodnocovali. Veškerý materiál byl získán z uhynulých štěňat krátce po porodu nebo u nich byla provedena euthanasie veterinárním lékařem z důvodu závažného onemocnění. Vaječnick dospělé feny byl odebrán při kastraci.

Na preparátech vaječnicků štěňat starých několik dní jsme nepozorovali žádné primární folikuly ani primordiální zárodečné buňky. U vaječnicku štěňat jsou dobře pozorovatelná hnízda oogonií, která jsou v blízkosti epitelu menší a směrem do vnitřní vrstvy kůry se zvětšují. Jednotlivá hnízda jsou oddělena vazivovými buňkami vytvářející provazce směrem z vnitřní vrstvy kůry vaječnicku k epitelu a doprovodnými epiteliálními buňkami oddělujícími se přímo z epitelu. Formování primordiálních folikulů bylo pozorováno až u štěňate ve věku 42 dní. Pro porovnání jsme použili histologický preparát vaječnicku kotěte uhynulého 1. a 6. den po porodu. Již u kotěte starého jeden den pozorujeme primární folikuly, primordiální zárodečné buňky a množící se oogonie, které tvoří pruhy (Pflügerovy provazce).

Z tohoto pozorování jsme vyvodili závěr, že vývoj vaječnicku u feny je posunut až do postnatálního období a dále také, že primordiální zárodečné buňky se nacházejí již v základu vaječnicku a v průběhu vývoje cestují k epitelu, kde dochází k jejich množení.

Klíčová slova: vaječnick, folikul, oogonie, fena, vývoj, prenatalní, postnatální

Summary

Development of an ovary and its functional structure – a follicle - plays a key role in sexual reproduction of all mammals. Wide range of literature gives us detailed information about the development of ovaries in prenatal and perinatal period. In livestock, there is available complete description of formation follicles and its time period. However, we have no picture of this phenomenon in bitches in embryologic and histologic literature.

In the theoretical part of this thesis, we gathered all available information on development of an ovary in prenatal, eventually postnatal period. Whereas the ovary development is similar in all mammals, this research was based not only on veterinary embryology and histology but also on human medicine. In the practical part, we processed the histological preparations of ovaries from eleven puppies of various ages and one adult bitch. The samples were microscoped and evaluated afterwards. All the material was gathered from animals who died right after the birth or puppies euthanized because of serious illness. The ovary of adult bitch was obtained during the castration.

We didn't observe any primary follicles nor primordial germinal cells. In ovaries of pups, the nests of oogonia, which are smaller when closer to epithelium and getting bigger towards the inner layer of the cortex are well observable. Individual nests are detached by fibrous cells and accompanying epithelial cells. The fibrous cells form strings coming from the inner layer of cortex towards the epithelium. The formation of primary follicles was not observed until 42 weeks of the pup's age. For comparison, we used histological preparations of kittens which died at the first and the sixth day after the birth. In a kitten one day old, we already observed primary follicles, primordial germinal cells and multiplying oogonia making stripes (Pflugerovy provazce neumím přeložit, asi budeš znát z vlastní cizojazyčné literatury).

The conclusion of this exploration is that development of an ovary of a bitch is shifted to the postnatal period and that primordial germinal cells are located in the base of an ovary and during the development they migrate towards the epithelium, where they multiply.

Key words: ovary, follicle, oogonia, bitch, development, prenatal, postnatal

Obsah

1	ÚVOD	2
2	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	3
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	4
3.1	Prenatální vývoj vaječníku	4
3.1.1	Indiferentní stádium	5
3.1.2	Vývoj vaječníku	7
3.1.3	Vývodné cesty pohlavní	10
3.2	Stavba vaječníku ženy	11
3.2.1	Anatomická stavba	11
3.2.2	Histologická stavba	12
3.3	Folikulogeneze	13
3.3.1	Primordiální folikuly	14
3.3.2	Primární folikuly	15
3.3.3	Sekundární folikuly	16
3.3.4	Terciární folikuly	18
3.4	Oogeneze	20
3.4.1	Fáze množení	20
3.4.2	Fáze růstu	22
3.4.3	Fáze zrání	23
3.5	Ovulace	24
3.5.1	Mechanismus ovulace	24
3.5.2	Žluté tělísko	26
4	MATERIÁL A METODY	28
4.1	Materiál	28
4.2	Metody	29
5	VÝSLEDKY	32
6	DISKUZE	49
7	ZÁVĚR	54
8	SEZNAM LITERATURY	55
9	PŘÍLOHY	58

1 Úvod

Rozmnožování je jedna ze základních vlastností živých organismů. Podstatnou funkci v celém procesu rozmnožování mají vaječníky jako důležitá součást pohlavní soustavy. Vaječníky jsou párová samičí žláza, jejíž hlavní úlohou je produkce samičích pohlavních buněk, hormonů a vývoj folikulů. Folikuly jsou hlavní strukturou vaječníku, neboť jsou v nich obsaženy vaječné buňky oocyty, které zajišťují oplození a může tak docházet ke vzniku nového jedince.

V dostupné literatuře můžeme najít mnohé informace o embryonálním a časně postnatálním vývoji vaječníků hospodářských zvířat. Literatura, která by popisovala tento vývoj u psa, feny, zatím chybí. Proto bylo úkolem této práce shromáždit dostupné informace o embryonálním a časně postnatálním vývoji vaječníků a následně porovnat s výsledky z praktické části této diplomové práce.

Naším cílem v praktické části této práce bylo zhotovit histologické preparáty vaječníků štěňat několik dnů po narození a dospívajících fen, abychom mohli posoudit, je-li utváření struktury v postnatálním období srovnatelné s většinou hospodářských zvířat, u kterých je tento vývoj dobře popsán.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Oproti hospodářským zvířatům (prase, skot, kůň) je u šelem vznik, množení a vývoj samičích pohlavních buněk oogonií posunut z fetálního období až do období okolo narození mláďete. Předpokládáme, že následný vývoj oogonií a formování folikulů v kůře vaječníku je urychleno tak, aby na začátku puberty byly vaječníky zcela funkční. V dostupné literatuře tyto informace chybí.

Naším cílem bylo zpracovat pro histologické vyšetření vaječníky čerstvě narozených štěňat, vaječníky po několika dnech života štěněte a vaječníky dospívajících psů. Po vyšetření a vyhodnocení histologických preparátů popsat vývoj oogonií a formování folikulů v korové vrstvě vaječníků štěňat a mladých psů. Dále se také pokusit stanovit posloupnost vývoje kůry vaječníku u psa.

3 Literární řešerše

3.1 Prenatální vývoj vaječníku

Pohlavní ústrojí se u obou pohlaví vyvíjí ze stejného základu a prochází tedy určitou dobu indiferentním obdobím. Teprve později dochází k diferenciaci v samčí a samičí pohlavní ústrojí. Pohlavní žlázy se zakládají v bederní oblasti zárodku z močopohlavních lišt, ze kterých následně vznikají pohlavní žlázy neboli gonády a ledviny (Marvan a kol., 2007).

Vývoj pohlavních orgánů je v úzkém vztahu s vývojem orgánů vylučovací soustavy. Společným výchozím základem jsou tzv. stopky prvosegmentů, neboli nefrotomy, které spojují prvosegmenty s nesegmentovaným mezodermem somatopleury a splachnopleury. Z kraniálních nefrotomů vznikají kanálky *pronefros*, z nichž mnohé nemají ani *lumen* a spojují se v podélný provazec, základ Wolffova vývodu. Od 8. – 9. prvosegmentu nefrotomy ztrácejí segmentální uspořádání a splývají v souvislý buněčný pás, tzv. nefrogenní blastém. Wolffův vývod vzniká splynutím kanálků *pronefros*, prorůstá proliferací buněk kaudálním směrem, až u embryí ve stadiu 27 – 28 prvosegmentů vrostle do kloaky, luminizuje se a stává se vývodem v pravém slova smyslu (Klika a kol., 1985).

Souvislý pás nefrogenního blastému vzhledem k budoucí diferenciaci lze rozdělit na úsek mezonefrogení a na krátký kaudální úsek metanefrogení. Pás mezonefrogeního blastému se dále rozčleňuje v buněčné segmenty, jejichž počet je značně vyšší nežli počet prvosegmentů. Z těchto segmentů se postupně diferencují váčky a kanálky *mezonefros*, které se laterálně napojují na Wolffův vývod. Wolffův vývod se stává vývodem *mezonefros*, ústící do kloaky, respektive do již oddělené její ventrální části, zvané *sinus urogenitalis*. V souvislosti s rychlou diferenciací *mezonefros* jeho váčky a kanálky vyklenují tělní dutinu do dutiny célomové po obou stranách dorzálního mezenteria v mohutný podélný val, nazývaný urogenitální lišta. Při jejím laterálním okraji probíhá *ductus Wolffī*, laterodorzální část zaujímá vlastní *mezonefros* a medioventrální část se stává základem pohlavní žlázy. Tím dochází k rozdělení *plica urogenitalis* v laterální *plica mesonefrica* a mediální *plica genitalis* (Klika a kol., 1985).

Začátkem 6. týdne vzniká laterálně od Wolffova vývodu nový kanálek, zvaný Müllerův. Müllerův kanálek se zakládá vchlípením célomového epitelu pokrývajícího ventrolaterální plochu *plica urogenitalis*. Nálevkovité ústí zůstává otevřeno do dutiny tělní, slepý konec

prorůstá kaudálním směrem do mezenchymu urogenitální lišty a postupně se luminizuje v Müllerův kanálek (*ductus paramesonephricus*). Ten probíhá nejdříve paralelně s *ductus mesonephricus*. Při vstupu do pánevní dutiny kříží z ventrální strany kanálek Wolffův, tím se dostává na jeho mediální stranu a pravý i levý Müllerův kanálek se přikládají těsně k sobě a ústí do *sinus urogenitalis*. Kaudální úsek obou dvou kanálků probíhá v provazci mezenchymu vytvořeném ve střední čáře splynutím prodlouženého konce pravé a levé urogenitální lišty, zvaném genitální provazec. Ten je uložen ventrálně od základu rekta a dorzálně od *sinus urogenitalis*, do něhož ústí jak Müllerovy, tak i Wolffovy kanálky (Vacek, 2006).

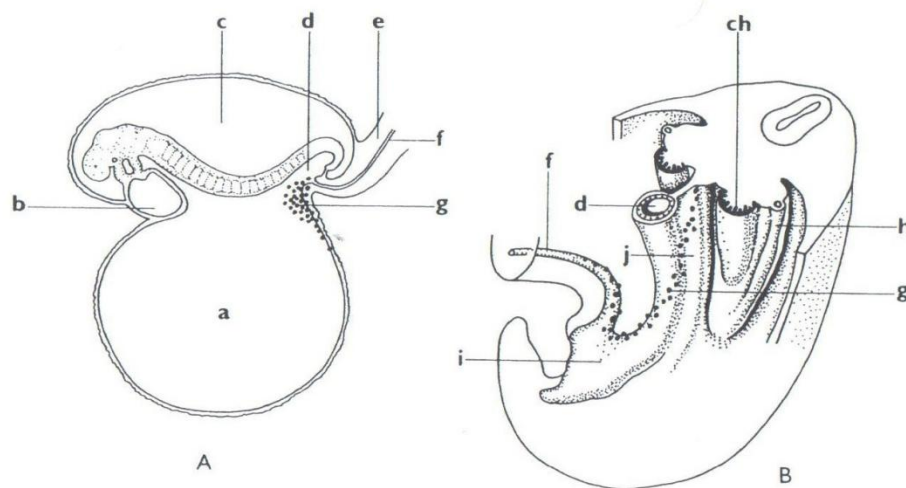
Geneticky je pohlaví determinováno přítomností chromozómu Y v okamžiku oplození. Chromozom Y je nositelem lokusu genu SRY. Chromozom Y určuje samčí pohlaví primárně a transkripční faktor exprimovaný SRY – genem podmiňující diferenciaci varlat (*testis*). Za nepřítomnosti genu SRY, tedy chromozomu Y, se vyvine samičí pohlaví (Vacek, 2006). Klika a kol. (1985) uvádí, že i přes tuto skutečnost prochází vývoj pohlavních žláz indiferentním stádiem, v němž nelze podle tvaru ani struktury rozlišit, zda jde o základ mužské či ženské pohlavní žlázy. Dále dochází ke stádiu diferenciaci, kdy se indiferentní základ mění ve varle nebo vaječník (Klika a kol., 1985).

3.1.1 Indiferentní stádium

Samčí i samičí pohlavní žlázy vznikají v prenatalním období vývoje jedince ze společného indiferentního základu. Základ tvoří pohlavní lišta, *plica genitális*, která je mediální částí močopohlavní lišty, *plica urogenitalis*. Tato lišta se odděluje z prvosegmentů po stranách hřbetní struny od krční až po bederní oblast. Pohlavní žlázy se netvoří z celé močopohlavní lišty, ale pouze z její bederní části, u kraniálního úseku základu definitivní ledviny (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Pohlavní lišta je pokryta célovým epitelem a uvnitř je tvořena mezenchymem (Rozinek a Jeřeta, 2012). Mezodermový célový epitel na povrchu pohlavní lišty je zpočátku plochý, dále dochází k jeho zvýšení a zmnožení a mezi jeho buňky vcestují buňky prvopohlavní, gonocyty (Klika a kol., 1985). Gonocyty vznikají již ve 3. týdnu gravidity v mezenchymu žloutkového váčku, allantois a kloaky (Malínský a Lichnovský, 2008). Tento povrchový epitel se někdy též nazývá zárodečný (Klika a kol., 1985). Zárodečný epitel dostal pojmenování na základě chybného názoru, že z něho vznikají kmenové buňky pro vývoj

pohlavních buněk. Název se zachoval a používá se i přes to, že primordiální pohlavní buňky nevznikají v zárodečném epitelu, ale mají extragonádální původ a pocházejí z entodermu (Belák a kol., 1990). Klika a kol. (1985) uvádí, že původ gonocytů není přesně objasněn, většinou jsou odvozovány z entodermu, pravděpodobně se diferencují ještě dříve, již v průběhu začátku diferenciaci zárodečných listů. Od entodermových buněk se gonocyty odlišují větší velikostí, světlou, slabě se barvící cytoplazmou, bohatou glykogenem a vyznačují se vysokou aktivitou alkalické fosfatázy (Klika a kol., 1985). Čihák a kol. (2002) popisuje vývoj primordiálních zárodečných buněk (gonocytů) u člověka. Podle Čiháka a kol. (2002) se gonocyty oddělují od budoucích buněk těla embrya již kolem 10. dne vývoje z epiblastu a dostanou se do povrchové vrstvy následně vytvořeného zárodečného terčíku.



Obr. 1 A – embryo člověka 3. týdny staré, B – embryo člověka 4 týdny staré (Klika a kol., 1985)

a – žloutkový váček, b – dutina perikardiální, c – dutina amniová, d – zadní kapsa střevní, e – zárodečný stvol, f – *allantois*, g – gonocyty, h – *ductus Wolffii*, ch – *plica genitalis*, i – kolaka, j – *mesenterium dorsale*

Prvopohlavní buňky dále migrují amébovitým pohybem podél dorzálního mezenteria do zadního střeva a odtud počátkem 5. týdne do genitální lišty, zejména do její střední části, kde se nacházejí buňky célomového epitelu (Vacek, 2006). Povrchový célomový epitel genitální lišty proliferuje a vysílá do hloubky primární epitelové trámce. Základ gonády se rozdělí na povrchovou vrstvu, kortikální a hlubokou, medulární, která sousedí s kanálky *mezonefros* (Malínský a Lichnovský, 2008). Klika a kol. (1985) a Vacek (2006) shodně uvádějí, že buňky célomového epitelu, které pokrývají genitální lištu, se rychle zmnožují z jednovrstevného epitelu v mnohovrstevný a ten asi v 6. týdnu na mnoha místech vrůstá

dovnitř mezenchymu genitální lišty ve formě solidních buněčných provazců, zvaných medulární, směrem ke kanálkům *mezonefros*. U varlete dávají tyto buněčné provazce základ semenotvorným kanálkům varlete. Avšak u základu vaječníku se tyto buněčné provazce rozpadají a stávají se součástí dřene vaječníku (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Současně s tímto dějem dojde ke zvětšení základu gonád, který se oddělí od mezonefrické lišty i od stropu tělní dutiny. Zachovaná zůstane pouze spojka, tvořená duplikaturou somatopleury – *mesogenitale* (Horký a Mikyska, 1984). Ještě před oddělením základu gonád od mezonefrické lišty zůstávají medulární provazce spojeny s célovým epitelem a není zatím možné rozlišit pohlaví. Při proliferaci medulárních provazců se mezi jejich buňky dostávají dovnitř genitální lišty buňky prvopohlavní, gonocyty. Vcestování gonocytů do genitální lišty je determinující podmínkou další přeměny genitální lišty v gonádu (Vacek, 2006).

3.1.2 Vývoj vaječníku

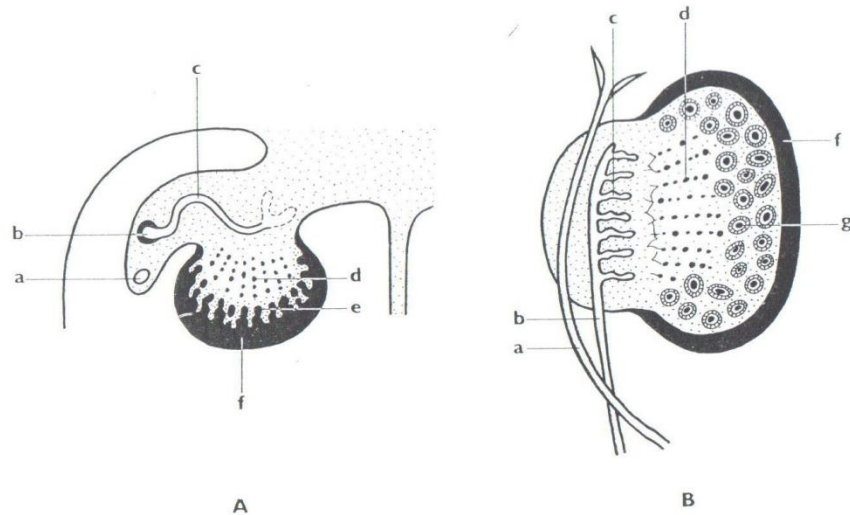
Diferenciace ženského pohlaví je determinována především absencí chromozomu Y odpovědného za maskulinizaci. Znemožněním diferenciace Sertoliho buněk, produkujících antiparamezonefrický hormon, je zabráněno involuci *ductus paramesonephricus*. Ten se dále rozvíjí působením estrogenů v ženské pohlavní orgány (Vacek, 2006).

V základu vaječníku se prvopohlavní buňky pohybují k povrchu žlázy, až se zapojí do povrchového kubického epitelu vaječníku a vytvoří zárodečný epitel vaječníku (Rozinek a Jeřeta, 2012).

K přeměně na samičí pohlaví dochází tak, že z célového epitelu se propagují medulární buněčné pruhy do mezenchymu základu vaječníku. Prorůstají směrem do *mesogenitale*, které se tak mění v *mesovarium*, jež jako duplikatura splachnopleury připevňuje ovarium ke stropu dutiny tělní (Horký a Mikyska, 1984).

Zatímco při vývoji varlete medulární provazce, které se zakládají primární proliferací célového epitelu během indiferentního stádia, se zřetelně ohraničují ve svém vývoji, při vývoji vaječníku rychle ztrácejí konfiguraci provazců, rozpadají se a jejich zbytky mizí v základu dřene vaječníku. Malé zbytky dřevných (medulárních) provazců se dostávají ke zbytkům kanálků *mezonefros* a spolu s nimi vytváří rudimentální *rete ovarii* (Klika a kol.,

1985; Vacek, 2006). Tichý a kol. (2004) shodně uvádějí, že zbytky dřevných provazců se nacházejí ve dřeni vaječníku a mohou někdy přetrvávat v podobě rudimentárního *rete ovarii*. Stejně tak pozůstatky mezonefrických kanálků v oblasti *mesogenitale* za určitých okolností vytvoří soubor slepě zakončených dutin či tubulů zvaných *epoophoron* (Tichý a kol., 2004).



Obr. 2 A – embryo člověka ve věku 8. týdnů, B – plod člověka ve věku 5. měsíců (Klika a kol., 1985)

a – *ductus Müllerii*, b – *ductus Wolffii*, c – kanálek *mezonefros*, d – zbytky medulárních provazců, e – kortikální provazce tvořící základ blastému kůry, f – célový epitel, g – primární folikul

V diferencujícím se vaječníku zaniká medulární část, včetně přilehlých kanálků. Povrchový célový epitel pokračuje v proliferaci, vytváří kortikální provazce, do kterých vcestují gonocyty, diferencující se na oogonie (Malínský a Lichnovský, 2008). Tato druhá generace provazců, zvaných též kortikální, je základem kůry vaječníku (*zona corticalis*). Uspořádání buněk v provazce přestává být brzy patrné rychlým množením ženských pohlavních zárodečných buněk oogonií, takže již ve 3. měsíci nabývá kůra charakteru souvislého blastému. V blastému převládají velké světlé oogonie s měchýřkovitým jádrem, mezi nimiž se nacházejí malé indiferentní buňky célového epitelu a buňky mezenchymové. Indiferentní buňky célového epitelu se poté diferencují ve folikulární buňky (Klika a kol., 1985; Vacek, 2006). Tento proces probíhá v těle štěněte, fenky, těsně před narozením a končí v prvních dnech po porodu. Pokračováním je pak oogeneze a folikulogeneze (Rozinek a Jeřeta, 2012). Blackmore a kol. (2004) uvádějí, že folikulogeneze u psa probíhá 2. – 12. týden po narození. Dále také popisují, že u 16 týdnů staré fenky byly pozorovány primordiální

folikuly, primární folikuly, sekundární folikuly, časné preantrální folikuly, antrální folikuly a folikuly, které obsahovaly více oocytů. Nebyla zaznamenána žádná žlutá tělíska, což dokazuje, že u takto staré fenky nedochází k ovulaci. Některé folikuly obsahovaly více oocytů, což je jev, který byl již dříve zaznamenán u juvenilních psů (Blackmore a kol., 2004). Je zajímavé, že v jednom folikulu, který obsahoval více oocytů, se tyto oocyty nacházely v různých stádiích vývoje (Barber a kol., 2001). Příčina a význam tohoto jevu zůstávají neobjasněny, ale pravděpodobně k tomuto dochází z důvodu velké hustoty primordiálních folikulů u mladých fen, které se mohou následně spojovat (Luvoni a kol., 2005).

