

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologie
Zaměření: Terestrická Ekologie



Bc. Adam Tureček

Vliv steroidních hormonů na pohlavně dimorfní růst kostí gekonů

The effect of steroid hormones on sexually dimorphic bone growth in gekos

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lukáš Kubička, Ph.D.
Konzultant: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat školiteli RNDr. Lukáši Kubičkovi Ph.D. a konzultantovi prof. Lukáši Kratochvílovi Ph.D. za jejich trpělivost, ochotu a věcné rady při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Janu Červenkovvi Ph.D., který mi také pomáhal a poskytoval rady. Ještě bych chtěl poděkovat Mgr. Anně Pospíšilové za rady při přípravě enchondrálních vzorků a doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. vedoucímu Ústav histologie a embryologie 1. LF UK za přípravu kostních řezů. Ještě bych chtěl poděkovat své rodině, přátelům a přítelkyni, kteří mě vždy podporovali v mém snažení. V poslední řadě chci poděkovat pokusným zvířatům – gekonům madagaskarským (*Paroedura picta*), o které jsem se staral a u nichž si uvědomuji oběť, kterou položili ve jménu vědy. Naposled chci poděkovat GAUK (projektové číslo 363715) za finanční podporu projektu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 5. 2017

Podpis, Adam Tureček

Abstrakt

Pohlavní dimorfismus ve velikosti těla (SSD) je u živočichů velice rozšířen, dosud ale nejsou dostatečně známy proximální mechanismy zodpovědné za jeho ontogenezi ani u tak významné skupiny obratlovců, jako jsou plazi. Předchozí práce u gekonů ukazují, že je růst obou pohlaví v pozdějším věku výrazně zpomalen. SSD se u nich podstatněji rozvíjí až dlouho po dosažení pohlavní zralosti, souvisí s dřívějším ukončováním růstu menšího pohlaví a je regulován spíše ovariálními než testikulárními steroidními hormony. Cílem práce bylo rozvinout předchozí poznatky tím, že prostudují ontogenezi pohlavně dimorfního růstu kostí u gekona *Paroedura picta*, jehož samci jsou větší než samice, a který má v rámci skupiny nejlépe prozkoumané proximální mechanismy SSD. Konkrétně mě zajímalo, jak souvisí ontogeneze aktivity růstových plotének a epifyzální osifikace femuru obou pohlaví s jejich věkem, délkou těla, aktivitou gonád či s přirozenými hladinami významných pohlavně specifických steroidů (estradiolu a testosteronu). Z výsledků jednoznačně vyplývá, že *P. picta* má ukončený růst a osifikace epifyzy nemá na SSD vliv. Oběma pohlavím se obě femorální růstové ploténky uzavírají ve stejném věku, avšak samice mají v této době menší délku těla než samci. V kontextu výsledků předchozích studií mohou za zpomalení růstu samic vůči samcům zvýšené hladiny estradiolu nebo dalších ovariálních hormonů produkované zralými vaječníky, které zpomalují proliferativní aktivitu růstových plotének.

Klíčová slova: *Paroedura picta*, hormonální kontrola, pohlavní dimorfismus ve velikosti, velikost těla, steroidní hormony, ukončený růst, neukončený růst

Abstract

The sexual size dimorphism (SSD) is widespread among animals but proximate mechanisms of its ontogeny are still poorly understood even in important groups of vertebrates such as reptiles. Previous experiments in geckos showed that growth of both sexes slows substantially at their older age. Their SSD develops considerably a long time after sexual maturity, it is associated with earlier growth deceleration in the smaller sex and it is controlled by ovarian rather than testicular steroids. The aim of the thesis was to explore the previous knowledge by studying the ontogenesis of the sexually-dimorphic bone growth of the gecko *Paroedura picta*, the male-larger species with the most explored proximate mechanisms of SSD among geckos. I was most interested in the ontogeny of the growth plates activity and the epiphyseal ossification of the femur in both sexes and their relationship to age, body length, gonadal activity and levels of sex-specific steroids (estradiol and testosterone). The results show that *P. picta* has determinate growth and that epiphyseal ossification does not contribute to the SSD. The femoral growth plates close at the same age in both sexes; however, their closure occurs at smaller body length in females than in males. In the context of this and the previous studies, estradiol or other ovarian hormones produced by matured ovaries seem to be responsible for considerable deceleration of female growth via reduction of the proliferation activity of growth plates.

Keywords: *Paroedura picta*, hormonal control, sexual size dimorphism, body size, steroid hormones, determinate growth, indeterminate growth

Obsah

1. Úvod	6
2. Pohlavní dimorfismus ve velikosti těla (SSD)	7
2.1. Vznik SSD u obratlovců	7
2.1.1. SSD jako důsledek alokace do reprodukce	8
2.1.2. SSD jako důsledek působení gonadálních hormonů	9
3. Růst obratlovců.....	11
3.1. Osifikace a růst dlouhých kostí.....	13
3.1.1. Vliv gonadálních hormonů na proliferační aktivitu růstové ploténky.....	15
4. Pohlavně dimorfní růst kostí gekona <i>Paroedura picta</i>	16
5. Materiál a metodika	17
5.1. Experimentální zvířata	17
5.1.1. Gekon madagaskarský (<i>Paroedura picta</i>).....	17
5.1.2. Chov experimentálních zvířat.....	18
5.2. Postup experimentu	20
5.2.1. Odběry krve a měření hladin steroidních hormonů	21
5.2.2. Barvení femuru pro zjištění enchondrální osifikace a jeho vyhodnocení	23
5.2.3. Příprava histologických řezů pro zjištění aktivity růstové ploténky femuru a jejich vyhodnocení	24
5.2.4. Statistické zpracování	25
6. Výsledky.....	27
6.1. Růstové křivky a reziduály	27
6.2. Porovnání parametrů před a po začátku pohlavně dimorfního růstu	29
6.3. Porovnání uzavírání růstových plotének femuru	39
6.4. Průběh enchondrální osifikace epifýzy distálního femuru	41
7. Diskuze	44
7.1. SSD a pohlavně dimorfní růst kostí.....	44
7.2. Příčiny pohlavně dimorfního růstu kostí	45
7.3. Enchondrální osifikace distální epifýzy femuru	47
8. Závěr	48
9. Zdroje	49

1. Úvod

Velikost těla je důležitým znakem všech živočichů, který dále souvisí s většinou jejich vlastností a projevů (Peters 1983). Mnohé organismy rostou po celý život (od narození do smrti) – vykazují tzv. neukončený růst. U jiných (z obratlovců hlavně u savců a ptáků) bylo naopak pozorováno, že se jejich růst po dosažení dospělosti zastaví (Charnov a kol. 2001). Obě pohlaví také typicky nedorůstají stejných tělesných rozměrů a tento jev, nazývaný pohlavní dimorfismus ve velikosti těla, je mezi živočichy rovněž široce rozšířen (Abouheif a Fairbairn 1997; Fairbairn 1997; Fairbairn 2013). Růst je evidentně komplexní jev, který je fenotypově plastický a podílí se na něm mnoho vnějších i vnitřních faktorů. Mezi nejvýznamnější vnější faktory patří například přístup k potravě (Dunham 1978; Stamps a Tanaka 1981), sociální prostředí (Marlet a kol. 1995; Cox a John-Alder 2005), teplota prostředí (Starostová a kol. 2012) a mnoho dalších vlivů. Jako hlavní vnitřní faktory ovlivňující růst se uvádí např. rychlost metabolismu (Nagy 2005), rozdílná investice do reprodukce samců a samic (Frynta s kol. 2010; Frynta a kol. 2016) nebo vliv hormonů. Hormonální kontrola růstu je ovlivněna růstovým hormonem, který působí buď přímo nebo zprostředkovaně působením somatomedinů jako je IGF-I (Robinson a kol. 2002). Mezi hormony, které se nepřímo na růstu podílejí, patří glukokortikoidy, hormony štítné žlázy a steroidní hormony produkované gonádami (Nilsson a kol. 2005). U gonadálních steroidů se předpokládá, že působí především na růstovou dynamiku růstových plotének kostí, tvořených chrupavčitou tkání, které růst umožňují a jejichž uzavřením se růst jedince zastaví (Cutler 1997; Nilsson a kol. 2005).

Tato diplomová práce řeší aktuální otázky proximálních mechanismů růstu a pohlavního dimorfismu ve velikosti těla u šupinatých plazů. Plazi (vyjma ptáků) jsou obecně považováni za skupinu s neukončeným růstem, ale to spíš znamená, že rostou ještě dlouhou dobu po dosažení pohlavní zralosti. Je tedy vůbec otázka (až na pár výjimek překvapivě nedostatečně studovaná), zda i ještěři opravdu rostou po celý život nebo ne. Do popředí zájmu se dostává zejména s otázkami spojenými s působením gonadálních hormonů na uzavírání růstových plotének dlouhých kostí, které mohou mít obecný dopad na porozumění kontroly růstu a konečné velikosti této důležité skupiny obratlovců. Cílem práce tak bylo zjistit, jaká je ontogeneze aktivity růstových plotének a ontogeneze sekundární osifikace epifyz femuru u obou pohlaví gekona *Paroedura picta*, který je zástupce významné skupiny šupinatých plazů – gekonů. Přesněji mě zajímalo, jestli se samci a samice během života v aktivitě růstových

plotének a v sekundární osifikaci epifýz liší, jestli jsou tyto případné pozorované rozdíly způsobeny zvýšenými hladinami gonadálních androgenů či estrogenů během dospívání a jestli má tento druh ukončený růst (tj. zda dochází k uzavírání růstových plotének), jak nepřímo naznačují předchozí studie (Starostová a kol. 2010; 2013).

2. Pohlavní dimorfismus ve velikosti těla (SSD)

Rozdíly mezi samicemi a samci ve fenotypu, tedy tzv. pohlavní dimorfismus, lze nalézt téměř u všech živočichů včetně obratlovců. Pohlaví se zpravidla mezi sebou liší i přesto, že spolu sdílejí kompletní genom a mnohdy i společnou niku. Jedním z nejběžnějších sekundárních pohlavních znaků je velikost těla (Abouheif a Fairbairn 1997; Fairbairn 1997; Fairbairn 2013). Co se velikosti těla týká, nacházíme mezi živočichy druhy monomorfní, kde jsou obě pohlaví stejná, nebo druhy, kde jsou buď samci nebo samice tím větším pohlavím. U naprosté většiny živočichů je větším pohlavím samice. Důležitou výjimku tvoří některé linie obratlovců, například u savců a ptáků bývá větším pohlavím samec. Další významní představitelé obratlovců – šupinatí plazi se v míře a směru SSD (z anglického „*sexual size dimorphism*“) značně liší, a to i v rámci relativně úzkých taxonů, v jejich evoluci tedy docházelo k četným reverzím ve směru SSD (Fairbairn a kol. 2007; Cox a kol. 2009).