Oogonie se mitoticky dělí a vzniká jich velké množství. Folikulární buňky se řadí kolem oogonie a dochází tak k zakládání primárních folikulů, které jsou uloženy v korové vrstvě vaječníku. U feny a kočky se tyto primární folikuly zakládají až v době těsně okolo porodu (Rozinek a kol., 1995). Všechny primární folikuly nedozrávají. Část jich zaniká ještě v intrauterinním životě, část po narození, takže do období dosažení pohlavní dospělosti se jejich počet podstatně snižuje. Další vývoj primárních folikulů se zastavuje a pokračuje až v období pohlavní dospělosti samice (Horký a Mikyska, 1984). Shodně uvádějí i Klika a kol. (1985) a Vacek (2006), že po vytvoření obalu z folikulárních buněk se oogonie přestávají mitoticky dělit a přecházejí do stadia růstu, zvětšují se a mění v oocyty. Oocyty ještě ve fetálním období vstupují do profáze redukčního dělení, které probíhá až do diplotenního stadia. V tomto stádiu se redukční dělení zastaví a pokračuje až s nástupem puberty. Toto období se také nazývá stadium diktyotenní (Klika a kol., 1985, Vacek, 2006). Oproti tomu Rozinek a Jeřeta (2012) uvádějí, že primární folikul sice svůj vývoj zastaví na konci profáze prvního meiotického dělení, ale v tomto stádiu čeká folikul i oocyt různě dlouho dobu na zahájení růstu folikulu i oocytu.

Rozinek a kol. (1995) popisují, že primordiální zárodečné buňky cestují z hlubších vrstev kůry vaječníku, od dřene, směrem k povrchovému epitelu. Uvádějí, že po kontaktu se zárodečným epitelem se začínají gonocyty intenzivně dělit a tím vytvářejí provazce a shluky nových buněk rostoucích směrem od povrchu kůry vaječníku ke dřeni, kde se z nich formují primordiální folikuly.

Z mezenchymu vnitřní části vaječníku při jeho závěsu, *mesovariu*, dochází k diferenciaci vaziva dřene vaječníku, *zona medularis* (Klika a kol., 1985, Vacek, 2006). Vazivo vniká i mezi folikuly do oblasti kůry a pod zárodečným epitelem se zahušťuje ve vazivovou blánu *tunica albuginea* (Horký a Mikyska, 1984). V dřeni vaječníku se nacházejí

přívodné i odvodné cévy a nervy. Z mezenchymových buněk se mohou diferencovat i buňky intersticiální, ale mnohem později a v nesrovnatelně menším počtu nežli v mužské pohlavní žláze (Klika a kol., 1985, Vacek, 2006).

3.1.3 Vývodné cesty pohlavní

Vývodné pohlavní cesty samice se vyvíjí zcela nezávisle na Wolffových vývodech, které ve většině případů zanikají (Horký a Mikyska, 1984). Část kanálků ovšem může přetrvávat v podobě slepě končících kanálků, uložených v širokém vazu děložním (*ligamentum latum uteri*) mezi vaječníkem a vejcovodem jako tzv. *epoophoron*, případně mohou komunikovat se slepě končícím zbytkem Wolfova vývodu (*ductus mesonephricus*), probíhající paralelně s vejcovodem, zvaný Gartnerův kanálek, *ductus epoophri longitudinalis* (Vacek, 2006).

Vývodné pohlavní cesty u samice vznikají z podstatné části *ductus Mülleri*. Jeho průběh se rozděluje na tři části. V kraniální části probíhá vertikálně, laterálně od *ductus Wolffii*. Ve střední části se stáčí horizontálně a kříží Wolffův vývod (Malínský a Lichnovský, 2008), kde dochází k vytvoření vejcovodu (Horký a Mikyska, 1984). Epitelová výstelka vejcovodu vzniká z célového epitelu mezonefrické lišty. Z okolního mezenchymu se vytvářejí další vrstvy jeho stěny jako vazivo a hladká svalovina. Z původního závěsu *mezonefros* zůstává zachována duplikatura serosy jako závěs vejcovodu (vejcovodové okružní – *mesosalpinx*), který upevňuje vejcovod k tělní stěně (Horký a Mikyska, 1984).

Kaudální část probíhá opět vertikálně, mediálně od Wolfova vývodu. Oboustranné Müllerovy vývody se zde spojují v jednotný kanálek nazývaný *canalis uterovaginalis* (Malínský a Lichnovský, 2008) ze kterého vzniká tělo a krček dělohy (Horký a Mikyska, 1984). U jednotlivých druhů zvířat je toto splynutí rozdílně rozsáhlé, což se projevuje v celkovém utváření dělohy. U šelem a prasete splynou konce Müllerových vývodů jen ve velmi malém rozsahu, a tak vzniká velmi krátké děložní tělo. Dojde tak k vytvoření dělohy dvourohé (Horký a Mikyska, 1984).

Z ventrální části embryonální kloaky vzniká i u samice močový měchýř (*urachus*), močová trubice a *sinus urogenitalis* (Rozinek a Jeřeta, 2012). Ke vzniku pochvy dochází z nejkaudálnější části *canalis uterovaginalis*. Poševní předsíň se vytváří z *sinus urogenitalis*,

který se vyklene proti *canalis uterovaginalis* a oba základy se pak spojí. Ostatní vrstvy poševní stěny se diferencují z mezenchymu (Horký a Mikyska, 1984).

3.2 Stavba vaječníku feny

3.2.1 Anatomická stavba

Vaječník je kompaktní orgán šedorůžové barvy a tuhoelastické konzistence, uložený v kaudální části břišní dutiny, blízko vstupu do dutiny pánevní (Marvan a kol., 2007). U feny a kočky zůstávají vaječníky uloženy vysoko dorzálně v bederní oblasti břišní dutiny a kaudálně od ledvin, čímž se liší od ostatních domácích savců, u kterých dochází k sestupu vaječníků, jehož rozsah je závislý na druhu zvířete (König a Liebich, 2002). Svoboda a kol. (2001) popisuje uložení vaječníku u feny ještě přesněji a to, že jsou uloženy za ledvinami přibližně 12 cm kaudálně od posledního žebra na levé straně a 10 cm na straně pravé. U samic, které byly vícekrát během života gravidní, dochází k většímu sestupu obou vaječníků kaudálněji a ventrálněji od ledvin (Evans a Christensen, 1979).

Velikost vaječníku u feny dosahuje asi 1 – 2 cm na délku a až 1,5 cm na šířku, zároveň je také jeho velikost ovlivňována individuálně i plemenně (Najbrt a kol., 1982). Marvan a kol. (2007) uvádí, že velikost vaječníku, jeho celkový tvar, vzhled povrchu a hmotnost se u pohlavně dospělých samic v průběhu pohlavního cyklu mění. Vaječník dospělé feny má hrbolatý povrch, protože se nad jeho povrch zvedají rostoucí a ovulační folikuly a pomalu zanikající žlutá tělíska (Rozinek a Jeřeta, 2012). Také Svoboda kol. (2001) popisují, že v průběhu ovariačního cyklu dochází k vývoji folikulů a žlutých tělísek a tím i ke zvětšování celkového povrchu vaječníků. Podle Svobody a kol. (2001) je levý vaječník aktivnější. Shodně to uvádějí i Kvapil a Kvapilová (2007) a navíc dodávají, že u většiny fen je levý vaječník těžší než pravý a obsahuje také více preovulačních folikulů.

Vaječník a vejcovod jsou připevněny k přednímu okraji širokého děložního vazů pomocí závěsů, vaječníků – *mesovarium* resp. vejcovodů – *mesosalpinx*. V těchto závěsných vazech probíhají důležité cévy a nervy pro tyto orgány. U psa, kočky a prasete lze rozpoznat kraniální vaz zárodečné žlázy, který u kočky obsahuje krevní cévy. *Mesosalpinx* pokračuje dále kraniálně od vejcovodu a vytváří tak závojovitý volný okraj. Dále mezi *extremitas uterina* vaječníku a hrotem děložního rohu se rozprostírá proximální úsek kaudálního vazů

vaječnicku nazývaný *ligamentum ovarii proprium*. Dohromady tyto závěsy a obaly vaječnicku tvoří vaječnickový vak neboli *bursa ovarica*. U feny je vaječnickový vak vybaven tukovým tělesem a obklopuje vaječnick úplně (König a Liebich, 2002).

Krev je do vaječnicku přiváděna párovou tepnou vycházející ze srdečnice (aorty), která anastomozuje kaudálně s děložními tepnami. Ovariální žíly doprovází tepny a ústí do *v. cava caudalis* na pravé straně a do levé ledvinné žíly na levé straně. Autonomní inervace je zajišťována vlákny sympatiku z ledvinového a srdečnicového komplexu (Svoboda a kol., 2001).

3.2.2 Histologická stavba

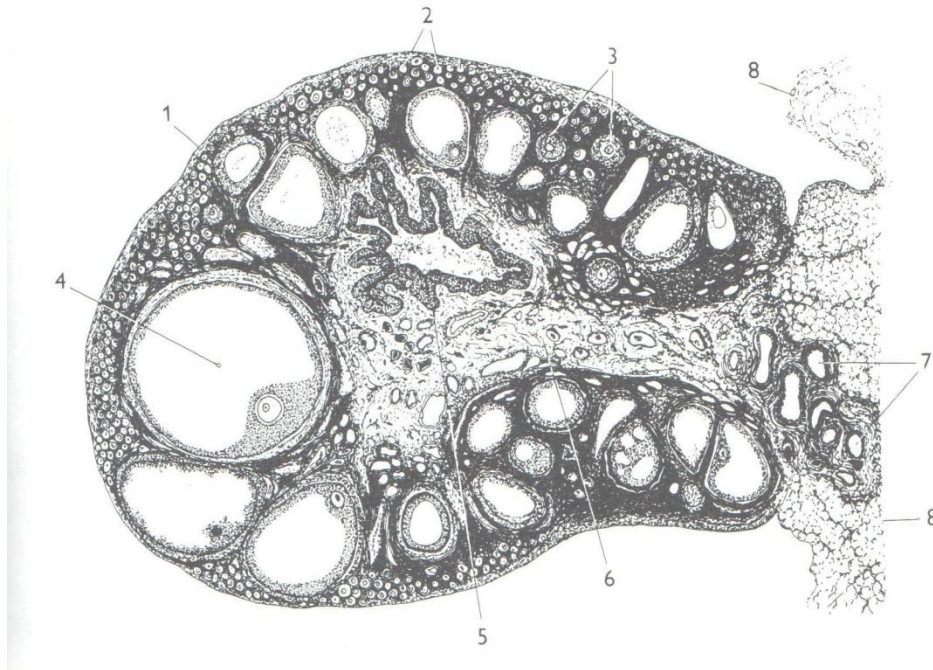
Vaječnick je pokrytý zárodečným epitelem, což je souvislá vrstva kubických nebo ve stáří plochých buněk, které se nedají vždy spolehlivě identifikovat. Tyto buňky mají na volném povrchu málo početné nepravidelné mikrokly (Belák a kol., 1990). Zárodečný epitel byl pojmenován z toho důvodu, že v krátkém úseku prenatalního vývoje samice do tohoto krycího epitelu docestují základní zárodečné buňky (PGC – primordial germ cells) a začnou se intenzivně dělit, spolu se sousedními epiteliálními buňkami, za vzniku provazců nebo hnízd oogonií a doprovodných buněk (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Zárodečný epitel pokrývá značný povrch vaječnicku většiny hospodářských zvířat. Na tomto místě dochází k ovalu neboli prasknutí zralých vaječnickových folikulů. Zbytek vaječnicku je pokrytý útrobním listem pobřišnice (Belák a kol., 1990).

Struktura vaječnicku je rozdělována na dvě části a to kůru a dřev (Evans a Christensen, 1979). Kůra vaječnicku obsahuje vaječnickové folikuly a jejich deriváty, žlutá tělíska, proto se označuje jako *zona parenchymatosa* (Belák a kol., 1990). Tyto folikuly jsou v různém stadiu vývoje (Reece, 1998). Dřev je bohatá na cévy a proto se nazývá *zona vasculosa* (Belák a kol., 1990). Dřev také obsahuje řídké kolagenní vazivo, mízní cévy a nervy (Reece, 1998). Korová vrstva je tvořena vazivovou kostrou, která se nazývá stroma. Stroma obsahuje hustě vedle sebe uložené fibrocyty vřetenovitého tvaru a malé množství kolagenních a retikulárních vláken. V závislosti na funkčním stavu vaječnicku mění fibrocyty kůry svůj tvar a vzhled. Jedná se o velmi dynamický systém, který se aktivně účastní všech významných pochodů ve vaječnicku, tj. výměny látek, výživy vaječných buněk a tvorby pohlavních hormonů (Marvan a kol., 2007). Pod povrchovou epitelovou vrstvou vaječnicku se nachází bělavý obal *tunica*

albuginea, což je zahuštěné kolagenní vazivo pokrývající celou plochu vaječníku (Reece, 1998).

V dřeni vaječníku se může nacházet i několik kanálků vystlaných cylindrickým epitelem, *rete ovarii*. Tyto kanálky jsou obdobou sítě varlat, *rete testis*, a mají rudimentární charakter (Belák a kol., 1990).



Obr. 3 Mikroskopická struktura vaječníku (Belák, 1990)

1 – zárodečný epitel, 2 – primární folikuly, 3 – sekundární folikuly, 4 – dozrávající Graafův folikul, 5 – žluté tělísko v involuci, 6 – stroma, 7 – cévy, 8 – *mesovarium*

3.3 Folikulogeneze

Proces vzniku a vývoje folikulů se označuje jako folikulogeneze. Během prenatalního období se na povrchu vaječníků vytvoří zárodečný epitel. V průběhu vývoje dochází k tomu, že se vaječnickové buňky diferencují, zanořují se a migrují do kůry vaječníků. Zárodečné buňky se ve fetálním vaječníku dělí, a tudíž již před narozením je ve vaječníku vytvořena zásoba folikulů (Vacek, 2006). Cibulka a kol. (2004) uvádějí, že před narozením nebo těsně po něm se vývoj těchto folikulů zastavuje a k folikulogenezi dochází opět až v pubertě po spuštění estrálního cyklu. Každá fena má tedy po porodu asi 100 000 prvovajíček, z nichž jen část během života dokončí svůj vývoj (Kolda, 1953). Rozinek a Jeřeta (2012) uvádějí, že

v kůře vaječníku ženy před dosažením pohlavní dospělosti je asi 50 000 folikulů. Bylo také zjištěno, že věk výrazně ovlivňuje počet folikulů ve vaječníku. Vaječnický peripubertálních žen, tj. ve věku 6 – 10 měsíců, obsahují mnohem větší počet folikulů než u žen prepubertálních (mladších 6 měsíců) a dospělých žen (starších 10 měsíců) (McDougall a kol., 1997). Telfer a Gosden (1987) uvádějí, že počet folikulů u ročních a dvouletých žen byl 85 000 a ve stáří 7 – 11 let došlo k úbytku na 3000 folikulů.

Folikuly jsou váčky obsahující samičí pohlavní buňky v různých stádiích vývoje. Každý folikul se skládá tedy z oocyty a obalu, který je tvořený folikulárními buňkami (Belák a kol., 1990). Folikulární buňky jsou svým apikálním pólem obráceny k oocyty a bazálním pólem sedí na bazální membráně, která odděluje folikul od okolního vaziva (Rozinek a Jeřeta, 2012). Podle mikroskopické struktury rozlišujeme tři typy vaječnickových folikulů, tj. primární, sekundární a terciární Graafovy folikuly (Belák a kol., 1990). Songsasen a Wildt (2007) rozdělují folikuly do pěti skupin a to podle morfologie, velikosti, počtu folikulárních buněk a přítomnosti folikulární tekutiny na primordiální, primární, sekundární, časně antrální a antrální folikuly.

3.3.1 Primordiální folikuly

Někteří autoři hovoří o prvním typu folikulů, a to tzv. primordiálních neboli zárodečných folikulech. Primordiální folikuly jsou tvořeny jednou vrstvou plochých buněk folikulárního epitelu, které se přeměňují v pozdějších stádiích diferenciaci ve vnitřní thekální buňky. Po přeměně plochého epitelu stěny folikulu v izoprismatický se hovoří o primárním folikulu (König a Liebich, 2002). Jedná se tedy o nejmenší folikul tvořený oogonií a jednou vrstvou plochých folikulárních buněk. Primární folikul je morfologicky shodný s primordiálním pouze s tím rozdílem, že zárodečnou buňku označujeme již jako oocyt, protože zde došlo k zahájení meiotického dělení (Rozinek a kol., 1995).

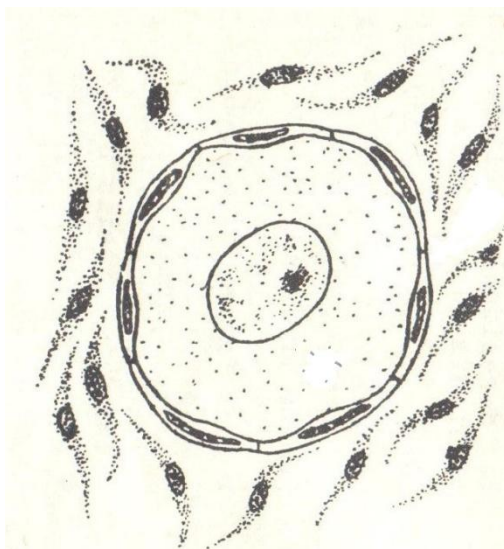
Primární folikuly se od narození simultánně vyvíjejí až v terciární folikuly s oocytem I. řádu a zase zanikají. Absence předovulační luteinizace folikulů a vzestupu hladiny progesteronu až do puberty zabraňuje ovulaci vajíčka a svolnosti ženy k páření. Celkový počet folikulů se do puberty snižuje na polovinu. Do 2 – 3 měsíců stáří ženy folikuly obsahují obvykle jeden oocyt, jedná se o tzv. monoovulární folikuly. Po tomto období dochází ke

zvýšení počtu tzv. polyovulárních folikulů, které obsahují 2 – 6 oocytů (Doležel a Kudláč, 1997).

3.3.2 Primární folikuly

Nejmenší a nejpočetněji zastoupené jsou primární folikuly, které se nacházejí jednotlivě nebo ve skupinách v nejzevnější vrstvě vaječnickové kůry, přímo pod bělavým obalem (Malínský a Lichnovský, 2009), okolní vazivo kůry je neuspořádané (Rozinek a Jeřeta, 2012). Jedná se kulovité útvary o velikosti 30 – 50 μm (Marvan a kol., 2007). Malínský a Lichnovský (2009) uvádějí, že primární folikul se zvětšuje až na 400 μm , zatímco primordiální folikul má velikost přibližně 30 μm .

Primární folikuly se skládají z centrálně uloženého oocytu I. řádu, okolo kterého se nachází souvislá vrstva plochých folikulárních buněk (Belák a kol., 1990), které mají nejprve vzhled jednovrstevného kubického epitelu (Malínský a Lichnovský, 2009). Podle Königa a Liebicha (2002) hovoříme o primárním folikulu teprve až po přeměně plochého epitelu stěny folikulu v izoprizmatický epitel. Oocyt I. řádu má velké, světlé, excentricky uložené jádro s velkým jadérkem. V membráně jádra jsou dobře vyvinuté jaderné póry. V cytoplazmě se nacházejí typické mitochondrie, váčky endoplazmatického retikula a Balbianiho tělíska složené z centriolu, Golgiho komplexu, endoplazmatického retikula, prstencových lamel a inkluzí (Belák a kol., 1990).



Obr. 4 Primární folikul (Vacek, 1980)

Marvan a kol. (2007) se domnívají, že převážná většina těchto folikulů se však dále nevyvíjí a podléhá zániku – atrézii. K atréziím primárních folikulů dochází v průběhu celého života samice, nejvíce však před obdobím puberty a v období končící pohlavní aktivity. I přesto zůstává ve vaječniku pohlavně dospělé samice mnohem větší množství folikulů, než může během celého jejího života dozrát.