2.1. Vznik SSD u obratlovců

Vznikem SSD se zabývá mnoho hypotéz, které mají větší či menší obecnou platnost. SSD je totiž znak, který může ovlivňovat chování, rozmnožování, ekologii a vývoj jedinců daného druhu, a proto je často studován (Kupfer 2009). Za ultimátní vysvětlení vzniku SSD může být považováno rozdělení potravní niky samců a samic, aby se snížila kompetice o potravní zdroje. Větší samci mohou také mít výhodu v boji o teritorium či o samice, pro které mohou být i atraktivnější. Dalším vysvětlením může být rozdíl v reprodukčních strategiích obou pohlaví a s ním spojený selekční tlak na velikost samice, protože velikost těla samice často koreluje s množstvím či velikostí potomků (Tinkle a kol. 1970; Shine 1990; Kratochvíl a Kubička 2007).

Na proximální úrovni lze vznik SSD u obratlovců vysvětlit působením tří mechanismů, které se uplatňují během ontogeneze a které se mohou kombinovat (Badayev 2002). První mechanismus se týká rozdílu v maternální investici do obou pohlaví, kdy se mláďata jednoho pohlaví líhnou (či rodí) větší. To se děje např. u některých druhů ptáků, kde se líhnou samice větší (Olsent a Cockburn 2004; Torres a Drummond 1999; Magrath a kol. 2003). Většina

obratlovců je však v rámci raného vývoje monomorfní a SSD se u nich objeví až v pozdějším věku (Badyaev 2002). Druhý mechanismus vzniku SSD během ontogeneze je založen na rozdílném tempu růstu samců a samic v období dospívání (Badyaev 2002). U třetího typu mechanismu se uplatňuje rozdílný věk při dosažení dospělosti, což bývá spojováno s rozdílnou délkou doby růstu, než je dospělosti dosaženo – jedná se o tzv. pohlavní bimaturismus (Shine 1990; Stamps 1993; Badyaev 2002). Příkladem pohlavního bimaturismu je mandril rýholicí (*Mandrillus sphinx*), kdy samice dosáhnou dospělosti v šesti letech a samci v 10 letech (Setchell a kol. 2001). Proximátními příčinami vzniku SSD se také zabývají dva okruhy hypotéz, které úzce souvisí s tématem mé diplomové práce – jedná se o hypotézy alokace do reprodukce a hypotézy vlivu gonadálních hormonů.

2.1.1. SSD jako důsledek alokace do reprodukce

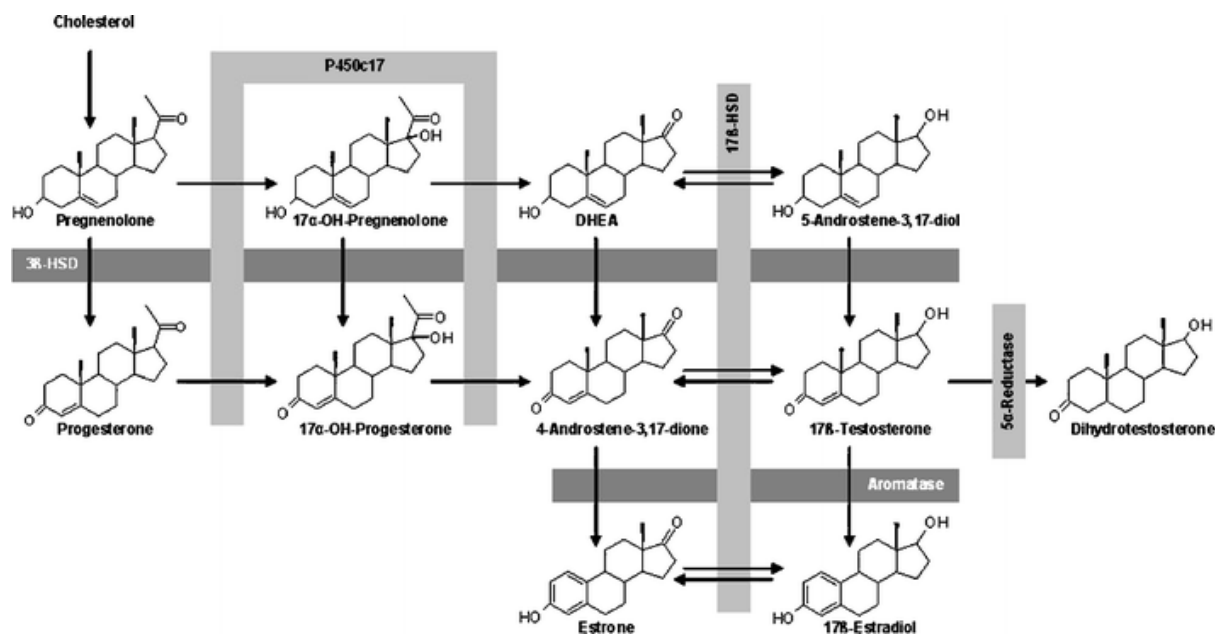
U plazů, jakožto obratlovců, kteří mají neukončený růst (tj. rostou ještě dlouho po dosažení pohlavní zralosti), se často předpokládá, že u druhů, kde jsou samice větší pohlaví, musí samci vynakládat více energie na obranu teritoria či na získání příležitosti k rozmnožení (např. Cox a John-Alder 2005). Na druhou stranu tam, kde jsou samci větší pohlaví, dorůstají samice menších rozměrů, protože upřednostňují rozmnožování (se kterým jsou spojené zvýšené energetické náklady) před růstem. Např. Frynta a kol. (2010) u varana *Varanus indicus*, který se v SSD značně liší (samci jsou až třikrát těžší než samice), zjistili, že se obě pohlaví líhnou monomorfní a SSD se projeví až později během ontogeneze, kdy samci pokračují v růstu, zatímco samice svůj růst zpomalují a začínají se rozmnožovat. Cox a kol. (2009) také zjistili, že ovariektomizované samice anolise *Anolis sagrei* dorůstají větších rozměrů než rozmnožující se samice a tento rozdíl ve velikosti vysvětlují tím, že do růstu samic bez vaječnicků byla alokována energie, která by jinak byla využita pro reprodukci.