3.3.3 Sekundární folikuly

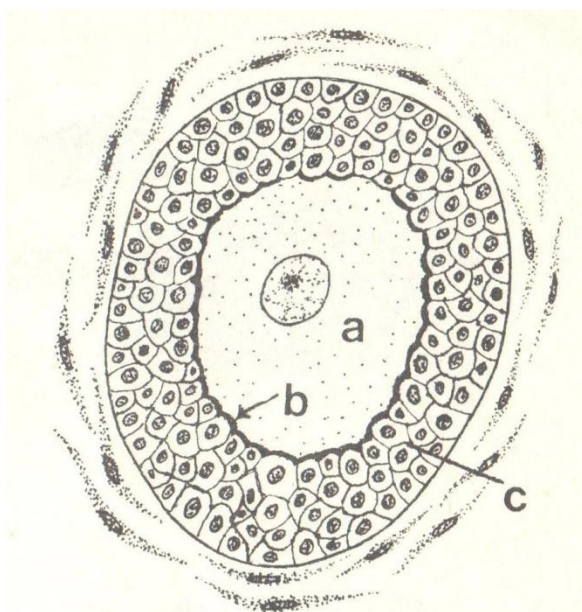
Marvan a kol. (2007) uvádějí, že s nástupem puberty se jednotlivé primární folikuly začínají postupně zvětšovat a tak přeměňovat v rostoucí sekundární folikuly. Tento růst se uskutečňuje v důsledku zvětšování objemu cytoplazmy primárního oocyty (Belák a kol., 2012). Dochází ke zvětšování folikulárních buněk z plochých na kubické a vyšší polyedrické buňky. Následně se zvyšuje počet vrstev folikulárních buněk kolem oocyty (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Současně s růstem a zvyšujícím se počtem folikulárních buněk dochází i ke zvyšování jejich sekreční aktivity. Okolo oocyty ohraničeného cytoplazmatickou membránou (*membrana vitellina*) se vytváří zpočátku tenký světlolomný a silně se barvící sekundární obal, který postupně hrubne. Tento sekundární obal vajíčka se nazývá *zona pellucida* a je produktem jednak folikulárních buněk a jednak vzniká sekreční aktivitou vajíčka (Belák a kol., 1990). Přes vrstvu *zona pellucida* procházejí tenké výběžky folikulárních buněk, které se vmáčknou do povrchu oocyty a vytvoří propustný spoj – gap junction mezi cytoplazmou folikulární buňky a cytoplazmou oocyty (Rozinek a Jeřeta, 2012). Stárnutím ovulovaného vajíčka se počet výběžků a mikrokulů zvyšuje (Belák a kol., 1990).

Dochází-li k dalšímu vývoji folikulu, dochází k dalšímu zmnožení folikulárních buněk a začínají okolo oocyty vytvářet epitelový obal *stratum granulosum*. Tento obal je oddělený od okolního vaziva tenkou blankou skládající se z retikulárních a kolagenových vláken. Tato vrstva je silně světlolomná, podle toho se odvozuje i její název tj. sklovitá (Slavjanského) membrána. Okolní vazivo se postupně diferencuje na vazivový obal *theca folliculi*. Úplný rozvoj všech vrstev stěny folikulu nastává až v období dozrávání folikulu (Belák a kol., 1990). Rostoucí folikul roste nejdříve směrem do hlubších vrstev kůry vaječniku, jako by se zanořoval. Z tohoto důvodu nejsou rostoucí folikuly okem a ani hmatem zjistitelné, protože nezvedají povrch vaječniku (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Má-li rostoucí folikul 4 – 5 vrstev folikulárních buněk kolem oocytu, začnou některé folikulární buňky produkovat folikulární tekutinu *liquor folliculi*, která vyplňuje mezibuněčné prostory mezi folikulárními buňkami. Tyto mezibuněčné prostory se postupně spojují, až dojde k vytvoření jednotné dutiny *antrum folliculi*. Takový folikul nazýváme časně antrální folikul. V tomto stadiu vývoje folikulu končí růst oocytu, dále se již oocyt nezvětšuje a vstupuje do fáze zrání. Folikulární dutina se dále zvětšuje a folikul pokračuje v růstu na velký antrální folikul a ovulační Graafův folikul (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Tichý a kol. (2004) rozdělují rostoucí neboli sekundární folikuly na unilaminární, multilaminární a vlastní folikuly sekundární. Unilaminární folikul má velikost 60 – 75 μm , jeho oocyt je dvojnásobně větší než oocyt primordiálního folikulu a původně ploché folikulární buňky se mění na kubické až cylindrické. Multilaminární folikul má průměr 0,2 – 0,25 mm a v tomto stádiu dochází k vytvoření z počátku tenké a postupně se zhušťující vrstvy *zona pellucida*. Vlastní sekundární folikul dosahuje velikosti 0,2 – 0,3 mm, folikulární buňky jsou uspořádány v 8 – 12 vrstvách a mezi folikulárními buňkami se začínají tvořit drobné dutinky vyplněné tekutinou, které postupně splynou v *antrum folliculi* (Tichý a kol., 2004).



Obr. 5 Sekundární folikul (Klika, 1980)

a – primární oocyt, b – zona pellucida, c – folikulární buňky

3.3.4 Terciární folikuly

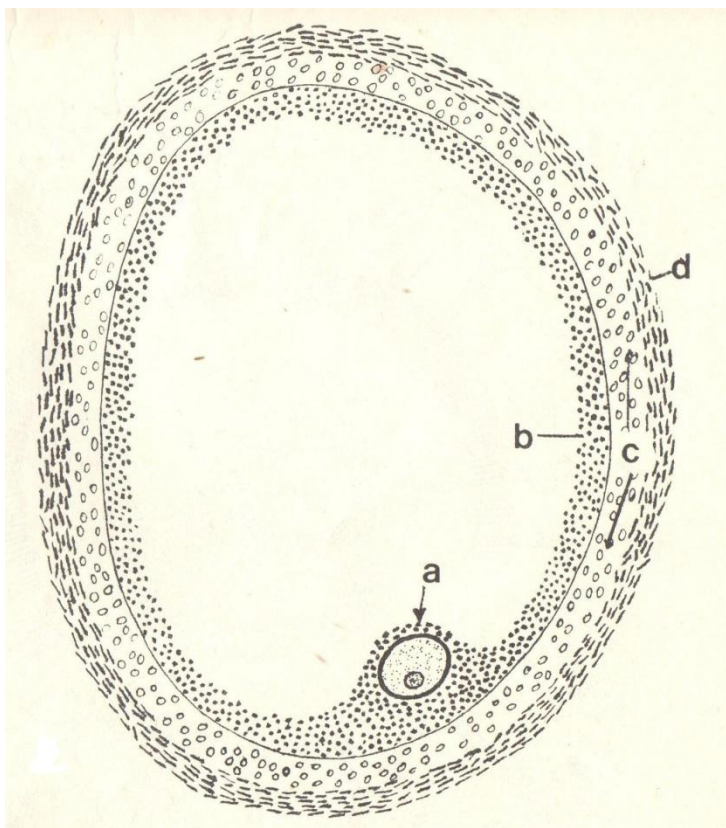
Antrální folikul ve vaječnicích byl poprvé popsán u zvířat holandským anatomem Reignerem de Graafem (Evans, 2003). Dalším zvětšováním oocyty I. řádu, hlavně však množением folikulárních buněk a zvětšováním dutiny s folikulárním mokem, se celý folikul zvětšuje a postupně se vyklenuje nad povrch vaječníku (Marvan a kol., 2007). Jedná se tedy o poslední stadium ve vývoji folikulů. Dozrávající a Graafovy folikuly mají podobu měchýřků, které na jedné straně prominují nad povrch vaječníku a na druhé straně zasahují hluboko do kůry vaječníku (Belák a kol., 1990).

Podle Malínského a Lichnovského (2009) dosahuje zralý terciární neboli Graafův folikul velikosti 10 – 15 mm s velkou dutinou *antrum folliculi* vyplněnou tekutinou. Marvan a kol. (2007) uvádí, že se během vývoje folikulu oocyt zvětšuje tak, že před ovulací dosahuje velikosti 150 – 200 μm . U feny však může velikost folikulu v době estru dosahovat až 6 mm (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Stěna terciárního folikulu je tvořena folikulárním epitelem, který obklopuje dutinu folikulu (König a Liebich, 2002). Stěnu zralého měchýřkovitého folikulu tvoří na povrchu jeho obal *theca folliculi*, který se skládá z vnější a vnitřní vrstvy. Vnější vrstva tohoto obalu je vazivová a nachází se zde mnoho cév. Vnitřní vrstva je bohatá na buňky. Uvnitř obalu se nachází zrnitá vrstva nazývaná *stratum granulosum* vystýlající prostornou dutinu folikulu. Tato zrnitá vrstva je složena ze 4 – 5 vrstev malých folikulárních buněk (Marvan a kol., 2007). Vajíčko je excentricky přiloženo ke stěně folikulu v místě zvaném *cumulus oophorus* (König a Liebich, 2002). *Cumulus oophorus* neboli vaječný hrbolek je útvar, který vyčnívá do dutiny folikulu a obsahuje vlastní vaječnou buňku (Malínský a Lichnovský, 2009). Vajíčko je obdáno vrstvou složenou z jemných fibril (*zona pellucida*), na kterou přiléhá několik vrstev buněk folikulárního epitelu, *corona radiata* (König a Liebich, 2002). Folikulární buňky zrnité vrstvy a buňky vnitřního obalu měchýřkovitého folikulu mají mimo jiné i důležitou funkci vnitřněsekretorickou. Syntetizují a do tkáňového a folikulárního moku vylučují folikulární hormony, estrogeny (Marvan a kol., 2007). Jen mizivá část embryonálně založených folikulů, a tím i vajíček, dosahuje stádia zralého Graafova folikulu. Většina folikulů během svého růstu podléhá zániku neboli atrézii folikulů (König a Liebich, 2002).

Belák a kol. (1990) popisuje histologickou stavbu Graafova folikulu tak, že se skládá z vrstev *stratum granulosum*, *membrana basalis folliculi*, *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. *Stratum granulosum* se skládá z několika vrstev folikulárních buněk, které

vystýlají dutinu folikulu. Vnější vrstva tohoto epitelu je tvořena buňkami cylindrického tvaru a ostatní buňky mají tvar nepravidelný. *Membrana basalis* je složená z kolagenních vláken. Jedná se o tenkou, světlolomnou membránu nazývanou také Slavjanského membrána. *Theca folliculi interna* je vnitřní vrstva vazivového obalu folikulu a je bohatá na buňky. Tyto thekální buňky jsou modifikované vazivové buňky, které jsou uspořádané koncentricky, podobají se fibroblastům a později se přeměňují na epiteliální buňky produkující steroidní hormony. *Theca folliculi externa* je vnější vazivový obal skládající se zejména z cirkulárně uspořádaných kolagenních vláken. Celkově je tato vrstva chudá na buňky a prochází jí početné cévy, které se větví v kapilární síť zasahující mezi buňky *theca folliculi interna*.



Obr. 6 Graafův folikul (Klika, 1980)

a – *cumulus oophorus* s oocytem, b – *membrana granulosa*, c – *theca folliculi interna*,
d – *theca folliculi externa*

3.4 Oogeneze

Proces, při kterém dochází ke vzniku a vývoji oocytů, se nazývá oogeneze (Reece, 1998). K oogenezi dochází ve folikulech vaječníku a tento proces rozdělujeme na tři fáze: fáze množení, fáze růstu a fáze zrání (Marvan a kol., 2007). Oogeneze probíhá v principu obdobně jako spermatogeneze, přesto však vykazuje zřetelné odlišnosti (Malínský a Lichnovský, 2009). Podstatný rozdíl mezi oogenezí a spermatogenezí je ten, že při spermatogenezi vznikají čtyři plnohodnotné spermie, zatímco při oogenezi jeden zralý oocyt (Marvan a kol., 2007). Také časový průběh je u oogeneze a spermatogeneze odlišný. U oogeneze k fázi množení a růstu dochází již v prenatálním období (Klika a kol., 1985).

Vývoj oocyty je těsně spjatý s růstem a dozríváním ovar folikulů ve vaječníku, ale jednotlivá stádia vývoje oocyty a vývoje folikulů neprobíhají ve stejných časových intervalech (Belák a kol., 1990). Oogeneze v plném rozsahu se uskutečňuje jen u malé části populace pohlavních buněk (Marvan a kol., 2007).

3.4.1 Fáze množení

Fáze množení oogonií ve vaječníku u ženy probíhá těsně před narozením a končí nejpozději několik dnů po jejím narození (Rozinek a Jeřeta, 2012). Belák a kol. (1990) uvádí, že k této fázi dochází v prenatálním období a jen u masožravců se setkáváme s množěním oogonií i v prvním roce života.

Základní zárodečné primordiální buňky vznikají v embryu na rozhraní mezi žloutkovým váčkem a prvostřevem z entodermy. Dochází ke vzniku velkých světlých buněk, které cestují tkáněmi embrya až do základu vaječníku. Během vývoje vaječníku se tyto buňky dostávají do povrchového zárodečného epitelu vaječníku. Ke konci fetálního období se primordiální buňky začnou mitoticky dělit a vytvoří provazce dceřiných buněk, oogonií, které se zanořují od povrchu do hloubky kůry vaječníku. V době, kdy je vytvořeno několik set tisíc oogonií, se pod vlivem hormonů placenty a plodu dělení zastaví. Primordiální buňky se odpojí ze zárodečného epitelu a v těle plodu se ztrácejí. Oogonie se už dále nedělí. Doprovodné epiteliální buňky v kůře vaječníku pokračují v dělení a postupně se vsouvají mezi oogonie, oddělují je od sebe a vytvářejí jednovrstevný obal kolem oogonie. Z těchto epiteliálních buněk se stávají buňky folikulární a tím se vytvoří zásoba asi 50 000

primordiálních folikulů, což se u mladé ženy dokončuje v období několika týdnů po narození (Rozinek a Jeřeta, 2012).

Vaječníky žen po porodu obsahují asi 700 000 oogonií, přičemž v průběhu dospívání se tento počet postupně snižuje na 350 000 a ve věku pěti let je počet oogonií 33 000 a v deseti letech jen 500 (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Proces přeměny oogonií v primární oocyty probíhá ve vaječníku do konce prenatálního období. Po narození již nové primární oocyty nevznikají (Klika a kol., 1985). Cibulka a kol. (2004) uvádí, že primární oocyty vznikají z oogonií posledním mitotickým dělením a jsou uloženy v primárních folikulech. Také Malínský a Lichnovský (2009) uvádějí, že první zrací dělení meiózy zahajují primární oocyty. Oproti tomu Rozinek a Jeřeta (2012) popisují, že ke vzniku oocyty dochází hormonálním stimulem, který způsobí, že se všechny oogonie ve vaječnících dostávají do prvního zracího dělení meiózy a dokončují profázi prvního zracího dělení.

Primární oocyty vstupují ještě v prenatálním období do fáze prvního zracího dělení, které probíhá obdobně jako u semenných buněk (Klika a kol., 1985; Marvan a kol., 2007). U člověka se v leptotenním stádiu chromozomy (44 autozomů a dva stejnocenné heterochromozomy XX) stávají viditelnými pod mikroskopem (Klika a kol., 1985). Dále projdou stádiem zygotenním a pachytenním. V diplotenním stádiu je profáze ještě ve fetálním období přerušena a oocyt se může nacházet v tomto stádiu různě dlouhou dobu. Prodloužené diplotenní stádium se někdy také označuje jako stádium diktyotenní (Klika a kol., 1985; Marvan a kol., 2007).

Ultrastruktura oocyty je tvořena cytoplazmou obsahující mitochondrie a granulární endoplazmatické retikulum. Pod povrchovou membránou se nacházejí speciální kortikální granula, která při fertilizaci vyvolávají kortikální reakci. Mezi *zona pellucida* a povrchovou oolemou je úzký periviteliní prostor, do kterého vybíhají jednak mikroklky oocyty a z druhé strany cytoplazmatické výběžky folikulárních buněk (Malínský a Lichnovský, 2009).

3.4.2 Fáze růstu

Fáze růstu oocytů zahrnuje dlouhé období života a trvá až do konce pohlavní činnosti samice. Od začátku pohlavní dospělosti v průběhu každého ovariálního cyklu vstupuje do fáze růstu pokaždé několik primárních oocytů (Marvan a kol., 2007). Belák a kol. (1990) uvádí, že k fázi růstu patří již období, kdy se oogonie přestávají dělit a přeměňují se na primární oocyty. Popisuje, že toto období je velmi dlouhé, neboť začíná již v prenatálním období, ve kterém dochází k profázi prvního meiotického dělení. Dále také, že poté se vývoj oocytů na delší dobu zastaví a pokračuje až v momentu pohlavního dospívání (Belák a kol., 1990).

V rostoucím folikulu současně roste i oocyt. Část rostoucích folikulů během růstu postupně zaniká a dále v růstu pokračuje jen stále menší a menší počet folikulů a oocytů. Před dosažením puberty díky nedostatečné hormonální stimulaci, nemohou folikuly ovulovat a uvolňovat vajíčka, z tohoto důvodu všechny zanikají. Je to fyziologický zánik, který se nazývá atrézie oocytů a folikulů. Nejvíce folikulů atretuje těsně po zahájení růstu (Rozinek a Jeřeta, 2012).

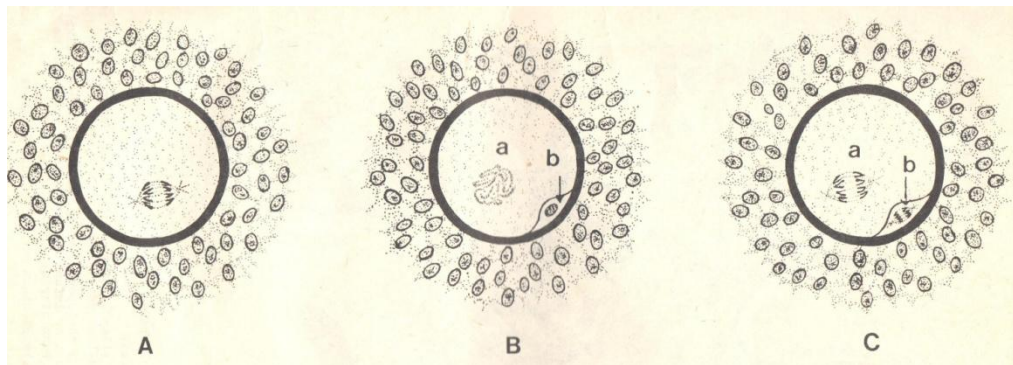
Fáze růstu je charakteristická zvětšováním objemu jádra a v podstatě větší míře cytoplazmy. Růst je provázen růstem a vývojem folikulů ve vaječníku, v nichž jsou oocyty uloženy. V tomto období jsou oocyty velmi metabolicky aktivními buňkami. Charakteristická je pro ně vysoká úroveň syntézy ribonukleových kyselin a proteinů. Podílejí se pravděpodobně na syntéze svého obalu *zona pellucida* (Klika a kol., 1985). Rozinek a Jeřeta (2012) uvádí, že v tomto období dochází k růstu oocytu z 20 μm na 120 μm .

Pro fázi růstu je důležitý a typický celkový vývoj vaječnickových folikulů (Marvan a kol., 2007).

3.4.3 Fáze zrání

K fázi zrání dochází u feny ve vejcovodu (Rozinek a Jeřeta, 2012). Fáze zrání, která je zahájena již v prenatálním období a následně přerušena až do období pohlavní dospělosti v diplotenním stádiu profáze prvního zracího dělení, se dokončuje až před ovulací (Klika a kol., 1985). U plně dorostlých oocytů dochází před ovulací pod vlivem LH vlny k znovuzahájení meiotického dělení (Cibulka a kol., 2004). Tichý a kol. (2004) ještě upřesňují, že do periody zrání vstupují oocyty I. řádu asi 48 hodin před ovulací.

Oocyty během svého růstu získávají meiotickou kompetenci, což je schopnost znovuzahájit zastavené meiotické dělení a toto dělení zdárně dokončit. Toto je závislé na postupném zrání cytoplazmy oocytu. Po zrušení prvního bloku meiózy dojde k rozpadu zárodečného váčku, tj. rozpadu jaderné membrány, současně ztrátě jádérka a vytvoření barvitelných chromozomů. Každý chromozom je složen ze dvou chromatid, takže buňka je v tomto stádiu tetraploidní, má čtyři sady genetické informace (Rozinek a Jeřeta, 2012). V jádře oocytu, které se na konci fáze růstu přesunulo na okraj cytoplazmy, vymizí obal jádra. Dochází k vytvoření dělicího vřeténka a následuje metafáze prvního zracího dělení, v níž se dočasně spojené homologní chromozomy uspořádají do ekvatoriální roviny a rozdělí se na jednotlivé chromozomy. Jedna sada chromozomů se spolu s menším množstvím cytoplazmy oddělí od oocytu (Klika a kol., 1985). Výsledkem prvního zracího dělení jsou dvě nestejně velké buňky s haploidním počtem chromozomů, tj. oocyt II. řádu a tzv. pólové tělísko nebo také pólocyt I. řádu a zároveň jejich vznikem je ukončeno první zrací dělení (Tichý a kol., 2004). Oocyt II. řádu tedy obsahuje celou cytoplazmu z původní mateřské buňky a haploidní počet bivalentních chromozomů. Pólocyt I. řádu obsahuje druhou polovinu sady chromozomů z mateřské buňky, ale neobsahuje téměř žádnou cytoplazmu (Belák a kol., 1990).



Obr. 7 A – primární oocyt, B – sekundární oocyt (a) s 1. pólovým tělískem (b), C – sekundární oocyt (a) ve stádiu 2. zracího dělení (b) (Klika, 1980)

Druhé meiotické dělení má charakter mitózy, začíná ještě v průběhu ovulace, avšak neproběhne až do konce a zastavuje se v metafázi (Tichý a kol., 2004). Stejně jako při prvním mitotickém dělení dochází k rozdělení chromozomů do dvou buněk, dojde ve druhém meiotickém dělení k rozdělení chromatid do dvou buněk a oddělení jedné sady s malou částí cytoplazmy do druhého pólového tělíska. Obě pólová tělíska nemají vývojovou potenci, i když se může první z nich ještě rozdělit. V následujícím období degenerují (Klika a kol., 1985). K dokončení druhého zracího dělení dojde až v případě oplození oocytu, u kterého do cytoplazmy pronikla spermie. Výsledkem jsou opět dvě odlišné buňky s haploidním počtem chromozomů, což je zralé vajíčko a druhé pólové tělísko (pólocyt II řádu). Rekonstruované jádro zralého vajíčka se nazývá prvojádru samičí. Nedojde-li k oplození, oocyt perzistuje asi 24 hodin a poté, během pasáže vejcovodem, zaniká (Tichý a kol., 2004).

3.5 Ovulace

3.5.1 Mechanismus ovulace

Vývoj folikulu je zakončen ovulací, tj. prasknutím stěny folikulu, přičemž se jeho obsah vylije do břišní dutiny a nese s sebou vajíčko se sekundárními obaly. Volné vajíčko, které obaluje *zona pellucida*, a vrstva folikulárních buněk označovaná jako *corona radiata* se dostává k nálevkovitě rozšířené části vejcovodu těsně přiložené k vaječníku (Belák a kol., 1990). Do vejcovodu je folikul dopraven pomocí pohyblivých třásní – fimbrií (Reece, 1998). Těsně před ovulací se oocyt uvolňuje ze stěny folikulu a volně plave ve folikulární tekutině. Na povrchu Graafova folikulu prominujícího nad povrch vaječníku se objevuje bělavé oválné místo označované jako stigma nebo *macula pellucida*. Stigma vzniká nedokrvením stěny Graafova folikulu a je známkou blížící se ovulace. V místě stigmatu je stěna Graafova folikulu tenčí, folikulární buňky se rozestupují, až nakonec zeslabená stěna Graafova folikulu praská, jeho obsah se vylije ven a strhává s sebou oocyt i s jeho obaly (Belák a kol., 1990).

Ovulace je složitý pochod řízený a kontrolovaný jednak nervově, jednak hormony mozkového podvěsku, při němž se uplatňuje kromě zvýšení tlaku folikulárního moku i enzymatické narušení folikulární stěny (Marvan a kol., 2007). Jelínek a kol. (2003) uvádějí, že pro nástup ovulace je nezbytné zvýšení hladiny LH, ale vlastní mechanismus ovulace není dodnes znám. Dále uvádějí, že hypoteticky se např. předpokládalo zvýšení tlaku tekutiny uvnitř folikulu v důsledku zvýšení množství *liqor folliculi* nebo smrštěním snopců hladké

svaloviny ovariálního stromatu. Jelínek a kol. (2003) popisují, že v současné době je nejvíce uznávána hypotéza o lokálním zvýšení aktivity proteáz (kolagenázy, plazminu), která má za následek rozrušení stěny vaječnicku nad zralým folikulem. Aktivní kolagenáza rozvolňuje kolagenová vlákna ve stěně folikulu a plazmin spolu s dalšími proteolytickými enzymy se také podílí na prasknutí stěny folikulu (LeMaire, 1989). Stejně uvádí i Belák a kol. (1990), že určitou úlohu při ovulaci hraje enzym kolagenáza, který depolymeruje kolagenová vlákna v místě stigmatu, což způsobí oslabení pevnosti stěny folikulu. Dále ovšem uvádí, že předpokládané zvýšení tlaku v Graafově folikulu způsobené zvýšenou produkcí folikulární tekutiny se nepodařilo experimentálně dokázat. Tuto teorii popisuje jako možnou i Makinoda a kol. (2008) a dále také uvádí, že vaječník je v této fázi více prokrvený a tím dochází k zvyšování množství folikulární tekutiny a také, že proteolytické enzymy způsobují změnu stavby folikulu a následně ztenčení jeho stěny. Makinoda a kol. (2008) popisuje, že v roce 1980 byla zveřejněna teorie, že mechanismus ovulace je podobný mechanismu zánětu a to z toho důvodu, že zde dochází k hyperemii a přestavbě tkáně.

Výběr folikulu pro ovulaci je zřejmě náhodný. Při zániku žlutého tělíska, kdy dochází ke snížení hladiny progesteronu a zvyšuje se produkce FSH a LH, ovuluje obvykle nejaktivněji rostoucí folikul. Folikuly pokračují v růstu a vývoji během všech fází ovariálního cyklu s určitým potlačením během luteální fáze. Aby došlo k ovulaci, je nutná vlna LH. Folikuly, i když téměř dokončily vývoj, ale nemají potřebné LH receptory, nereagují na vlnu LH ovulací a podléhají zániku (Reece, 1998).

K ovulaci dochází u většiny zvířat spontánně, tedy nezávisle na pohlavním aktu, zpravidla v období říje. Jen u některých druhů, jako např. u kočky, se vyskytuje tzv. provokovaná ovulace, která je vyvolána pářením. Přitom u jednorodých zvířat dozrává a praská na vaječnicku zpravidla jen jeden folikul a u vícerodých větší počet folikulů současně (Marvan a kol., 2007).

3.5.2 Žluté tělísko

Po ovulaci se na vaječnicku v místě prasklého folikulu začne vyvíjet zvláštní kompaktní útvar s významnou vnitřněsekretorickou funkcí nazývané žluté tělísko nebo *corpus luteum* (Marvan a kol., 2007). Shodně uvádí i Paulsen (2004), že žluté tělísko je dočasná endokrinní žláza, která je tvořena zbytky folikulu po ovulaci.

Po prasknutí Graafova folikulu se jeho stěna zřasí, takže dutina folikulu má nepravidelný tvar hvězdicovitého vzhledu. V této dutině zůstává zbytek folikulární tekutiny, která se smísí s malým množstvím krve z kapilár *theca folliculi interna*. Vysrážením fibrinu se vytvoří sraženina nazývaná se fibrinové jádro, které dočasně zacelí defekt na povrchu vaječnicku (Tichý a kol., 2004). Belák a kol. (1990) popisuje, že bezprostředně po ovulaci se dutina prasklého folikulu vyplní sraženou krví, díky které má červenou barvu a v tomto stádiu se označuje jako hemoragické žluté tělísko (*corpus luteum hemorhagicum*). Na vzniku žlutého tělíska mají podíl všechny vrstvy Graafova folikulu, ale luteinové buňky vznikají zejména ze *stratum granulosum* a *theca folliculi interna*. Podle původu označujeme vznikající buňky jako granulosa luteinní buňky a theca luteinní buňky (Belák a kol., 1990). Granulosa luteinní buňky jsou velké, světle se barvící buňky, které produkují progesteron. Theca luteinní buňky, které produkují estrogen, jsou menší a barví se tmavěji (Paulsen, 2004).

Pokud dojde k oplození dozrálé vaječné buňky ve vejcovodu, žluté tělísko se začne silně zvětšovat a zůstává na vaječnicku téměř po celou dobu březosti. Nazývá se pravé nebo graviditní žluté tělísko a zaujímá často více než polovinu objemu vaječnicku. Jeho buňky syntetizují a do tkáňového moku vyměšují progesteron, který na vaječnicku blokuje dozrávání a ovulaci dalších folikulů. Vyvolává také změny na děložní sliznici důležité pro přijetí oplozeného vajíčka, implantaci zárodka a jeho další zdárný vývoj. V poslední třetině březosti začíná pravé žluté tělísko podléhat zániku, v jehož průběhu se postupně zmenšuje, až se nakonec po porodu změní na bělavou jizvu (Marvan a kol., 2007), tzv. *corpus albicans*, které nahrazuje degenerované graviditní žluté tělísko a nakonec je také odstraněno makrofágy stejně jako atretické folikuly (Paulsen, 2004). Paulsen (2004) ještě doplňuje, že pravé žluté tělísko produkuje také polypeptidový hormon relaxin, který změkčuje vazivovou chrupavku a umožňuje tím rozšíření pánevního východu při porodu. Pokud ovšem k oplození nedojde, vytvoří se žluté tělísko menší velikosti nazývané nepravé žluté tělísko nebo *corpus luteum periodikum*, které je funkčně aktivní kratší dobu a následně podléhá regresi (Tichý a kol., 2004).

Ve vývoji periodického žlutého tělíska rozlišujeme stádium růstu (proliferace), rozkvětu a zániku (regrese, involuce). Progesteron, který je vylučován žlutým tělískem vyvolává změny na děložní sliznici a dočasně zastavuje dozrávání dalšího folikulu. Tyto změny, charakterizované dozráním sekundárního folikulu v terciární, jeho prasknutím, proliferací a zánikem periodického žlutého tělíska, se na vaječníku v pravidelných intervalech opakují a souhrnně je nazýváme vaječnickový (ovariální) cyklus (Marvan, 2007).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro zhotovení histologických preparátů byly použity vaječníky celkem jedenácti štěňat a jedné pohlavně dospělé feny. Veškerý materiál byl získán od veterinárních lékařů. Vaječníky štěňat byly získány pitvou štěňat, která se narodila mrtvá, zemřela krátce po porodu nebo měla vrozená onemocnění neslučitelná se životem a musela být provedena euthanasie veterinárním lékařem. Vaječníky dospělé feny byly odebrány při kastraci feny.

Štěně č. 1

- plemeno: čivava
- úmrtí 2. den po porodu

Štěně č. 2

- plemeno: toy teriér
- narozeno mrtvé

Štěně č. 3

- plemeno: bulteriér
- úmrtí v den porodu při císařském řezu

Štěně č. 4, č. 5, č. 6

- plemeno: německý ovčák
- úmrtí 2. den po porodu na infekční onemocnění, sourozenci

Štěně č. 7

- plemeno: mops
- narozeno s rozštěpem patra, euthanasie provedena 1. den po porodu

Štěně č. 8

- plemeno: erdelteriér
- úmrtí 1. den po porodu, zalehnuto matkou

Štěně č. 9

- plemeno: německý ovčák
- úmrtí v den porodu (0. den)

Štěně č. 10

- plemeno: německý ovčák
- euthnasie v den porodu (0. den), vývojová vada

Štěně č. 11

- plemeno: yorkšírský teriér
- úmrtí 42. den věku

Vaječník dospělé feny

- plemeno: čivava
- stáří 1 rok, vaječník byl odebrán při kastraci veterinárním lékařem

4.2 Metody

Celý postup zpracování získaného materiálu byl prováděn podle postupů uvedených Vackem (1972) a Wolfem (1954).

1) odběr materiálu

Materiál byl získán z uhynulých štěňat, která se narodila již mrtvá nebo byla provedena euthanasie z důvodu závažného vrozeného onemocnění. Vaječníky byly získány pitvou mrtvých štěňat.

2) oplach

Dále byly vaječníky opláchnuty fyziologickým roztokem, aby mohly být použity k dalšímu zpracování a fixaci získaného materiálu.

3) fixace

Fixace je rychlé vysrážení bílkoviny protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které má zabránit samovolnému rozkladu tkáně. Fixace se provádí tak, že se vyříznutý kousek

tkáň vloží do fixační tekutiny, k čemuž by mělo dojít co nejdříve po odběru materiálu (pitvy). Tkáň se musí fixovat, co nejdříve po zastavení srdce nebo vykrvení, aby nedocházelo k autolytickým změnám. Dále by neměl být odebraný materiál příliš velký, aby došlo k celkové fixaci materiálu a ne jen jeho povrchových vrstev. K fixaci vaječníků štěnat byla použita Bouinova tekutina, ve které byly naloženy 24 hodin a poté vyprány v 80 % alkoholu. V 80 % alkoholu byly vaječnický uchovány až do dalšího zpracování.

4) zalévání do parafínu

Princip zalévání tkáň do parafínu záleží v prosycení odvodněné tkáň rozehrátým parafínem při teplotě kolem 56 – 58 °C. Parafín vyplní všechny mikroskopické prostory ve tkáni, takže následně umožňuje krájet tkáň ve velmi tenkých řezech, silných několik tisícín milimetru. Zalévání do parafínu se skládá z několika etap, tj. odvodnění tkáň, prosycení tkáň tekutinou rozpouštějící parafín, prosycení tkáň parafínem a nakonec vlastní zalití.

5) krájení tkáňových bloků

Dále se z tkáňových bloků zhotovují tenké histologické řezy, které jsou silné jen několik tisícín milimetru. K zhotovení histologických řezů se používají přístroje zvané mikrotomy. V našem případě byl použit sáňkový mikrotom.

6) lepení na podložní skla

Lepení parafinových řezů na podložní skla se provádí pomocí směsi bílku s glycerínem. Na podložní sklíčko kápeme malou kapku této směsi a rozetřeme ji stejnosměrně po celé ploše sklíčka. Následně na sklíčko přeneseme parafinový řez a podlijeme jej pomocí pipety destilovanou vodou. Podložní sklíčko přeneseme na ploténku vyhřátou na 40 – 45 °C. Teplem parafín měkne a řez plovoucí na vodě se natáhne. Po narovnání řezu podložní sklíčko označíme a vložíme do sušárny. V sušárně dojde k odpaření vody a tenká vrstva bílku pod řezem koaguluje a pevně přichytí řez k podložnímu sklíčku.

7) odparafinování

Odparafinování řezů se provádí z toho důvodu, že k barvení řezů se používá vodných roztoků barviv. K odparafinování se používá dvou lázní xylenu po 5 minutách. Protože se ani xylen ve vodě nerozpouští, musíme po rozpuštění parafínu převést preparáty sestupnou alkoholovou řadou do vody. Z xylenu přenášíme podložní sklíčka s řezy do kyvety

s absolutním alkoholem na 5 minut, potom do 96 % alkoholu na dalších 5 minut a nakonec na 5 minut do vody.

8) barvení řezů

Řezy barvíme 3 – 10 minut v hematoxylinu. Obarvené řezy propláchneme ve vodě. Hematoxylinem se obarví jádra modře, ale zároveň se přibarví i jiné tkáňové složky, které se odbarvují tzv. diferencováním. Řezy dáme na několik vteřin do kyselého alkoholu. Do diferencování se řezy vyperou 5 minut v tekoucí vodě. Poté se dobarvují 0,1 % roztokem eosinu na 1 – 5 minut. Opláchneme řezy destilovanou vodou a krátce je diferencujeme v 80 % alkoholu. Obarvené řezy ještě odvodníme vzestupnou alkoholovou řadou a karboxylem. Nakonec projasníme řezy dvěma lázněmi xylenu po 5 minutách.

9) montování řezů

Obarvené řezy uzavíráme, neboli montujeme mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média. Uzavírající médium musí být látka dokonale průhledná, nesmí poškozovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu.

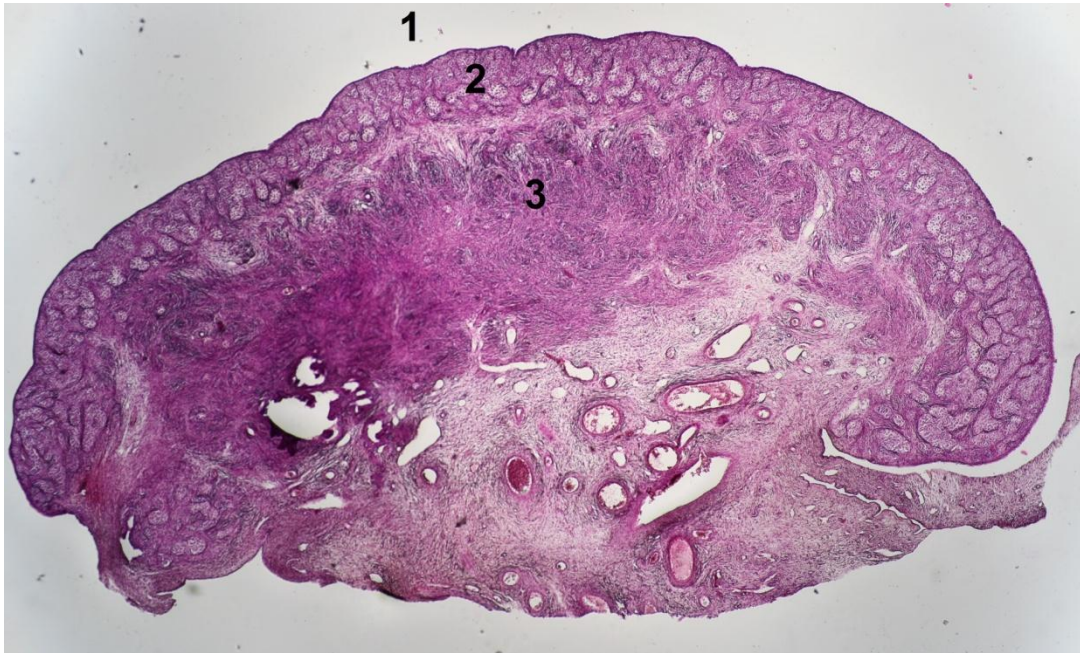
10) prohlížení řezů

Obarvené a uzavřené řezy mikroskopujeme. V našem případě byl použit mikroskop NIKON ECLIPSE E200 a digitální kamera CANON EOS 1000.

11) mikrofotografie

Při mikroskopování řezů byly pořízeny jednotlivé mikrofotografie, které jsme následně prohlíželi a vyhodnocovali.

5 Výsledky



Obr. štěně č. 6 (zvětšeno 4x), stáří 2 dny

1. zárodečný epitel, 2. dřeň vaječníku, 3. kůra vaječníku

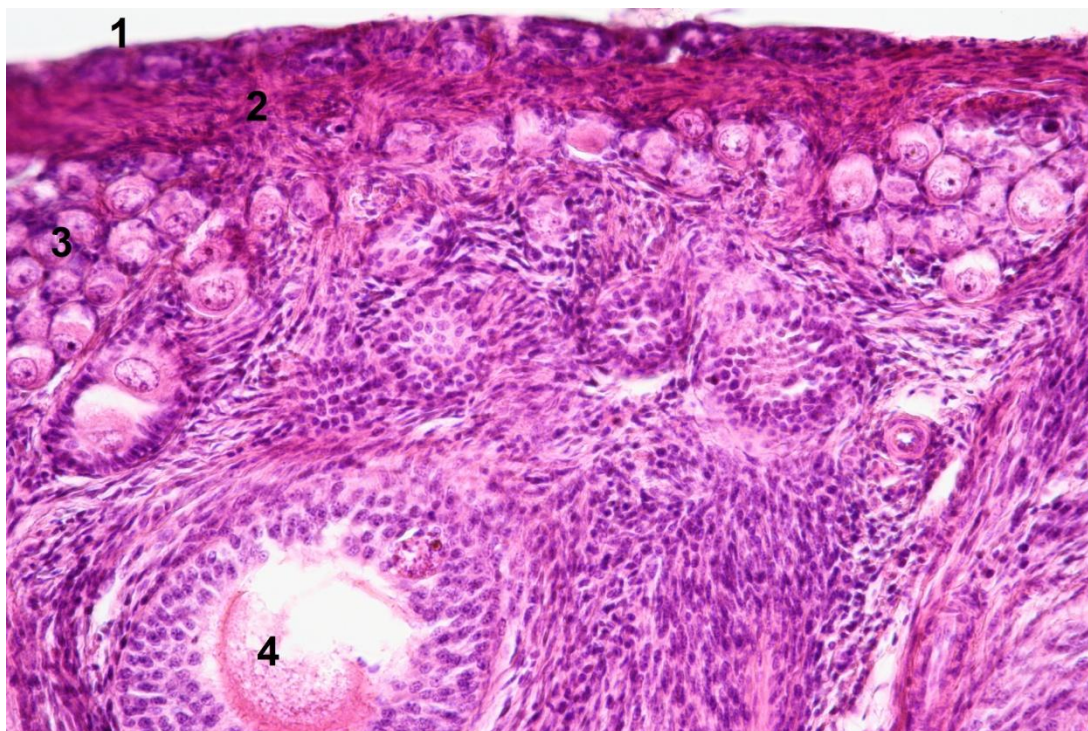
- na povrchu vaječníku štěněte č. 6 je dobře viditelný tmavěji zabarvený epitel nazývaný zárodečný
- pod epitelem je kůra, ve které jsou při větším zvětšení pozorovatelná hnízda ogonií ohraničená vazivovými a epitelovými buňkami
- další vrstvou je dřeň, kde se nacházejí vazivové buňky a cévy
- oproti vaječníku pohlavně dospělé feny je vazivově bohatší dřeň než kůra
- na řezu vaječníku štěněte nejsou pozorovatelná větší množství kolagenových vláken nacházejících se pod epitelem nazývaná *tunica albuginea*
- v žádné části vaječníku se nenacházejí primární, sekundární nebo terciární folikuly a žlutá tělíska jak je tomu u pohlavně dospělé feny