Nicméně Starostová a kol. (2013) v pokusech s gekonem *P. picta* poukázali, že samotné vysoké energetické náklady samičí reprodukce SSD nevysvětlí. Samice rozdělili na rozmnožující se, ovariektomizované a nerozmnožující se v důsledku celoživotní izolace od samců. Rozmnožující se samice s extrémní reprodukční zátěží, u kterých se předpokládalo, že budou mít menší vzrůst kvůli investici do reprodukce, dorostly stejné délky těla (SVL z anglického „snout-vent length“) jako samice, které se byly v izolaci a nikdy se nerozmnožovaly. Jen ovariektomizované samice dosáhli většího SVL. Tento nárůst byl vysvětlen tak, že tyto samice neměly vaječníky, které by produkovaly ovariální hormony (např. estrogeny), které patrně brzdí růst.

Tyto závěry podpořila i novější studie. Kubička a kol. (2017) rozdělili samice *P. picta* na rozmnožující se, rozmnožující se s pouze jedním funkčním vaječником (tj. unilaterálně ovariektomizované) a ovariektomizované. Ovariektomizované samice dosáhly největší SVL, stejně jako kontrolní samci. Avšak u rozmnožujících se samic byl vzrůst menší. Při porovnání rozmnožujících se samic se dvěma a jedním vaječником však opět nebyl žádný rozdíl v SVL, přestože unilaterálně ovariektomizované samice kladly poloviční počet vajec oproti nemanipulovaným. Starostová a kol. (2013) a Kubička a kol. (2017) navrhuji, že investice do rozmnožování nemá vliv na následnou velikost samic. Předpokládají, že odstraněním obou vaječníků se odstraní i zdroj ovarálních hormonů včetně estradiolu, který působí na růst.

2.1.2. SSD jako důsledek působení gonadálních hormonů

Další hypotézy, zabývající se proximálními mechanismy SSD u obratlovců, předpokládají, že rozdíly v růstu samců a samic jsou do značné míry řízeny příslušnými hladinami gonadálních steroidů, kterými se obě pohlaví liší. Steroidní hormony vznikají z cholesterolu především v gonádách a v mozku procesem steroidogeneze (Norris 2007). Mezi nejvýznamnější pohlavní hormony patří androgeny (testosteron a dihydrotestosteron), estrogeny (estradiol, estron a estriol) a progesteron. Obecně během steroidogeneze, která vede k pohlavním steroidům, vzniká z cholesterolu progesteron, který se mění na testosteron. Testosteron dále slouží buď jako prekurzor pro androgen dihydrotestosteron za účasti enzymu reduktázy nebo pro estrogen estradiol za účasti enzymu aromatázy (Norris 2007; obr.1).



Obr. 1 Stručný přehled syntézy pohlavních steroidních hormonů (převzato z Rijk a kol. 2008).

Působení gonadálních hormonů na růst je z dostupných studií zřejmý, ale není zcela vysvětlené, které (zda androgeny, estrogyeny, či jiné gonadální hormony) mohou za SSD u obratlovců. Pro šupinaté plazy byla navržena hypotéza, která předpokládá, že SSD je řízen testikulárními androgeny, které působí dvojným způsobem. U druhů s většími samicemi působí androgeny na růst samců inhibičně, zatímco u druhu s většími samci působí stimulačně. Předpokládané působení androgenů na růst samců je buď přímé nebo nepřímé působením na sekreci dalších hormonů (např. růstový hormon) či vyvoláním změny v chování či fyziologii, která pak ovlivní růst (Cox a kol. 2005; Cox a John-Alder 2005; Cox 2006; Cox a kol. 2009). Cox a kol. (2009) u anolise *A. sagrei*, u kterého jsou samci větší než samice, pozorovali zpomalení růstu samců po kastraci oproti kastrátům s uměle dodávaným testosteronem. Výsledky porovnali s podobnými manipulativními pokusy u dalších zástupců šupinatých plazů a došli k závěru, že dvojí působení testosteronu je společné pro všechny testované druhy.

Nicméně z pokusů na druhu *P. picta* s většími samci naopak vyplývá, že SSD by mohl vzniknout působením ovariálních hormonů (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2015; 2017). Autoři to testovali pomocí manipulace hladinami gonadálních hormonů, kdy jedince gonadektomizovali a pak jim případně podávali externí hormony (testosteron, dihydrotestosteron a estradiol). Zjistili, že když odstranili samicím oba vaječníky, nezáviselo už na tom, jestli byly nebo nebyly těmto samicím dále podávány androgeny (testosteron a dihydrotestosteron) – vždy dorostly do podobné SVL jako kontrolní samci. Když však byl ovariektomizovaným samicím podáván estradiol, jejich růst se výrazně zbrzdil. Dále, pokud byl samicím odstraněn pouze jeden vaječník, SVL se podobala běžně se rozmnožujícím samicím, což autoři přikládají tomu, že u obou skupin samic byly zachovány normální ovariální (a tím pádem i hormonální) cykly. Neovariektomizovaným samicím, kterým byl podáván testosteron, se zmenšily vaječníky, tím se patrně ovlivnila i normální produkce ovariálních hormonů a samice dosahovaly spíše samčího vzrůstu. Na druhou stranu ani kastrace ani následná testosteronová kúra neměly na růst samců žádný vliv. Manipulované samčí skupiny vždy dorostly stejných rozměrů, jako kontrolní samci.