Obr. dospělá fena (zvětšeno 3x), stáří 1 rok

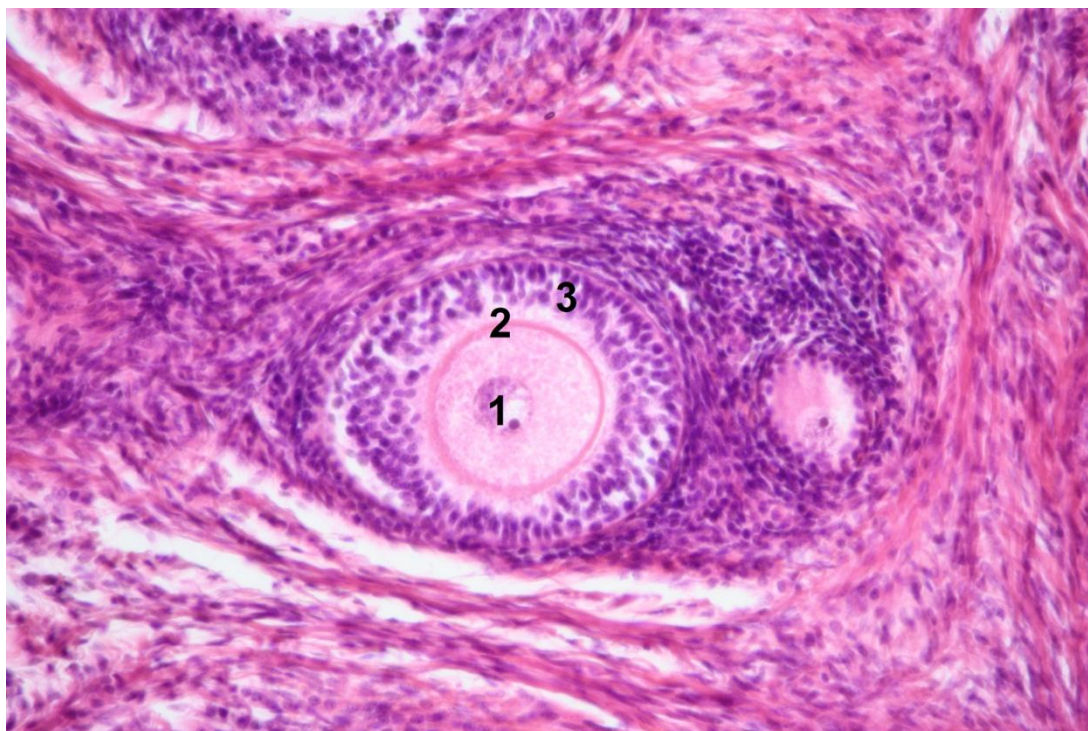
1. zárodečný epitel, 2. kůra vaječníku, 3. dřeň vaječníku, 4. terciární (antrální) folikul, 5. atretický folikul, 6. žluté tělísko

- na povrchu vaječníku dospělé feny se nachází jednovrstevný zárodečný epitel stejně jako u štěněte
- dále je dobře zřetelná kůra vaječníku, ve které se nejbližší epitelu nachází mnoho primárních folikulů
- jsou zde vidět i sekundární folikuly a také terciární folikul
- na obrázku se nachází i žluté tělísko, které zabírá podstatnou část plochy vaječníku
- jsou zde pozorovatelné i zanikající (atretické) folikuly
- dřeň vaječníku dospělé feny není tak vazivově bohatá jako u štěněte, naopak nejhustší vazivová vrstva se zde nachází těsně pod epitelem (*tunica albuginea*)
- v dřeni se nachází mnoho cév



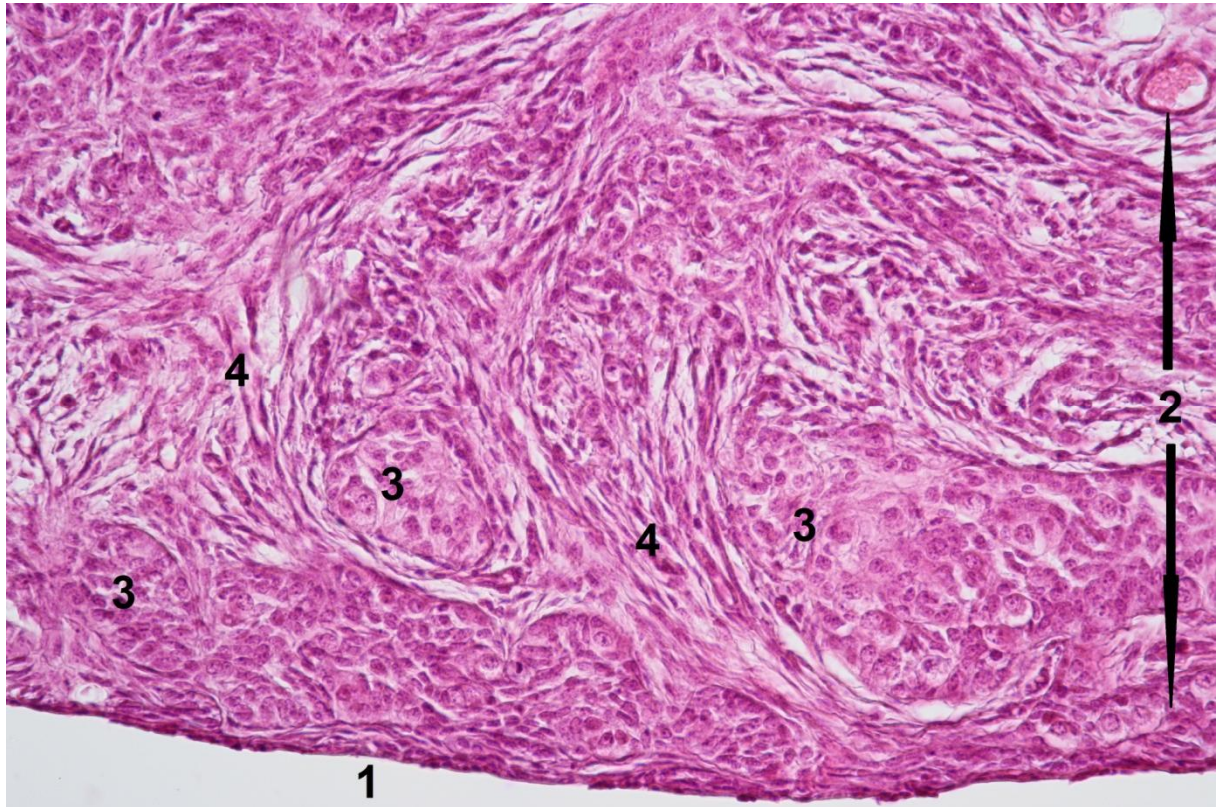
Obr. dospělá fena (zvětšeno 304x), stáří 1 rok

1. zárodečný epitel, 2. *tunica albuginea*, 3. skupina primárních folikulů, 4. časně antrální folikul



Obr. dospělá fena (zvětšeno 304x), stáří 1 rok, rostoucí folikul v hlubší vrstvě kůry vaječníku

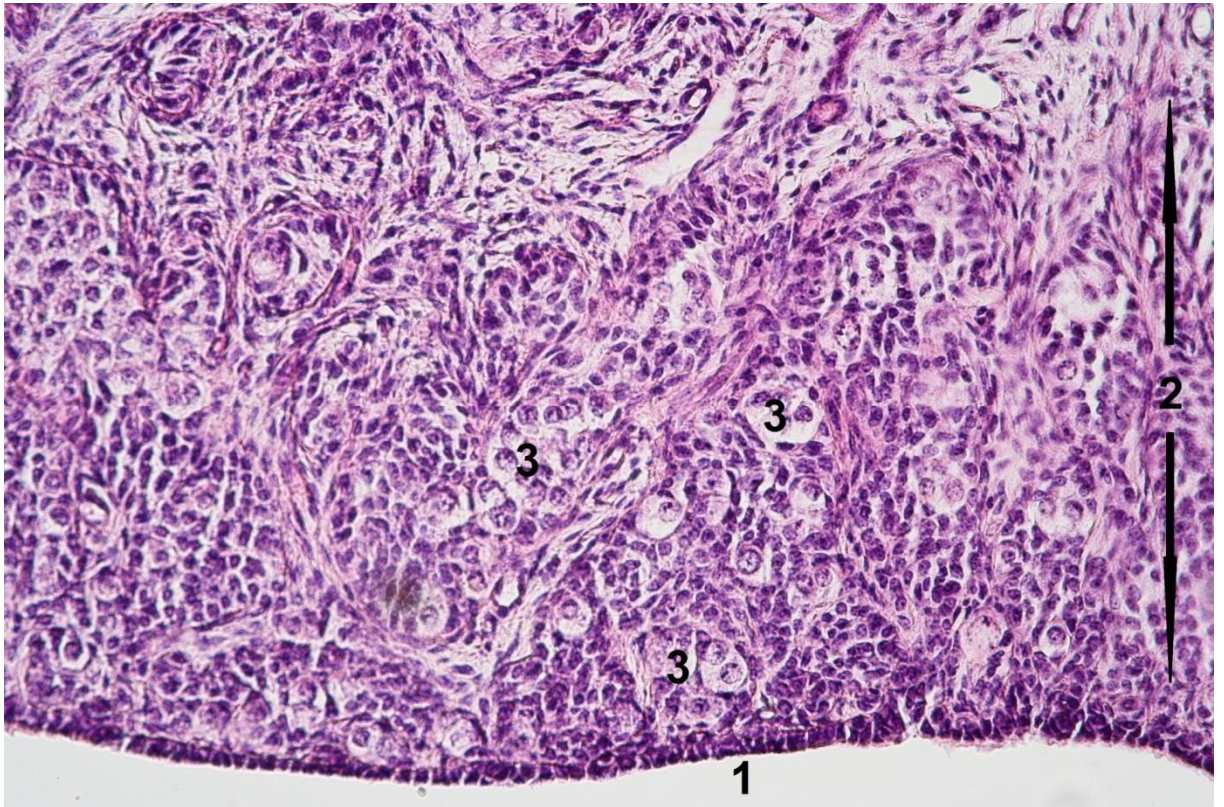
1. oocyt I. řádu, 2. *zona pellucida*, 3. několik vrstev folikulárních buněk



Obr. štěně č. 1 (zvětšeno 304x), stáří 2 dny

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií, 4. provazce vaziva kůry vaječníku

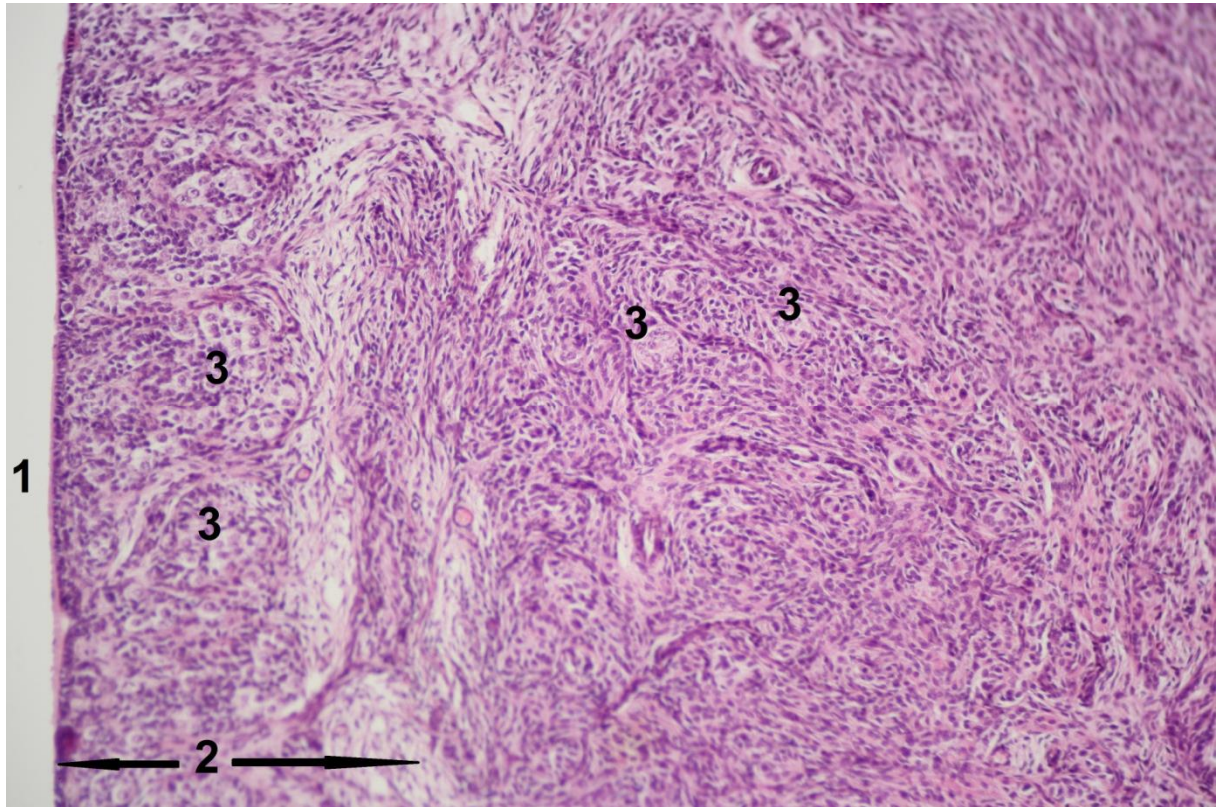
- povrch vaječníku štěněte č. 1 je krytý jednovrstevným kubickým epitelem, který se nazývá zárodečný epitel
- ve vnější vrstvě kůry vaječníku jsou pozorovatelná tvořící se jednotlivá hnízda oogonií
- vznikající hnízda oogonií nejsou úplně oddělena, ale již mezi nimi prostupují provazce vaziva, které formují jednotlivá hnízda oogonií
- cytoplazma oogonií se barví světle fialovou barvou, jádro oogonií se barví tmavěji a je kulovitého tvaru s hrudkovitým chromatinem
- vnější vrstva vaječníku štěněte neobsahuje výraznou vrstvu vaziva, jakou pozorujeme na vaječníku dospělé feny
- hutnější vazivo se v tomto případně nachází až v hlubší vrstvě kůry vaječníku štěněte
- vzhledem k tomu, že zde nejsou jasně zformovaná hnízda oogonií, můžeme toto stádium považovat jako velmi brzké stádium vývoje struktury vaječníku po narození štěněte. I přesto zde ovšem nejsou patrné primordiální zárodečné buňky (PGC, gonocyty).



Obr. štěně č. 7 (zvětšeno 304x), stáří 1 den

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. tvořící se hnízda oogonií

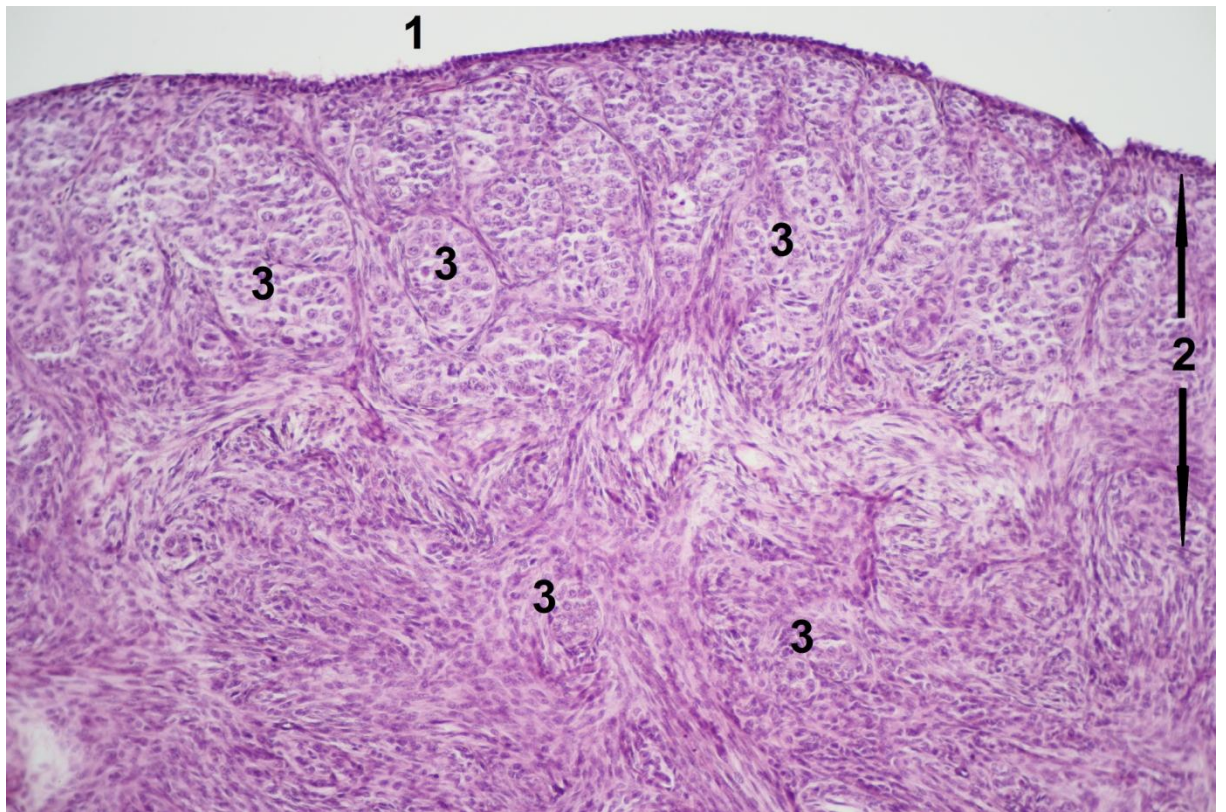
- na povrchu vaječníku štěněte č. 7 je dobře pozorovatelný jednovrstevný kubický epitel, který se barví tmavě fialovou barvou
- ve vnější vrstvě kůry vaječníku jsou vidět malá hnízda oogonií, která nejsou ještě zřetelně oddělena vazivem a doprovodnými epiteliálními buňkami jak je tomu v pozdějších stádiích vývoje struktury vaječníku u štěněte
- místy jsou pozorovatelné samostatné oogonie
- z preparátu není zřejmé, jestli se jednotlivé oogonie nebo primordiální zárodečné buňky oddělují z epitelu, neboť ten zůstává neporušený a souvislý na celém vaječníku
- silnější vrstva vaziva se nachází v hlubší vrstvě kůry vaječníku



Obr. štěně č. 7 (zvětšeno 142x), stáří 1 den

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií

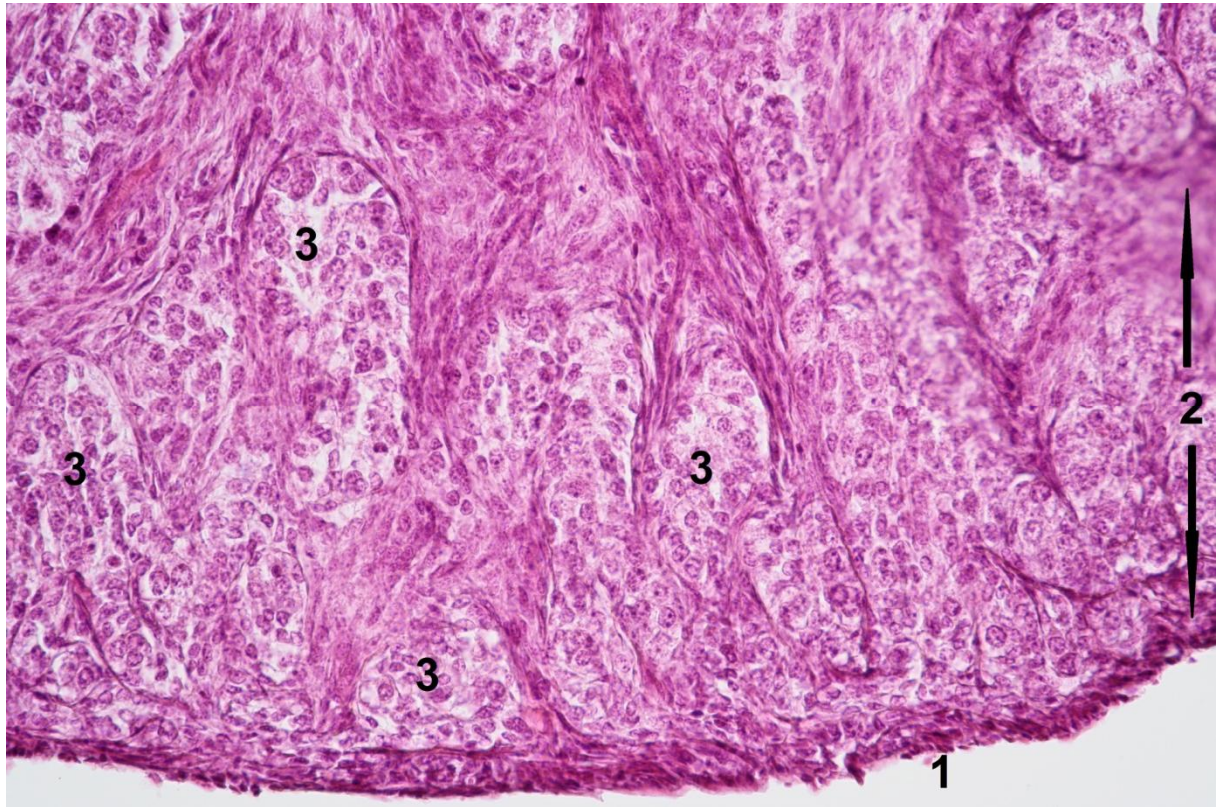
- na preparátu štěněte č. 7 jsou pozorovatelná ojedinělá hnízda oogonií v hlubší vrstvě kůry vaječníku
- větší počet formujících se hnízd oogonií je blízko epitelu ve vnější vrstvě kůry vaječníku
- z preparátu nelze jasně určit, zad-li dochází ke vzniku oogonií u epitelu nebo v kůře vaječníku, neboť zde nejsou jasně pozorovatelné primordiální zárodečné buňky (PGC, gonocyty)



Obr. štěně č. 10 (zvětšeno 142x), stáří 0 dnů

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií

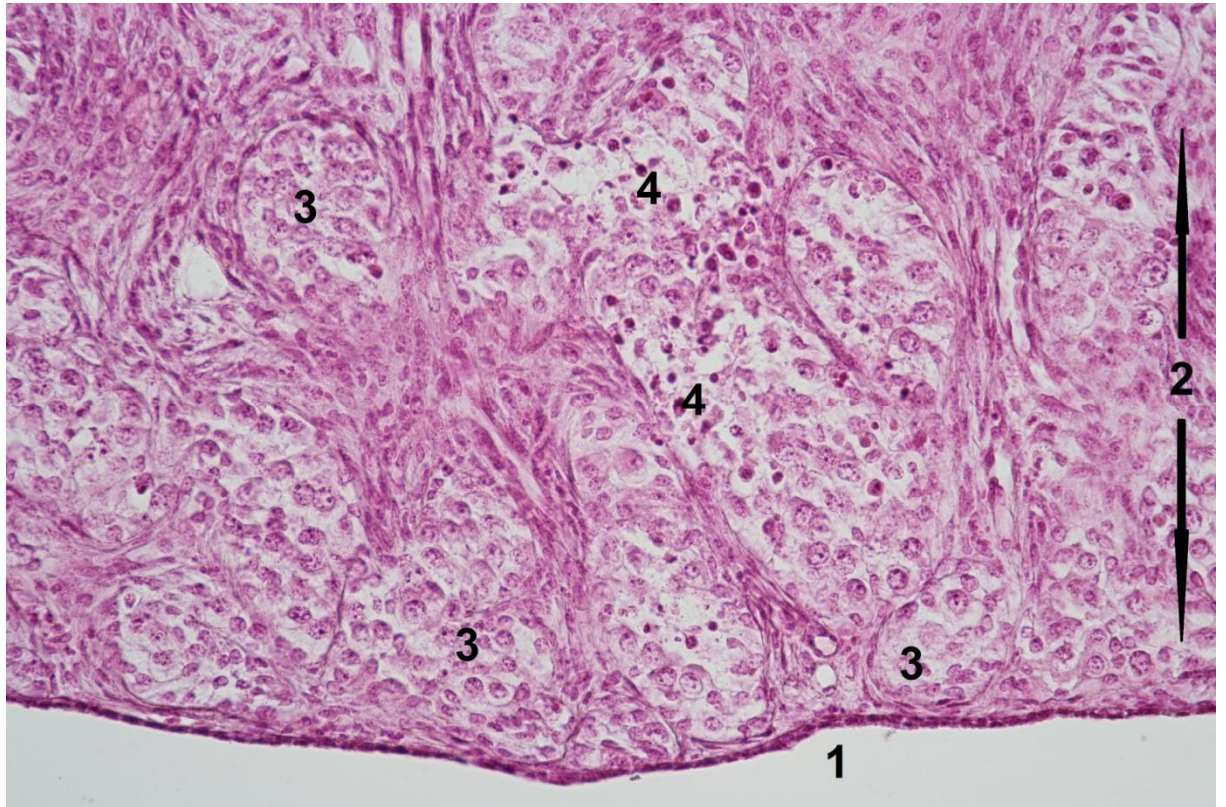
- stejně jako předchozího preparátu jsou zde pozorovatelná ojedinělá hnízda oogonií ve vnitřní vrstvě kůry, která je tvořena velkým množstvím hustšího vaziva



Obr. štěně č. 2 (zvětšeno 304x), stáří 0 dní

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií

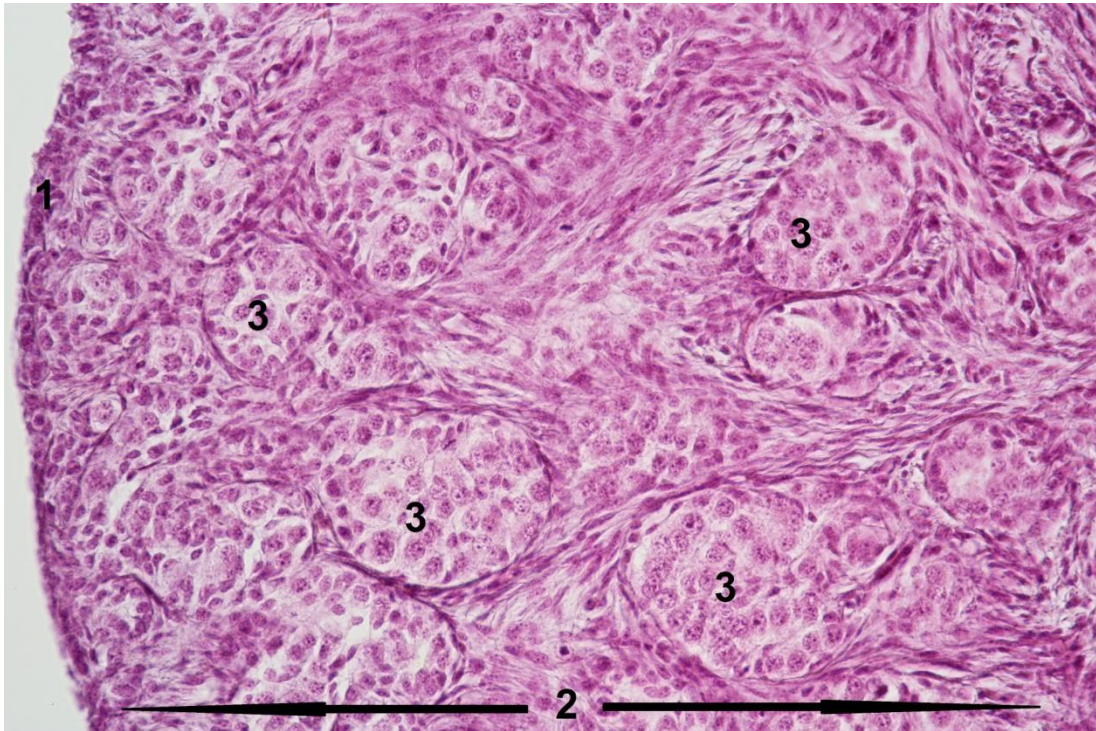
- na povrchu vaječníku štěněte č. 2 je dobře pozorovatelný epitel, jehož buňky se barví tmavě fialovou barvou
- těsně pod epitelem a ve vnější vrstvě kůry vaječníku jsou již dobře patrná jednotlivá hnízda oogonií. Primordiální folikuly jsme zde nepozorovali.
- hnízda oogonií jsou oddělena vazivovými buňkami a doprovodnými epiteliálními buňkami, ze kterých následně v průběhu oogeneze vznikají buňky folikulární
- oogonie jsou dobře pozorovatelné buňky, které mají kulovitý tvar se světle fialově zbarvenou cytoplazmou. Jádra oogonií se barví tmavěji. Oproti tomu doprovodné epiteliální buňky jsou menší, jejich jádro se barví výrazněji bez viditelných hrudek chromatinu.
- stejně jako u předchozích preparátů je viditelné řidší vazivo v blízkosti epitelu a vnější vrstvě kůry vaječníku
- vzhledem k tomu, že jsou zde dobře viditelná samostatná hnízda oogonií, můžeme toto považovat za další stádium postnatálního vývoje struktury vaječníku štěněte



Obr. štěně č. 3 (zvětšeno 304x), stáří 0 dní

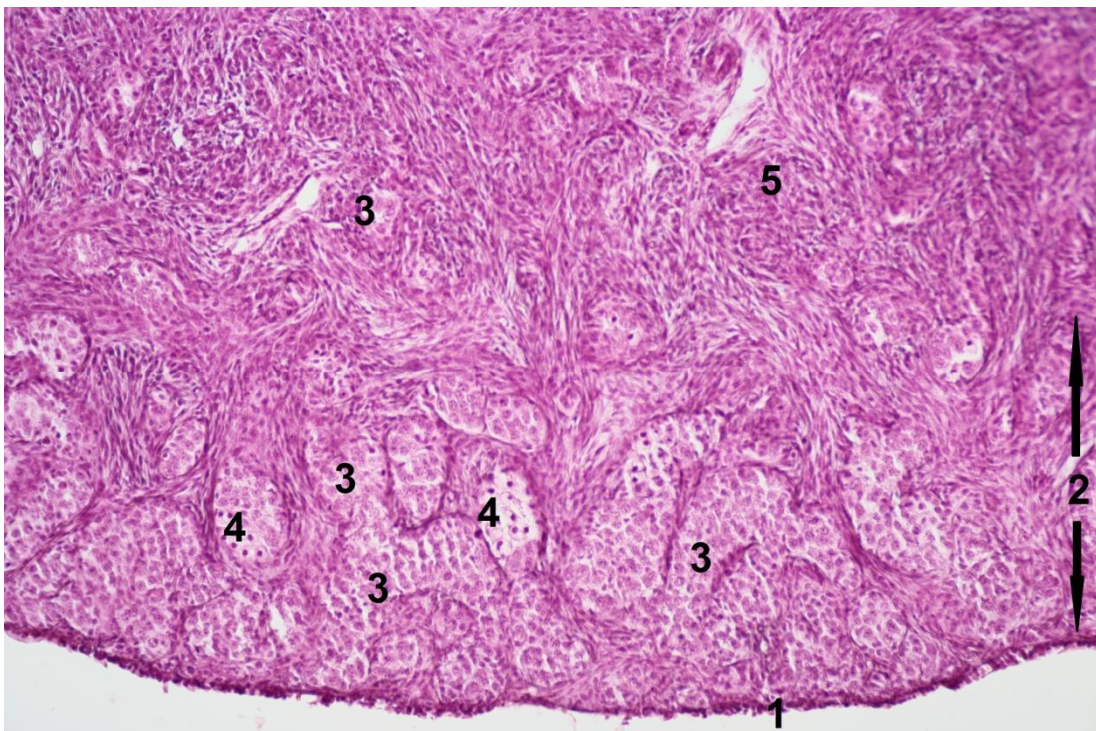
1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií, 4. zanikající oogonie

- na preparátu štěněte č. 3 je velmi dobře pozorovatelný zárodečný epitel, na kterém je patrné, že jde o jednovrstevný kubický epitel
- epitel je neporušený a v jeho blízkosti nebyly pozorovány žádné primordiální zárodečné buňky
- jako u předchozích preparátů jsou zde již zformována hnízda oogonií oddělená vazivem a doprovodnými epiteliálními buňkami
- pozorovali jsme buňky s výrazně barvitelným jádrem a téměř nezbarvenou nebo jen velmi světle zabarvenou cytoplazmou, které považujeme za apoptotické neboli zanikající oogonie
- zanikající oogonie se nacházely ve vnější vrstvě kůry vaječníku, ale žádné v blízkosti epitelu



Obr. štěně č. 4 (zvětšeno 304x), stáří 2 dny

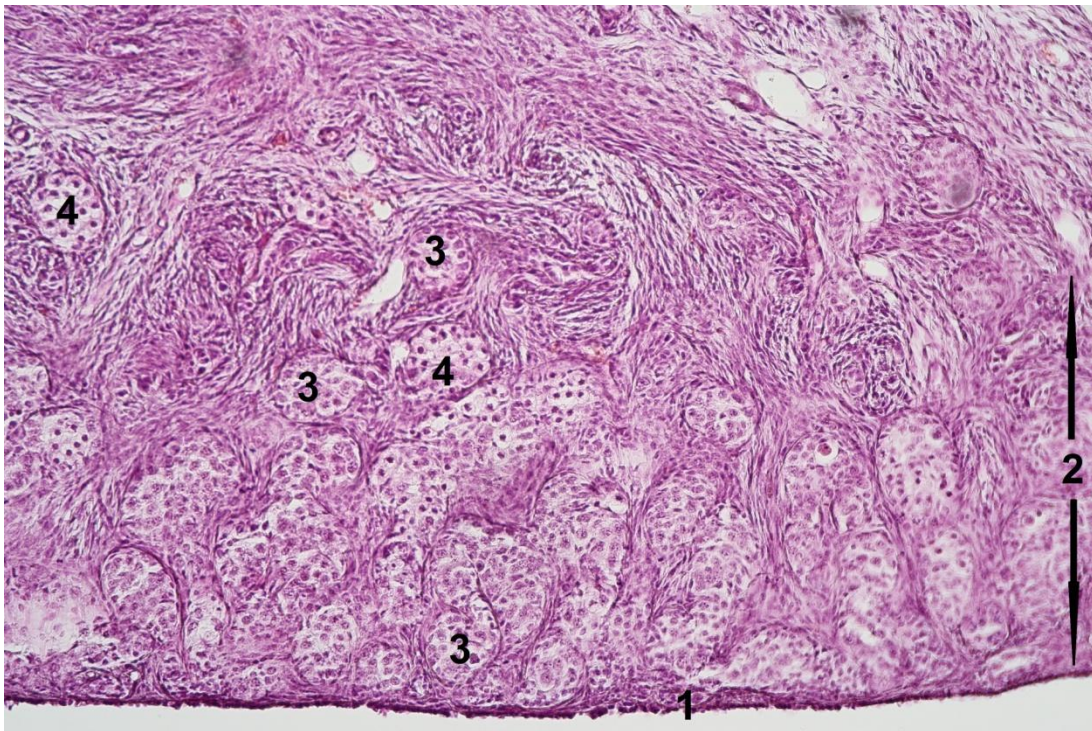
1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií



Obr. štěně č. 4 (zvětšeno 142x), stáří 2 dny

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry, 3. hnízda oogonií, 4. zanikající oogonie, 5. vnitřní vrstva kůry

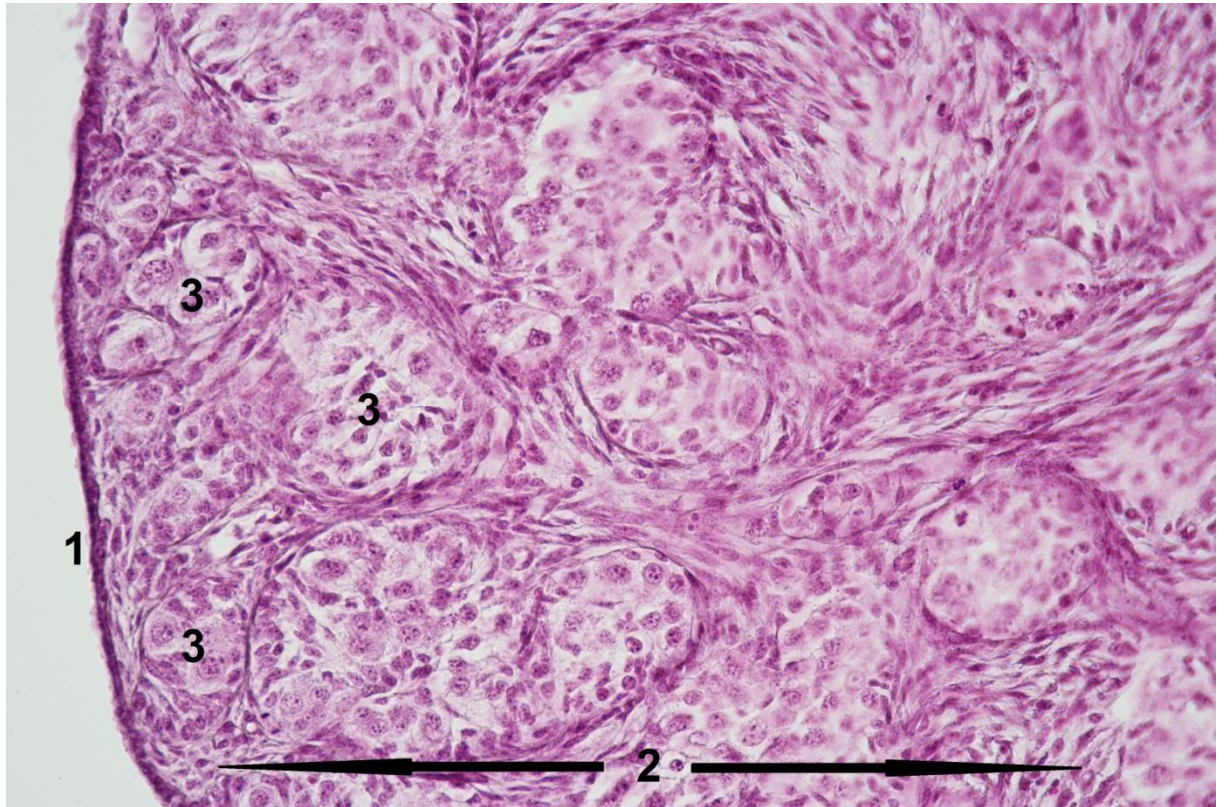
- vaječník u štěněte č. 4 je pokrytý jednovrstevným kubickým epitelem
- hnízda oogonií jsou viditelně zformována a oddělená vazivem a doprovodnými epiteliálními buňkami. Vrstva vazivových a doprovodných buněk je na tomto preparátu tenčí než u předchozích vaječnicků štěňat.
- je zde také patrné, že u epitelu se nacházejí menší hnízda oogonií, která se směrem dovnitř kůry vaječnicku zvětšují
- přestože jsou viditelná různě velká hnízda oogonií, nikde nebylo pozorováno mitotické dělení oogonií vaječnicku
- při menším zvětšení stejného preparátu jsou viditelná i hnízda s apoptotickými oogoniemi
- při menším zvětšení je také patrné, že větší hnízda oogonií se nacházejí více ve vnitřní vrstvě kůry vaječnicku, avšak ojediněle zde pozorujeme i velmi malá hnízda ohraničená velkým množstvím vaziva



Obr. štěně č. 6 (zvětšeno 142x), stáří 2 dny

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry, 3. hnízda oogonií, 4. zanikající oogonie, 5. vnitřní vrstva kůry

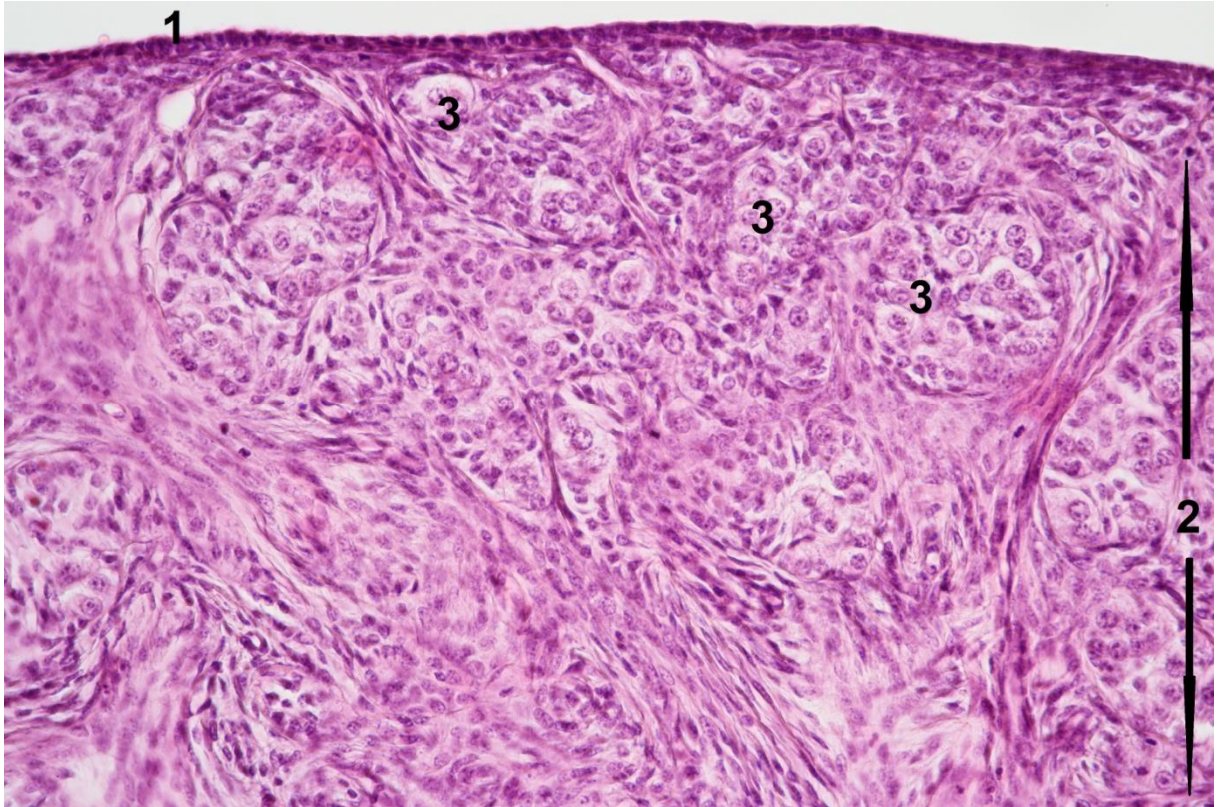
- u štěněte č. 6 byla pozorována stejná struktura vaječnicku jako u štěněte č. 4