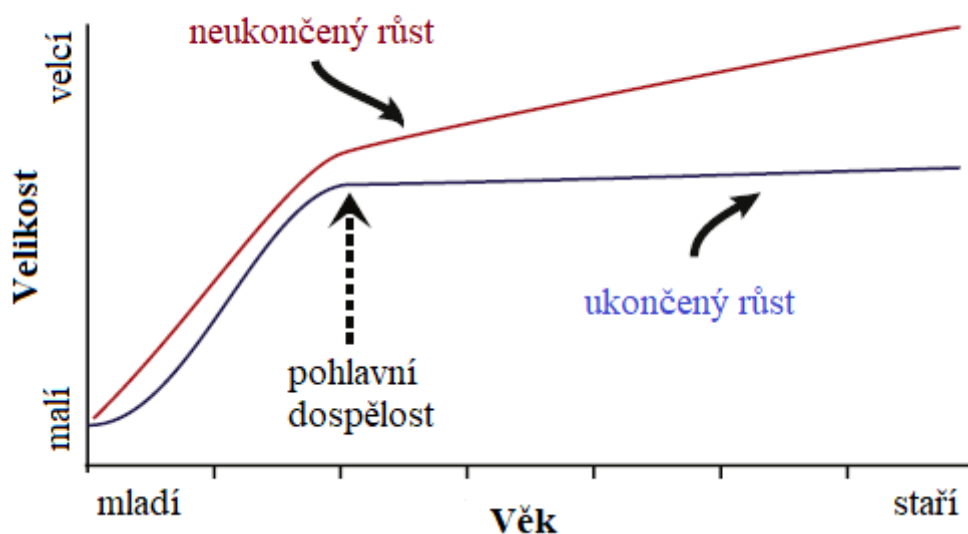
Kubička a kol. (2013) na druhu *Aeuroscalabotes felinus* s většími samicemi dělali obdobné pokusy s manipulací s hladinami hormonů pomocí samčí kastrace a podáváním testosteronu. Zjistili, že kastrace neovlivní konečnou SVL samců. Neovariektomizované samice, kterým byl podáván testosteron, však dosahovaly spíše samčího vzrůstu, což je podle autorů způsobeno tím, že testosteron negativně působí na normální fungování vaječnicků včetně produkce ovariálních hormonů, které působí i na růst.

Recentní práce na anolisech (Sanger a kol. 2014) ukazuje na důležitost estrogenů v řízení ontogeneze velikostně dimorfního znaku u těchto ještěřů. Sanger a kol. (2014) totiž prokázali, že estrogenní dráha se významně podílí na vzniku dimorfismu ve velikosti hlavy anolisů, a to ovlivněním rychlosti růstu chrupavek v dimorfních částech lebky, které pak později osifikují.

Rozpor mezi závěry prací, zabývajících se hormonální kontrolou SSD, patrně odráží různé metodologické přístupy. Cox a kol. (2009) ve své práci měřili růst během několika týdnů po hormonální manipulaci, testovali tak vliv manipulace či hormonů na okamžitou rychlost růstu vyjádřenou denním přírůstkem pokusných jedinců. Navíc, pokud je v jejich experimentu srovnáván přírůstek kontrolních samců a samčích kastrátů, tak se obě skupiny neliší. V experimentech na druhu *P.picta* (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2015; 2017) sledovali vliv hormonální manipulace na konečnou SVL, tj. SVL, při které zvířata silně zpomalují či dokonce zastavují růst, a která se ve své konečné fázi takřka neliší od asymptotické hodnoty SVL odhadnuté z individuálních růstových křivek pomocí růstových modelů. U poměrně dlouhověkých zvířat jako jsou gekoni, ale i mnozí další ještěři, kteří rostou ještě dlouho po zahájení reprodukce, je právě tato konečná, případně asymptotická, SVL dobrým vyjádřením velikosti pro srovnávací analýzy SSD (Kratochvíl a Frynta 2002; Starostová a kol. 2010, 2013; Kubička a kol. 2013; 2015; 2017).

3. Růst obratlovců

Při procesu růstu dochází k nárůstu velikosti a hmotnosti těla. Růst lze u obratlovců rozdělit na ukončený a neukončený, přičemž rozdíl je v tom, zda jedinci rostou (neukončený) nebo naopak nerostou (ukončený) i po dosažení pohlavní zralosti (rozmnožení; Charnov a kol. 2001). Obecně se udává, že ukončený růst mají savci a ptáci (endotermové) a neukončený růst mají plazi, obojživelníci a ryby (ektotermové).



Obr. 2 Srovnání průběhu růstových křivek u obratlovců s ukončeným a neukončeným růstem (upraveno Vitt a Caldwell 2014).

U endotermů rozmnožování zpravidla nastává až po dosažení konečné velikosti těla (Ricklefs 1968). Některé druhy savců mohou tvořit výjimky. Pohlavní dospělost u nich nastává dříve, než dosáhnou konečné hmotnosti. Hlodavci dospějí již při 13% konečné hmotnosti (Twigg 1965), paviáni při 55% (Shohoji a Sasaki 1987) a rypouši při 30% (Bryden 1968). Vačnatci vykazují tendenci růst po celý život, přičemž mají po celé období růstu zachovanou růstovou ploténku (Geiger a kol. 2014). U plazů, kde se předpokládá neukončený růst, se jedinci rozmnožují dříve, než dosáhnou plné velikosti těla, blíží se jejich asymptotě (Schwarzkopf 1993; Cox 2006; Starostová a kol. 2010; Frýdlová a kol. 2017). Pohlavní zralost obvykle nastává po dosažení 70% maximální velikosti těla, následné přírůstky však bývají menší (Shine a Charnov 1992). Růst je u nich umožněn růstovými ploténkami, které jsou aktivní i po dosažení pohlavní zralosti (Frýdlová a kol. 2017). Mezi plazy ale existují výjimky, u kterých byl ukončený růst různými metodami prokázán. Ukončený růst se potvrdil např. u zástupců šupinatých plazů – varanů. De Buffrénil a kol. (2005) u této skupiny použili rentgenové snímkování pro zjištění přítomnosti růstové ploténky. Dále v této práci použili histologické řezy distální části femuru pro stanovení přítomnosti růstové ploténky. Těmito metodami zjistili, že došlo k vymizení růstové ploténky a kost plně osifikovala. Frýdlová a kol. (2017) využili u stejné modelové skupiny plazů pro zjištění přítomnosti růstové plotének dlouhých kostí metodou microCT (výpočetní tomografie; z anglického „*Computed Tomography*“) Zjistili vymizení růstové ploténky u většiny menších druhů varanů a její přítomnost u velkých druhů stejného stáří. Nicméně u extrémně starého jedince většího druhu varana (*Varanus indicus*) se

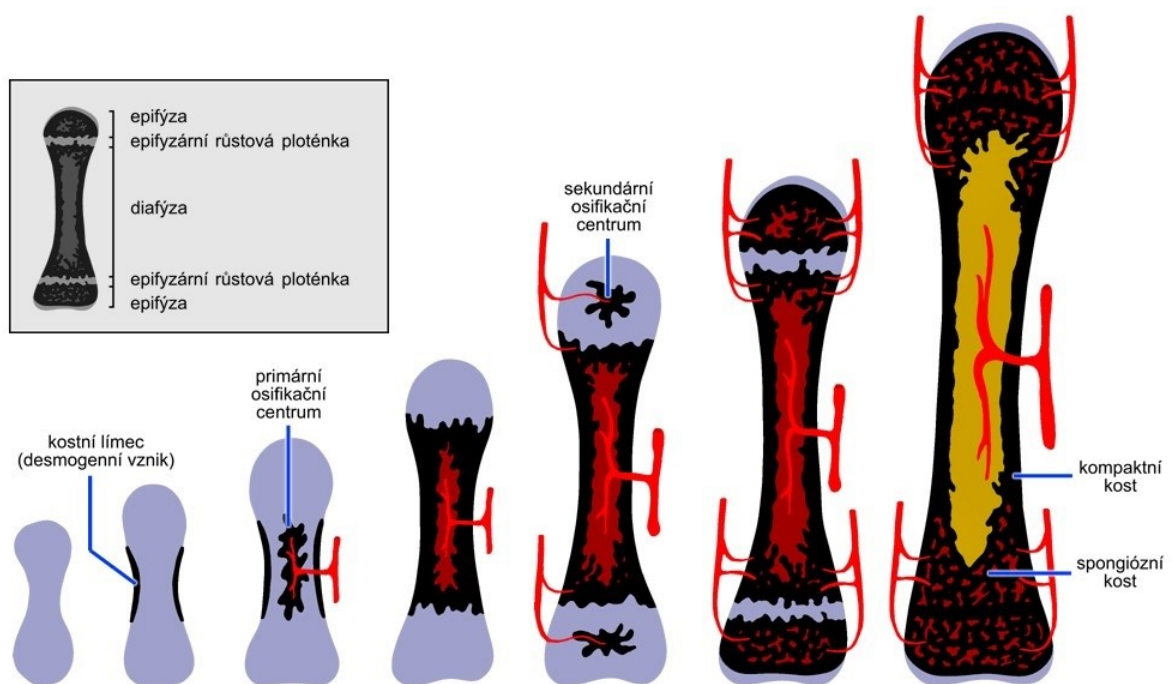
našla kost bez růstové ploténky. Naznačuje to, že velké druhy varanů si zachovávají růst déle než malé druhy. Castanet a kol. (1988) zase pro sledování růstu hatérií (*Sphenodon punctatus*) využili metodu „*skeletal cyclic growth marks*“, kde se sledují roční přírůstky na kostních výbrusech. Zjistili, že *S. punctatus* má ukončený růst, který se zastaví během 30. roku života. Další práce pomocí kostních výbrusů potvrdily ukončený růst u aligátora *Alligator mississippiensis* (Klein a kol. 2009; Woodward a kol. 2011) a u některých dinosaurů (Ricqles a kol. 2003; Myhrvold 2013).