Obr. štěně č. 5 (zvětšeno 304x), stáří 2 dny

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry, 3. hnízda ogonií

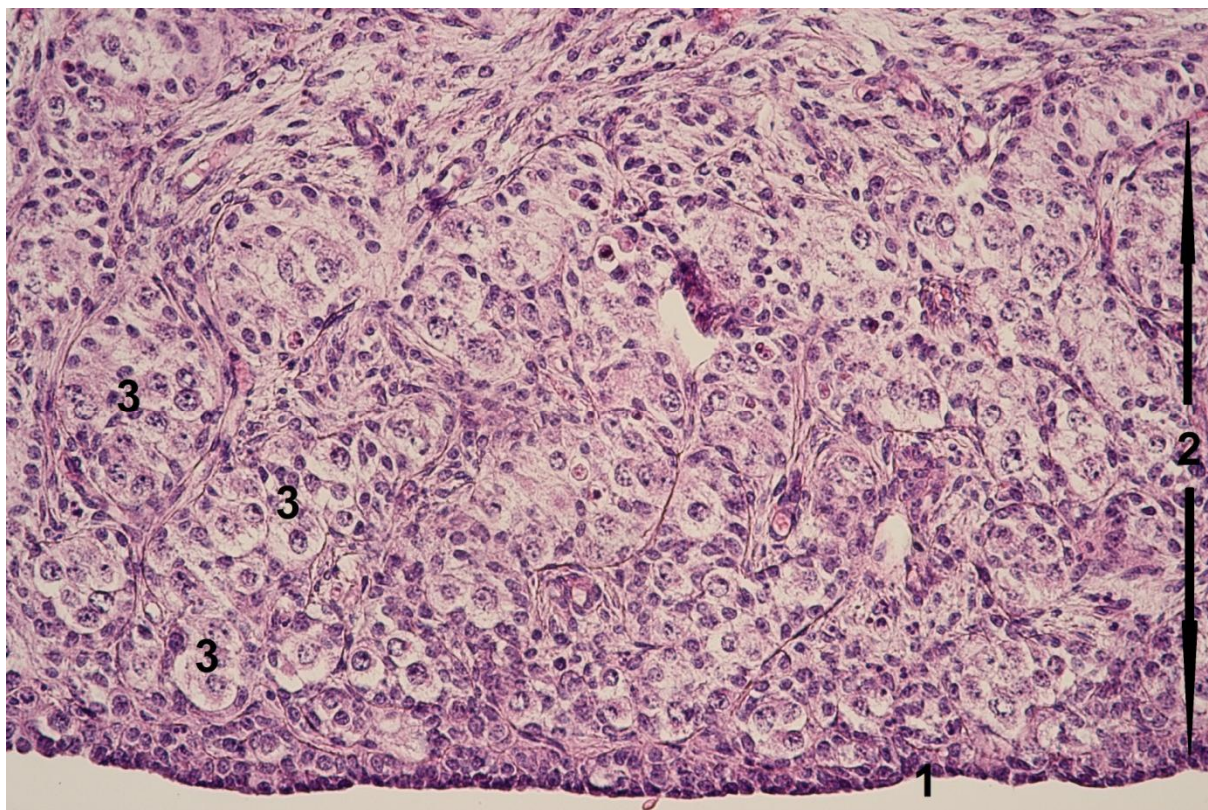
- povrch vaječníku štěněte č. 5 je krytý jednovrstevným kubickým zárodečným epitelem
- ve vnější vrstvě kůry vaječníku jsou velmi dobře pozorovatelná jednotlivá hnízda ogonií, která jsou oddělována vazivovými a doprovodnými epiteliálními buňkami
- ve vnější vrstvě kůry vaječníku se nacházela různě velká hnízda ogonií, avšak úplně nejmenší hnízda jsou viditelná blízko epitelu. Takto malá hnízda se nenacházela v jiných vrstvách kůry.
- u epitelu jsou pozorovatelné i jednotlivé ogonie, které nejsou výrazně oddělené vazivem nebo doprovodnými epiteliálními buňkami
- zárodečný epitel je na preparátu souvislý a jednotlivé ogonie na epitel pouze přisedají. Nelze tedy vyvodit jasný závěr, že by ogonie mohly vznikat přímo z epitelu.
- na preparátu nebyly pozorovány žádné primordiální zárodečné buňky (PGC, gonocyty)



Obr. štěně č. 9 (zvětšeno 304x), stáří 0 dní

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií

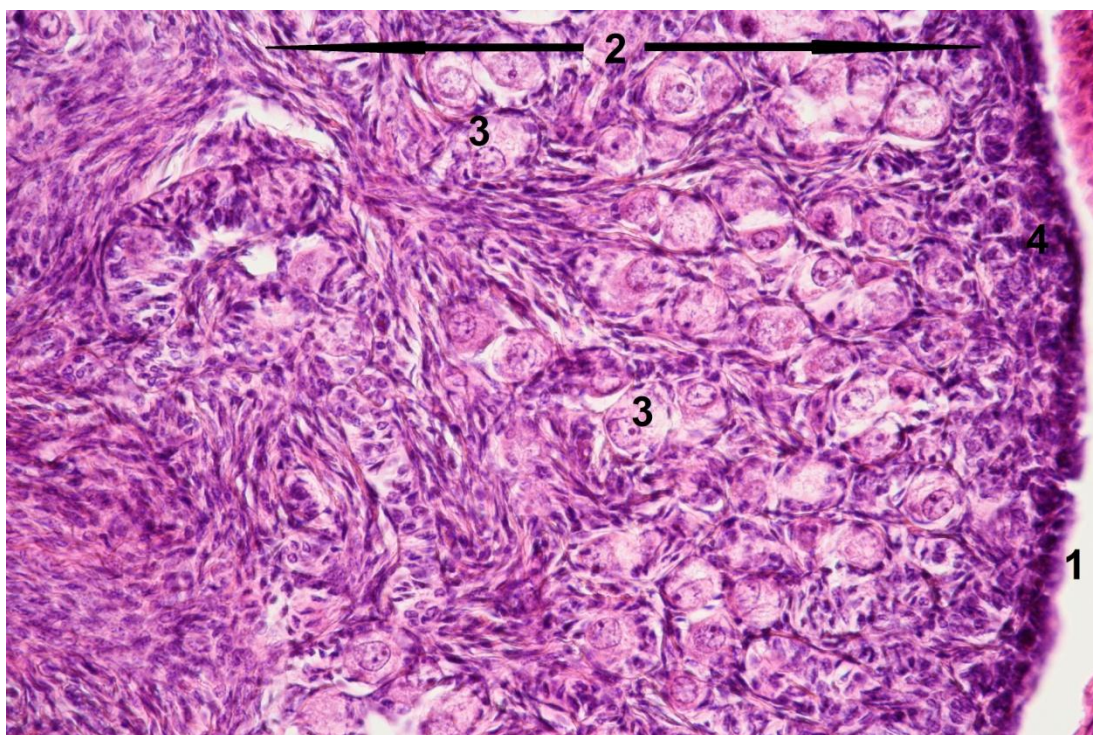
- u preparátu štěně č. 9 byla pozorována podobná struktura vaječníku jako u předchozího preparátu štěně č. 5
- na povrchu se nachází jednovrstevný kubický epitel, který je souvislý a neporušený
- na epitel přisedají velmi malá hnízda oogonií a v některých místech i samostatné oogonie



Obr. štěně č. 8 (zvětšeno 304x), stáří 1 den

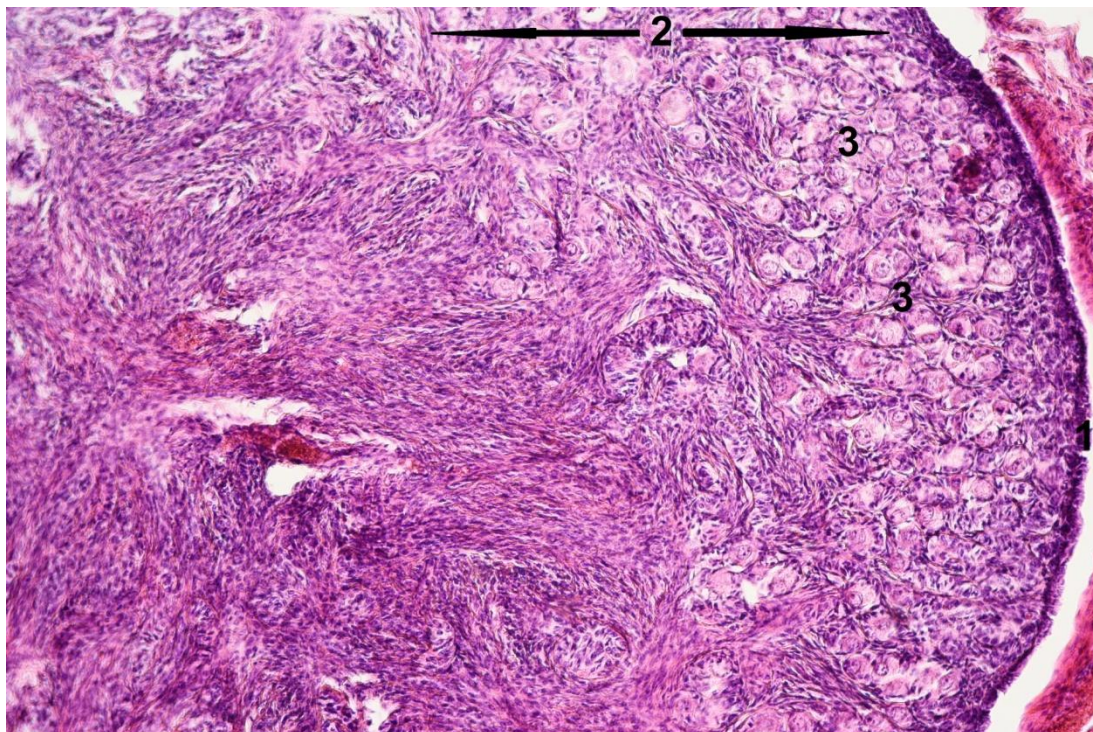
1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječníku, 3. hnízda oogonií

- u štěněte č. 8 byla pozorována podobná struktura jako u předchozích vaječnicků s viditelně zformovanými hnízdy oogonií a silnější vazivovou vrstvou ve vnitřní vrstvě kůry vaječníku



Obr. štěně č. 11 (zvětšeno 304x), stáří 42 dní

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry vaječnicku, 3. formující se primordiální folikuly, 4. hustší vrstva vaziva pod epitelem (vznikající *tunica albuginea*)



Obr. štěně č. 11 (zvětšeno 142x), stáří 42 dní

1. epitel, 2. vnější vrstva kůry, 3. formující se primordiální folikuly, 4. vazivová vrstva

- na preparátu vaječníku štěněte č. 11 jsou již patrné viditelné změny v utváření struktury vaječníku oproti předchozím preparátům
- povrch vaječníku je krytý jednovrstevným kubickým epitelem, tak jak u preparátů několik dnů starých štěňat
- pod zárodečným epitelem se začíná tvořit hustší vrstva vaziva, která dává základ pro vznik vazivové vrstvy *tunica albuginea*
- nepozorujeme hnízda oogonií oddělených vazivem, ale postupně se formující primordiální folikuly
- při menším zvětšení je zřetelné, že struktura kůry a dřene vaječníku štěněte 42 dnů starého se začíná více podobat vaječníku dospělé feny. Kůra vaječníku již není tak výrazně tvořena provazci vaziva jako u preparátů štěňat starých jen několik dní. V kůře nacházíme hlavně oogonie a formující se primordiální folikuly. Oproti tomu dřeň je tvořena vazivem a cévami tak, jako u dospělé feny.

Z popisu histologických preparátů vaječníku štěnat jsme došli k několika závěrům. Při porovnání struktury vaječníku štěněte a pohlavně dospělé feny jsme pozorovali odlišnosti v jednotlivých vrstvách vaječníku (kůra, dřev). U dospělé feny pozorujeme jednovrstevný kubický epitel, což je stejné i v případě štěněte těsně po narození. Avšak u dospělé feny nacházíme těsně pod epitelem zesílenou vrstvu vaziva nazývanou *tunica albuginea*, která u štěněte chybí. Dále jsou viditelné rozdíly v utváření kůry a dřev. Ve vaječníku dospělé feny pozorujeme v kůře folikuly v různém stádiu vývoje (primární, sekundární, terciární Graafovy folikuly) a dřev je tvořena vazivem a cévami. U štěněte je nejhustší vrstva vaziva ve vnitřní vrstvě kůry vaječníku a vazivové buňky cestují i do vnějších vrstev a spolu s doprovodnými epiteliálními buňkami oddělují jednotlivá hnízda oogonií.

Na všech preparátech byl pozorován jednovrstevný kubický epitel, který kryje celý povrch vaječníku a nikde nebylo pozorováno jeho porušení nebo přítomnost primordiálních zárodečných buněk v blízkosti zárodečného epitelu.

U všech preparátů vaječníku štěnat jsme pozorovali malá hnízda oogonií v blízkosti epitelu, která se směrem do vnitřní vrstvy kůry zvětšovala. Jednotlivá hnízda byla zřetelně oddělena vazivovými a epiteliálními buňkami, které dávají základ budoucím folikulárním buňkám. Ve vnitřní vrstvě kůry vaječníku byla pozorována malá hnízda oogonií jen velmi ojediněle.

Na některých preparátech byly viditelné oogonie s nezbarvenou cytoplazmou a výrazně zbarveným jádrem, které považujeme za zanikající (apoptotické) oogonie.

Na žádném preparátu vaječníku štěnat jsme nepozorovali primordiální zárodečné buňky a oddělování jednotlivých oogonií.

6 Diskuze

Na všech preparátech, které byly pro tuto práci zhotoveny, jsme pozorovali na povrchu vaječníku jednovrstevný kubický epitel. Jedná se o buňky, které se barví výrazně tmavěji než ostatní buňky vaječníku a díky tomu jsou dobře identifikovatelné. Podle Beláka a kol. (1990) jsou buňky epitelu ploché nebo kubické a nedají se vždy spolehlivě identifikovat. Marvan a kol. (2007) uvádí, že povrch vaječníku je krytý epitelem u mladých jedinců jednovrstevným cylindrickým, později kubickým a u starých zvířat dlaždicovým. Toto tvrzení se v našem případě nepotvrdilo, neboť epitel na vaječníku štěňat i dospělé feny byl jednovrstevný kubický.

Podle Beláka a kol. (1990) se pod epitelem vaječníku nachází silnější vrstva vaziva, která vytváří bílý obal a nazývá se *tunica albuginea*. Na preparátech vaječnicků štěňat č. 1 až č. 10 není patrné žádné hustší vazivo pod epitelem a nenacházíme zde ani náznak vazivové vrstvy *tunica albuginea*. U štěněte č. 11, které je 42 dní staré můžeme pozorovat postupně zesilující se vazivovou vrstvu tvořící se těsně pod zárodečným epitelem. Na preparátu čivavy 1 rok staré je již zřetelně viditelná silná vazivová vrstva pod epitelem, kterou nazýváme *tunica albuginea*. Mnoho dalších autorů popisuje, že pod epitelem je vazivová vrstva, ale žádný z autorů se nezmiňuje, je-li přítomna při narození a dochází-li k jejímu vývoji před nebo po narození.

Podle Evanse a Christensena (1979) rozdělujeme vaječnick na kůru a dřev. K tomuto tvrzení se přiklání mnoho dalších autorů a Belák (1990) rozdělují strukturu vaječníku na *zona parenchymtosa* a *zona vasuculosa*. Dále uvádí, že *zona parenchymtosa* (kůra) obsahuje folikuly a žlutá tělíska a *zona vasuculosa* (dřev) obsahuje cévy a Reece (1998) ještě dodává, že v dřevu nacházíme kolagenní vazivo. U mnoha autorů se setkáváme s názorem, že kůra vaječníku je tvořena vazivovými buňkami (fibroblasty, fibrocyty), které se dobře přizpůsobují změnám způsobeným růstem folikulů ve vaječníku. Dřev je tak hlavně tvořeno cévami, nervy, ale také řídkým vazivem se sítí elastických vláken. Na našich preparátech tento popis odpovídá pouze vaječníku čivavy 1 rok staré, u které jsou jasně viditelné folikuly v různém stádiu vývoje a žluté tělísko v korové vrstvě, která obsahuje vazivo a hustou vazivovou vrstvu *tunica albuginea* pod epitelem. Ve dřevu zde také nacházíme vazivové buňky a velké množství cév, které zajišťují krvení vaječníku. Na preparátech vaječnicků štěňat č. 1 až č. 10 je struktura dřevě a kůry odlišná od tohoto popisu. U všech štěňat jsme pozorovali velmi

výraznou vazivovou vrstvu ve vnitřní vrstvě kůry vaječníku. Toto vazivo tvoří provazce, které vstupují do vnější vrstvy kůry vaječníku a spolu s epiteliálními buňkami oddělují jednotlivá hnízda oogonií. Vnější vrstva kůry vaječníku štěňat není vazivově bohatší než dřeň. K postupné změně struktury vaječníku dochází až v období po narození štěněte, fenky. Preparát č. 11, kde pozorujeme vaječník 42 dnů starého štěněte, mnohem více odpovídá popisu kůry a dřene vaječníku podle autorů uváděných v literární rešerši. Pod epitem se již tvoří vazivová vrstva *tunica albuginea* a ve vnější vrstvě kůry nacházíme formující se primordiální folikuly.

Horký a Mikyska (1984) uvádějí, že folikulární buňky se řadí kolem oogonie a dochází tak k zakládání primárních folikulů, které všechny nedozrají a část jich zaniká ještě v intrauterinním životě, část po narození, takže do období pohlavní dospělosti se jejich počet výrazně sníží. Stejně tak popisuje i Marvan a kol. (2007), že ke vzniku primárních oocytů z oogonií dochází ve vaječnicích do konce prenatalního období a po narození již nové primární oocyty nevznikají. Tato skutečnost platí v případě mnoha hospodářských zvířat, avšak v případě feny docházíme k názoru, že celkový proces oogeneze a folikulogeneze je značně posunut oproti hospodářským zvířatům. Vycházíme tak z pozorování našich preparátů. U preparátů vaječnicků štěňat č. 1 až č. 10, která uhynula nebo byla usmrcena z důvodu závažného onemocnění několik málo dní po narození, nepozorujeme žádné folikuly a to ani počátek formování primordiálních folikulů, které by podle Marvana a kol. (2007) a Horkého a Mikysky (1984) měly vznikat již v období před narozením. Stejně tak uvádí i mnoho autorů z humánní embryologie. Formování primordiálních folikulů bylo pozorováno u preparátu č. 11 (vaječník štěněte 42 dnů po narození).

U preparátů vaječnicků štěňat č. 1 až č. 10 jsou dobře viditelné oogonie tvořící hnízda. U epitelu jsme pozorovali malá hnízda oogonií, která byla oddělována provazci vazivových buněk vycházejících z vnitřní vrstvy kůry vaječníku. Z epitelu se oddělovali doprovodné epiteliální buňky cestující spolu s provazci vaziva a tvoří tak jednotlivě oddělená hnízda oogonií. Směrem do vnitřní vrstvy kůry se hnízda oogonií zvětšují a jsou i výrazněji oddělená vazivovými a epiteliálními buňkami. Jen na preparátu č. 4, č. 7 a č. 10 byla pozorována ojedinělá malá hnízda oogonií ve vnitřní vrstvě kůry vaječníku a byla oddělena výraznější vrstvou vaziva než hnízda oogonií ve vnější vrstvě kůry vaječníku.

Na všech preparátech vaječnicků štěňat jsou pozorovatelné pouze oogonie, nikoliv primární folikuly a primární oocyty jak by tomu mělo být podle popisu Marvana (2007) a

Horkého a Mikysky (1984). Teprve až na preparátu č. 11 (vaječník štěněte 42 dnů po narození) je patrné formování primordiálních folikulů. Rozdílně probíhá vývoj na vaječnicku kotěte 1. den po porodu (obr. 77, přílohy), kde můžeme pozorovat oddělování oogonií od epitelu a tvoření provazců, ale také ve vnitřní vrstvě kůry vaječnicku primární folikuly. Z tohoto pozorování usuzujeme, že tvorba primárních folikulů u feny je posunuta do prvních dnů života po narození. Našemu tvrzení dopovídá i výzkum provedený Blackmorem a kol. (2004) kteří uvádějí, že folikulogeneze u psa probíhá 2. – 12. týden po narození. Dále také popisují, že u 16 týdnů staré feny byly pozorovány primordiální folikuly, primární folikuly, sekundární folikuly, časné preantrální folikuly, antrální folikuly a folikuly, které obsahovaly více oocytů. Nebyla zaznamenána žádná žlutá tělíska, což dokazuje, že u takto staré fenky nedochází k ovulaci.

Marvan a kol. (2007) se domnívají, že převážná většina primárních folikulů se dále nevyvíjí a podléhá zániku – atrézii. K atréziím primárních folikulů dochází v průběhu celého života samice, nejvíce však před obdobím puberty a v období končící pohlavní aktivity. I přesto zůstává ve vaječnicku pohlavně dospělé samice mnohem větší množství folikulů, než může během celého jejího života dozrát. Naproti tomu výzkum McDougall a kol., (1997) popisuje, že vaječnický peripubertálních fen, tj. ve věku 6 – 10 měsíců, obsahují mnohem větší počet folikulů než u fen prepubertálních (mladších 6 měsíců) a dospělých fen (starších 10 měsíců), což by mohlo odpovídat naší teorii o posunu vývoje folikulů u feny do postnatálního období.

König a Liebich (2002) uvádějí, že pouze mizivá část embryonálně založených folikulů, a tím i vajíček, dosahuje stádia zralého Graafova folikulu. Většina folikulů během svého růstu podléhá zániku neboli atrézii folikulů. Shodně uvádí i Marvan (2007), že oogeneze v plném rozsahu se uskutečňuje jen u malé části populace pohlavních buněk. Na našich preparátech jsme pozorovali atretující oogonie. U vaječnicků štěňat č. 3, č. 4 a č. 6 byly viditelné zanikající oogonie a v některých částech vaječnicku dokonce zanikající celá hnízda oogonií. Z tohoto pozorování jsme vyvodili několik otázek. Jaký mechanismus řídí zánik (atrézii) oogonií a co určuje, že se některé oogonie vyvinou do stádia oocytu a ve svém vývoji pokračují až do konečného stádia Graafova folikulu, který ovuluje a může dojít až k jeho oplození? Jedná se o první selekci genů? Informace pro zpracování odpovědí na tyto otázky zatím v dostupné literatuře chybí.