3.1. Osifikace a růst dlouhých kostí

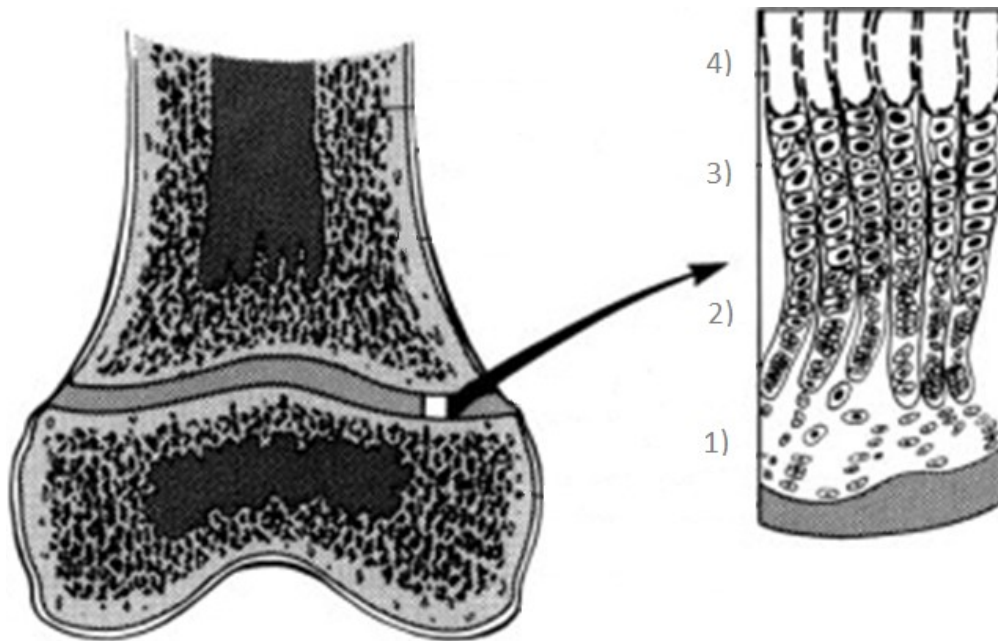
Dlouhé kosti, které se nachází hlavně v končetinách, mají typicky protáhlý tvar, prostředek se nazývá diafýza a na koncích se nacházejí epifýzy. Vznikají osifikací chrupavky, která tvarově odpovídá budoucí kosti (tzv. chondrogenní osifikace). Osifikace začíná obvykle perichondrální osifikací (tj. osifikací na povrchu chrupavky) ve střední oblasti dlouhé kosti, vzniká tak postupně primární osifikační centrum. Perichondrální osifikace probíhá především v embryonálním období činností osteoblastů. Následně středem budoucího centra enchondrální (tj. vnitřní) osifikace prostupují kapiláry a kost začíná postupně kalcifikovat i uvnitř (Obr. 3; White a Wallis 2001; Zoetis a kol. 2003). Sekundární osifikace probíhá v centru diafýzy, která se postupně šíří až zaujme celý její objem. Konce dlouhých kostí osifikují z oddělených osifikačních jader, které se tvoří pouze enchondrální osifikací (Obr. 3; Čihák 2001; White a Wallis 2001; Zoetis a kol. 2003).

Dlouhé kosti rostou především do délky, ale proporčně i do šířky (Bartoníček a Heřt 2004). Růst do šířky je způsoben přirůstáním apozice z hlubokých vrstev okostice a endostu (White a Wallis 2001). K zachování tvaru rostoucí kosti je proces apozice doplněn o proces odbourávání kosti (Gardner 1963). Pro umožnění růstu kosti do délky se už během osifikace v metafýzách (tj. v prostoru mezi diafýzou a epifýzami) formují neosifikované úseky, tzv. růstové ploténky (Obr. 3; White a Wallis 2001; Zoetis a kol. 2003). Růstovou ploténku lze rozdělit na několik zón (Obr. 4). První zóna je klidová (tzv. rezervní), obsahuje chondrocyty, které tvoří neostrou hranici mezi epifýzou a následující vrstvou. Druhou, tzv. proliferační zónu tvoří rychle se dělicí chondrocyty uspořádané do sloupců. Nově vzniklé buňky postupně dozrávají a tvoří hypertrofní zónu. V hypertrofní zóně již nedochází k jejich dělení, ale chondrocyty zde resorbují okolní hmotu a zvětšuje se tak prostor mezi nimi. Hypertrofní zóna postupně kalcifikuje a stává se z ní zóna primární spongiózy, která je tvořena vaskularizovanou kalcifikovanou chrupavkou a postupně prorůstá krevními vlásečnicemi (Schenk a Hunziker

1991; Mackie a kol. 2008). U obratlovců s ukončeným růstem dochází v určitém věku k senescenci růstové ploténky, kdy se postupně zastaví proliferační aktivita chondrocytů, dochází k uzavření růstové ploténky a zastavuje se růst kosti do délky (White a Wallis 2001). Toho se využívá např. i pro určení kostního věku (Fukuda a Matsuoka 1979). U femuru, typické (a často největší) dlouhé kosti, se proliferační aktivita obou růstových plotének liší, přičemž aktivnější ploténka je obvykle ta na širší ploše průřezu. Podíl na růstu kosti do délky je kolem 30% u proximální části (tj. u kyčle) a 70% u distální části femuru (tj. u kolene). U méně aktivní ploténky se proliferační aktivita vyčerpá dříve a ploténka také dříve zaniká, čímž se zastaví růst kosti do délky (Šmahela 2001; Serrat a kol. 2007).



Obr. 3 Průběh osifikace dlouhé kosti (upraveno Čihák 2001).



Obr. 4 Růstová ploténka 1) klidová zóna; 2) proliferační zóna; 3) zóna hypertrofické chrupavky; 4) primární zóna spongiózy (upraveno Perron a kol. 2002).

3.1.1. Vliv gonadálních hormonů na proliferační aktivitu růstové ploténky

Pokud jsou rozdíly v růstu mezi pohlavími způsobeny gonadálními hormony, měl by se jejich vliv projevit právě přímo na aktivitě proliferační zóny růstových plotének, která je pro růst kosti do délky zásadní. Studie, které se touto problematikou zabývají, připisují největší význam ovariálnímu steroidu estradiolu. V pokusu Nilsson a kol. (2014) se ovariektomizovaným samicím králíka podával estradiol a sledovalo se, jak postupně působí na růstovou ploténku. Zjistili, že estrogény působí nevratně na růstovou funkci růstové ploténky, především zmenšují buňky v klidové zóně a redukují dělení v proliferační zóně. Dalším zjištěním bylo, že estrogény urychlují stárnutí a vyčerpání růstové ploténky (Nilsson a kol. 2014; Weise a kol. 2001). Weise a kol. (2001) při pokusech s ovariektomizovanými samicemi králíků zjistili, že externí podání estradiolu stimuluje u těchto samic proliferační kapacitu chondrocytů, která se tak rychleji vyčerpá, což způsobí rychlejší uzavření růstových plotének, než je tomu u kontrolní skupiny. K uzavírání plotének však nedochází pozvolna, ale tento proces je náhlý, jakmile se tato proliferační kapacita vyčerpá. U lidí se také potvrdil vliv estrogenů na růst. Nízké hladiny estrogenu stimulují růst dívek i chlapců. Avšak u předpubertálních dívek dochází vlivem zvýšených hladin estrogenů, souvisejících s dozráváním pohlavních orgánů, k dřívějšímu epifyzálnímu zrání souvisejícím s dřívějším ukončením růstu ve srovnání s chlapci (Cutler 1997). Estrogény mohou působit prostřednictvím estrogenových receptorů na povrchu chrupavky (Chagin a kol. 2003). Sanger a kol. (2014) zjistili u anolise rudokrkého (*Anolis*