Doležel a Kudláč (1997) uvádějí, že do 2 – 3 měsíců stáří feny folikuly obsahují obvykle jeden oocyt, jedná se o tzv. monovulární folikuly. Po tomto období dochází ke zvýšení počtu tzv. polyovulárních folikulů, které obsahují 2 – 6 oocytů. Na našem preparátu dospělé feny (čivava, 1 rok) jsme nepozorovali žádné polyovulární folikuly, avšak v diplomové práci z roku 2011 o histologii vaječnicků štěnat byl polyovulární folikul pozorován u 6 měsíců staré dogy. Blackmore a kol. (2004) popisuje, že některé folikuly obsahují více oocytů, což je jev, který byl již dříve zaznamenán u juvenilních psů. Podle výzkumu Barbera a kol. (2001) je zajímavé, že v jednom folikulu, který obsahoval více oocytů, se tyto oocyty nacházely v různých stádiích vývoje. Luvoni a kol. (2005) popisuje, že příčina a význam tohoto jevu zůstávají neobjasněny, ale pravděpodobně k tomuto dochází z důvodu velké hustoty primordiálních folikulů u mladých fen, které se mohou následně spojovat.

Epitel nacházející se na povrchu vaječnicku je některými autory nazýván zárodečný. Belák a kol. (1990) popisuje, že název zárodečný se odvodil z chybné teorie, že z epitelu vznikají kmenové buňky pro vývoj pohlavních buněk. Dále také popisuje, že se tento název zachoval i přesto, že primordiální pohlavní buňky nevznikají v epitelu, ale mají extragonádální původ a pocházejí z entodermu. K tomuto názoru se přiklání i Jelínek a kol. (2002) a dodává, že se dříve chybně myslelo, že oocyty jsou přímo derivátem krycího epitelu vaječnicku. Oproti tomu Rozinek a Ješeta (2012) uvádějí, že zárodečný epitel byl pojmenován z toho důvodu, že v krátkém úseku prenatalního vývoje samice do tohoto krycího epitelu docestují primordiální zárodečné buňky a začnou se intenzivně dělit, spolu se sousedními epiteliálními buňkami, za vzniku provazců nebo hnízd oogonií a doprovodných buněk. Stejně tak uvádí i Klika (1980) a další autoři z oblasti humánní embryologie jako např. Čihák a kol. (2002) nebo Vacek (2006), že prvopohlavní buňky vcestují do základu vaječnicku, začnou se rychle mitoticky dělit a vznikají z nich oogonie. Dále také uvádějí, že uspořádání buněk v provazce přestává být brzy patrné rychlým množením ženských pohlavních zárodečných buněk oogonií, takže již ve 3. měsíci nabývá kůra charakteru souvislého blastému. V blastému převládají velké světlé oogonie s měchýřkovitým jádrem, mezi nimiž se nacházejí malé indiferentní buňky celomového epitelu a buňky mezenchymové. Indiferentní buňky celomového epitelu se poté diferencují ve folikulární buňky. Rozinek a Ješeta (2012) popisují, že tento proces probíhá v těle štěněte, fenky, těsně před porodem a končí v prvních dnech po porodu.

V našich preparátech vaječníků štěňat jsme nepozorovali žádné primordiální zárodečné buňky ani množení oogonií tvořících provazce (Pflügerovy provazce). Naopak na vaječniku kotěte starého 6 dní (obr. 40, přílohy) jsou dobře viditelné primordiální zárodečné buňky nacházející se v zárodečném epitelu. U kotěte jsou také patrné souvislé pruhy velkých světlých buněk (Pflügerovy provazce), které považujeme za nově vznikající oogonie. Oproti tomu na vaječniku štěněte starého několik dní jsou dobře pozorovatelná hnízda oogonií, která jsou v blízkosti epitelu menší a méně zřetelně oddělená vazivovými a epiteliálními buňkami a směrem do vnitřní vrstvy kůry nacházíme již jasně oddělená větší hnízda oogonií. Vzhledem k tomuto pozorování se přikláníme k teorii, že primordiální zárodečné buňky se nacházejí v základu vaječniku a postupně cestují směrem k povrchovému zárodečnému epitelu, kde se začínají množit a dochází ke vzniku oogonií, které jsou viditelné u štěňat starých několik dní.

7 Závěr

Naším předpokladem bylo, že vývoj hlavní struktury vaječníku, folikulů, které obsahují oocyty je u psa posunut do časného postnatálního období oproti hospodářským zvířatům. U hospodářských zvířat bylo popsáno, že k vývoji vaječníku a folikulů dochází v období před narozením a mláďata se tak rodí s velkou zásobou primárních folikulů.

Tento předpoklad byl potvrzen pozorováním a vyhodnocením vaječníků jedenácti štěňat a jedné pohlavně dospělé feny. Na preparátech vaječníků štěňat starých jen několik málo dnů nebyly pozorovány žádné folikuly ani formování primordiálních folikulů. Na těchto preparátech byly dobře viditelné oogonie, které tvořily malé shluky u epitelu a směrem do vnitřní vrstvy kůry vaječníku oogonie tvoří samostatná hnízda, která jsou oddělená vazivem a doprovodnými epiteliálními buňkami. U štěňate ve věku 42 dní jsme pozorovali formování primordiálních folikulů a postupně vznikající hustší vazivovou vrstvu pod epitelem *tunica albuginea*, které není na preparátech mladších štěňat pozorovatelná. U roční feny struktura vaječníku odpovídala popisu z dostupné literatury zabývající se histologií a embryologií.

K porovnání jsme použili i obrázky histologických preparátů vaječníků kotěte. Na vaječníku kotěte 6. den po porodu můžeme pozorovat primordiální zárodečné buňky a primární folikuly. U kotěte 1. den po porodu pozorujeme oddělování oogonií od epitelu do vnitřní vrstvy kůry za vniku souvislých pruhů (Pflügerových provazců) a také primární folikuly. Na našich preparátech vaječníků štěňat jsme nepozorovali žádné primordiální zárodečné buňky, oogonie oddělující se od epitelu a vznikající Pflügerovy provazce.

Z těchto zjištění jsme došli k závěru, že vývoj vaječníku feny je posunut do postnatálního období a že primordiální zárodečné buňky se u feny nachází již v základu vaječníku, následně cestují k epitelu, kde se množí a vznikají tak oogonie.

8 Seznam literatury

- Barber M. R., Lee S. M., Steffens W. L., Ard M., Fayrer-Hosken R. A. 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*. 55 (8).1705-1717 s.
- Belák M., Mareta M., Zibrín M., Cigánková V., Horáková A. 1990. *Veterinární histologie. Příroda*. Bratislava. 504 s. ISBN: 8007002499.
- Blackmore D. G., Baillie L. R., Holt J. E., Dierkx L., Aitken R. J., McLaughlin E. A. 2004. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biology of reproduction*. 71 (2). 661 – 668.
- Cibulka, J., Fučíková, A., Härtlová, H., Jílek, F., Lánská, V., Sedmíková, M. 2004. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. ČZU. Praha. 202 s. ISBN: 9788021312470.
- Čihák R. (ed.) 2002. *Anatomie 2*. Grada. Praha. 488 s. ISBN: 802470143x.
- Doležel R., Kudláč E. (ed). 1997. *Veterinární gynekologie*. VFU. Brno. 144 s. ISBN: 8085114046.
- Evans H. E. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in domestic animals*. 38 (4). 240 – 246 s.
- Evans H. E., Christensen G. C. 1979. *Millers anatomy of the dog*. W. B. Saunders company. Philadelphia. 1181s. ISBN: 0721634389.
- Horký D., Mikyska E. 1984. *Veterinární embryologie*. Ediční středisko VŠV. Brno. 219 s.
- Jelínek R. (ed). 2002. *Histologie a embryologie*. 224 s.
- Klika E. 1980. *Embryologie člověka I. díl obrazová část*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 70 s.
- Klika E., Vacek Z., Dvořák M., Kapeller K. 1985. *Embryologie, učebnice pro lékařské fakulty*. Avicentrum. Praha. 255 s. ISBN: 8024712679.
- Kolda J. 1953. *Tělověda psa*. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha. 164 s.
- LeMaire W. J. 1989. Mechanism of mammalian ovulation. *Steroids*. 54 (5). 455 – 469 s.

- Luvoni G. C., Chigioni S., Allievi E., Macis D. 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63 (1). 41 – 59 s.
- König H. E., Liebich H. G. 2002. Anatomie domácích savců 2. díl. Hajko a Hajková. Bratislava. 416 s. ISBN: 8088700574.
- Kvapil R., Kvapilová R. 2007. Průvodce psí reprodukci. J. Špičák – Tok. Praha. 78 s. ISBN: 9788086177212.
- Makinoda S., Hirosaki N., Waseda T., Tomizawa H., Fujii R. 2008. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Current medicinal chemistry*. 15 (6). 604 – 613 s.
- Malínský J., Lichnovský V., Michalíková Z. 2008. Přehled embryologie člověka v obrazech. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 100 s. ISBN: 9788024422510.
- Marvan F. (ed). 2003. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 8020903194.
- McDougall K., Hay M. A., Goodrowe K. L., Gartley C. J., King W. A. 1997. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *Journals of reproduction & fertility*. 51. 25 – 31 s.
- Najbrt, R. (ed). 1982. Veterinární anatomie 2. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 596 s. ISBN: 0700682.
- Paulsen D. F. 2004. Histologie a buněčná biologie. Praha. H & H. 433 s. ISBN: 8073190249.
- Reece, W. O. 1998. Fyziologie domácích zvířat. Praha. Grada. 456 s. ISBN: 8071695475.
- Rozinek J., Jeřeta M. 2012. Praktická anatomie psa. ČZU. Praha.
- Rozinek J., Antalíková L., Birkeová P., Herčík J. 1995. Ovarian differentiation in the cat and dog during the perinatal period. *Scientia agriculturae bohemica*. 26 (4). 301 – 316 s.
- Songsasen N., Wildt D. E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal reproduction science*. 98 (1 – 2). 2 – 22 s.
- Svoboda, M., Senior., D. F., Doubek, J., Klimeš, J. a kol. 2001. Nemoci psa a kočky – II. Díl. Noviko. Brno. 1026 s. ISBN: 8090259537.

Telfer E., Gosden R. G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch. *Journals of reproduction & fertility*. 81. 137 – 147 s.

Tichý F., Horký D., Buchtová M., Gorošová A., Kociánová I., Páral V., Zibrín M. 2004. *Histologie, mikroskopická anatomie*. VFU. Brno. 275 s. ISBN: 8073054957.

Vacek Z. 2006. *Embryologie*. Grada. Praha. 256 s. ISBN: 8024712679.

Vacek Z. 1972. *Histologie a histologická technika*. Avicenum. Praha. 320 s. ISBN: 0802872.

Wolf J. 1954. *Mikroskopická technika optická i elektronická pro biologické účely*. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha. 651 s.

9 Přílohy

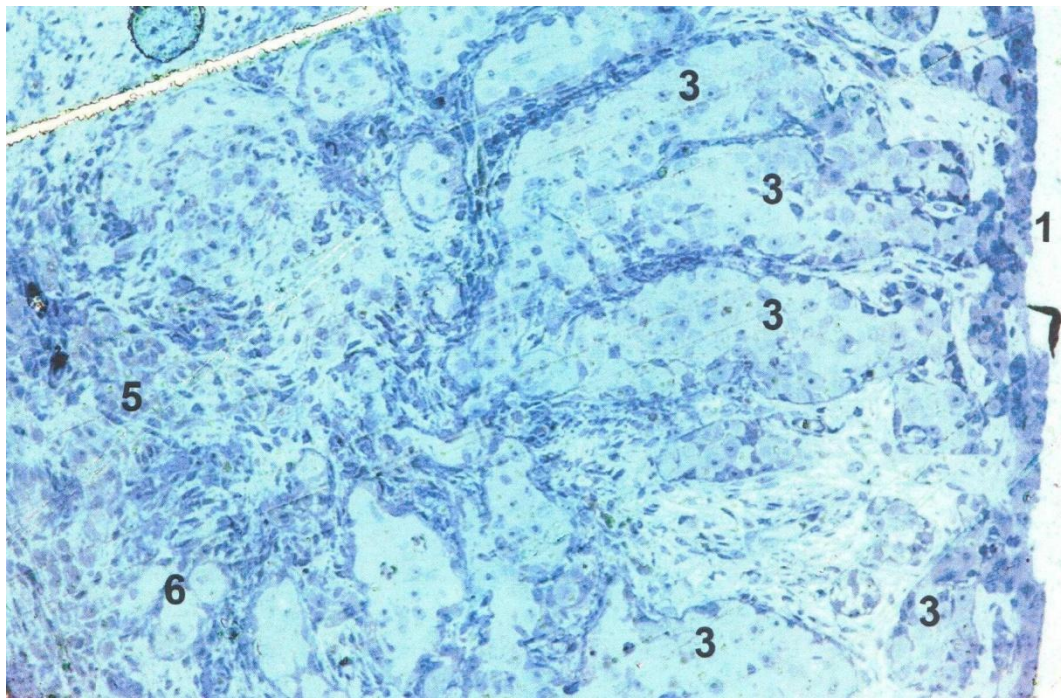
Seznam příloh:

Obr. 77 Vaječník kotěte 1. den po porodu (Birkeová, 1991)

Obr. 78 Vaječník kotěte 1. den po porodu (Birkeová, 1991)

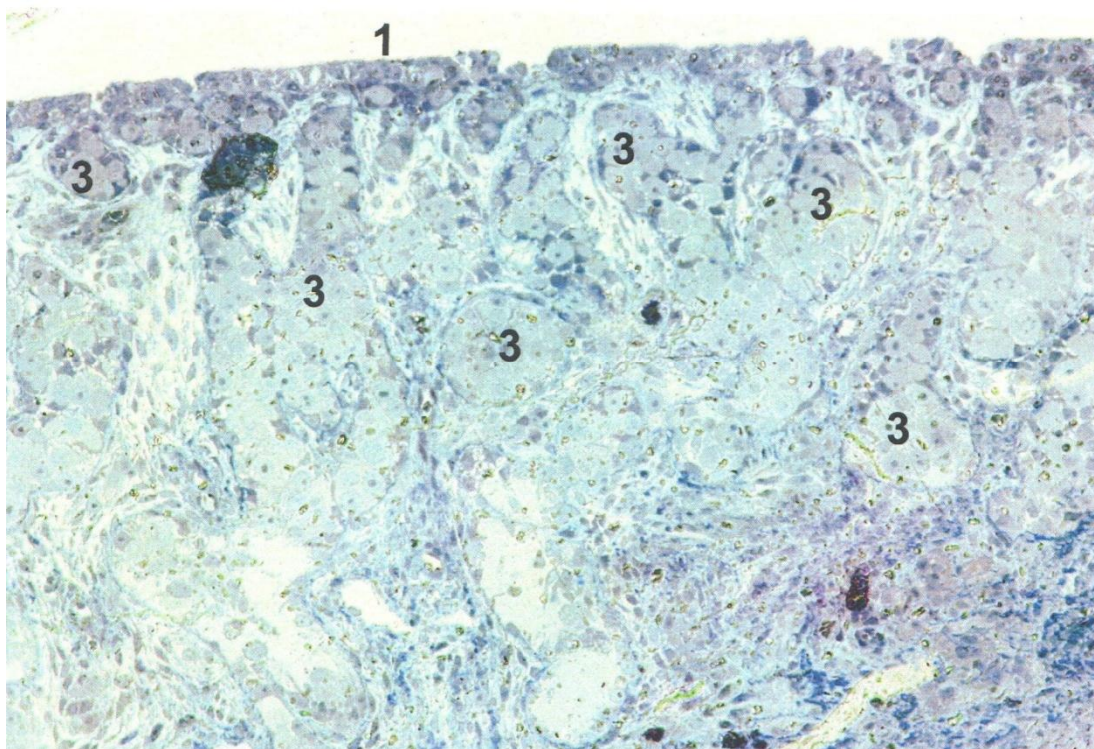
Obr. 40 Vaječník kotěte 6. den po porodu (Birkeová, 1991)

Obr. 84 Vaječník kotěte 6. den po porodu (Birkeová, 1991)



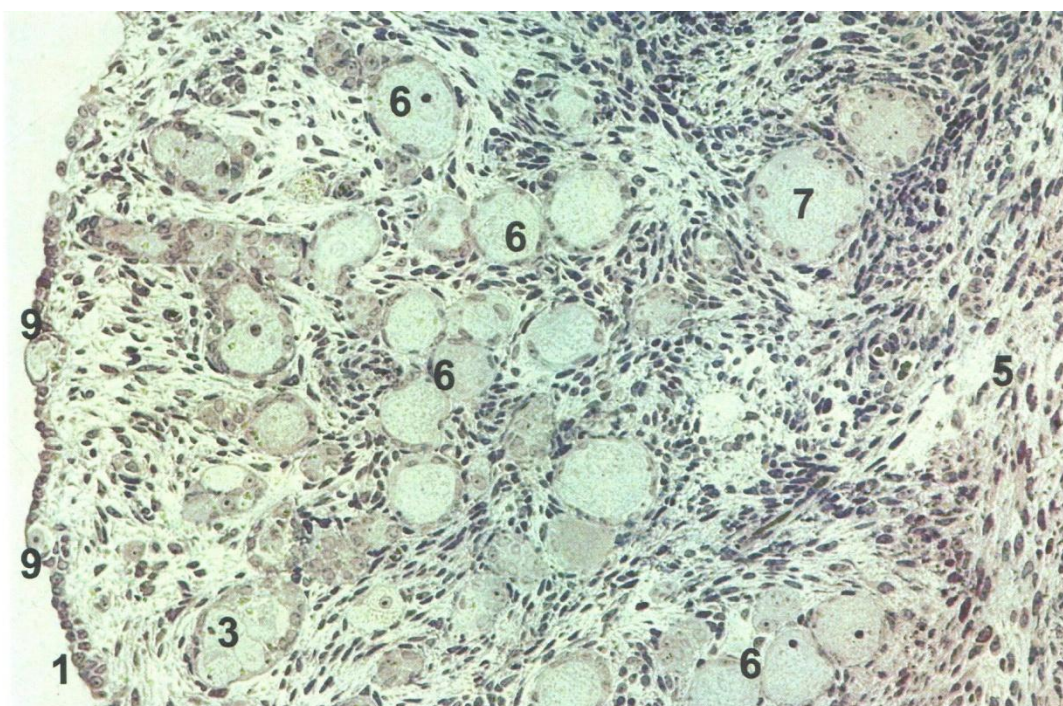
Obr. 77 Vaječník kotěte 1. den po porodu (zvětšeno 304x)

1. epitel, 2. hnízdo oogonií, 3. buněčné vazivo vnitřní vrstvy kůry vaječníku, 6. primární folikul



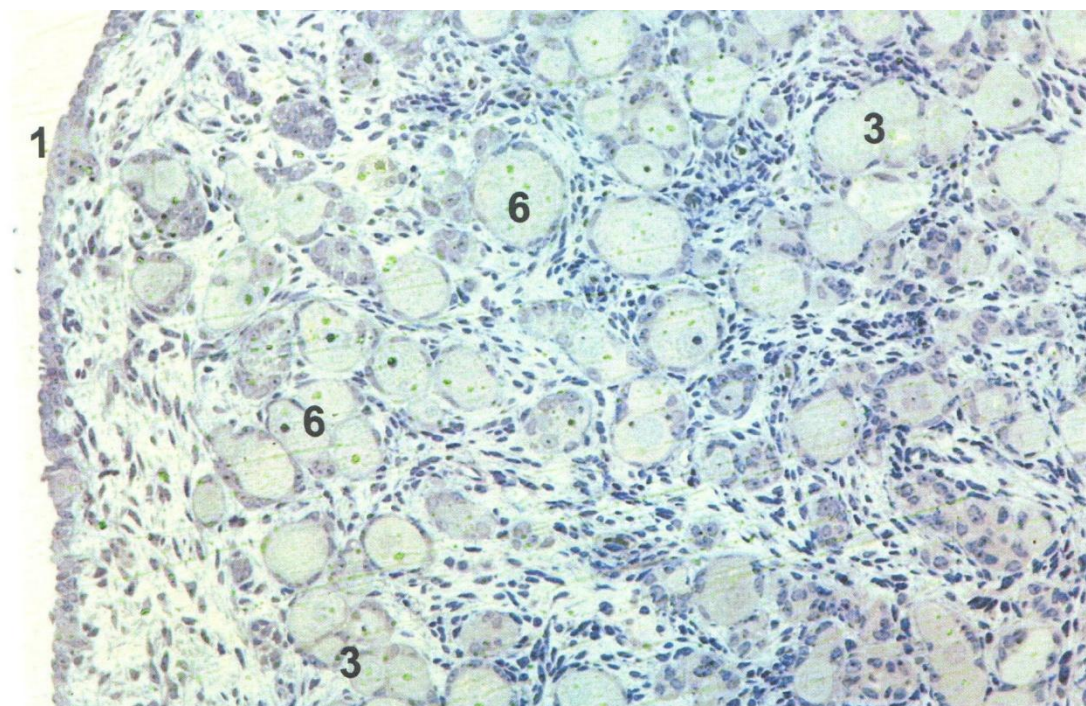
Obr. 78 Vaječník kotěte 1. den po porodu (zvětšeno 304x)

1. epitel, 3. hnízda oogonií



Obr. 40 Vaječník kotěte 6. den po porodu (zvětšeno 304x)

1. epitel, 3. hnízda oogonií, 6. primární folikul, 7. rostoucí folikul, 9. primordiální zárodečné buňky



Obr. 84 Vaječník kotěte 6. den po porodu (zvětšeno 304x)

1. epitel, 3. hnízda oogonií, 6. primární folikul