carolinensis), kde má samec větší velikost i odlišný tvar lebky než samice, že kontrola kosterního růstu hlavy je ovlivněna především různou expresí estrogenového receptoru $E\alpha$ u obou pohlaví. Samice měly expresi tohoto receptoru ve větší míře a tím se inhiboval růst lebky. Možný vliv gonadálních hormonů na SSD se tak může uplatnit díky pohlavně specifické expresi estrogenových receptorů na povrchu růstových plotének, přičemž exprese receptorů často koreluje s hladinami hormonů (Mcguire 1978).

4. Pohlavně dimorfní růst kostí gekona *Paroedura picta*

Jako modelový druh byl pro mé studium pohlavně dimorfního růstu kostí zvolen madagaskarský gekon *Paroedura picta* (Peters 1854). U tohoto gekona, kde jsou samci větší než samice, bylo zjištěno že:

- 1) růst a konečná SVL samců není řízena gonadálními androgeny, protože odstranění jejich zdroje kastrací nemá žádný vliv (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2015)
- 2) konečná SVL samic není ovlivněna jejich investicí do reprodukce, která může být značná (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2017)
- 3) ovariectomie samic má vliv na jejich konečnou SVL (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2017)

Autoři předchozích studií došli k názoru, že konečná délka těla je u tohoto gekona velmi pravděpodobně ovlivněna u samic ovariálními hormony (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2017), důkazy však byly nepřímé, případně umělé zvýšení hladin estradiolu u ovariectomizovaných samic mělo nepříznivé důsledky nejen na růst, ale asi i na kondici samic. Proto bylo důležité provést experiment se sledováním přirozených hladin steroidů během ontogeneze.

Díky těmto informacím je *P. picta* vhodná i pro tento experiment, který má za cíl zjistit:

- 1) jaká je ontogeneze aktivity růstových plotének a ontogeneze sekundární osifikace epifýz femuru u obou pohlaví
- 2) zda se liší aktivita růstových plotének mezi pohlavími

- 3) jestli jsou tyto případné pozorované rozdíly korelovány se zvýšenými hladinami gonadálních androgenů či estrogenů během dospívání
- 4) jestli má tento druh ukončený růst (tj. zda dochází k uzavírání růstových plotének)

5. Materiál a metodika

Vlastní experiment lze rozdělit na několik částí: 1) zajištění dostatečného počtu pokusných jedinců patřícího věku a pohlaví; 2) získání informací o stavu jejich reprodukčních orgánů a příprava krevních vzorků pro stanovení hladin gonadálních steroidů estradiolu a testosteronu; 3) zpracování obarvených dlouhých kostí pro pozorování nástupu osifikace epifýz u mladých jedinců a příprava dlouhých kostí k vyhotovení histologických preparátů pro sledování dlouhodobé aktivity růstové ploténky během života pokusných jedinců; a 4) zpracování dat a vyhodnocení výsledků. Projekt byl schválen etickou komisí PřF UK a příslušnými odbory na ministerstvech zemědělství a školství (č. 35484/2015-11).

5.1. Experimentální zvířata

5.1.1. Gekon madagaskarský (*Paroedura picta*)

Pro růstový experiment jsem použil gekona *Paroedura picta*, který patří do čeledi Gekkonidae. Jedná se o početně významnou čeleď gekonů a šupinatých plazů vůbec, která zahrnuje více než 1100 druhů (Uetz a kol. 2014). Gekon madagaskarský se přirozeně vyskytuje na Komorských ostrovech a na Madagaskaru v suchých lesích a savanách (Dixon a Kroll 1974; Schönecker 2008) a má noční aktivitu (Röll 2000). *P. picta* může dosáhnout váhy přes 30 g a měřit až 17 cm celkové délky těla, kde se jednotlivá pohlaví liší ve velikosti těla. Samci jsou robustnější a dosahují větších rozměrů než samice (Starostová a kol. 2010). Mají také nápadný pářicí orgán hemipenis, který je hlavním externím znakem pro určení pohlaví jedinců. Pohlavní zralosti dosahuje poměrně brzy – obvykle ve věku okolo čtyř měsíců jsou samice schopné se již rozmnožovat a je u nich možné nahmatat zvětšené folikuly v břišní dutině; samci mají zvětšené hemipenisy ještě dříve (cca okolo třetího měsíce věku) a jsou také dříve schopni kopulace (L. Kubička, vlastní pozorování). Všichni gekoni mají tzv. invariantní snůšku, kdy samice kladou malý a stálý počet vajec v rámci jedné snůšky (Kratochvíl a Kubička 2007). Typická snůška samice *P. picta* má proto dvě vejce, mezi snůškový interval je však velmi krátký – obvykle okolo 7 až 14 dní (Kubička a Kratochvíl 2009; Kubička a kol. 2012). Po prvotní fázi růstu, která

je u tohoto druhu velmi rychlá, nastává přibližně ve věku 12 měsíců výrazné zpomalení, jehož nástup ale závisí na teplotě prostředí (Starostová a kol. 2010; Kubička a kol. 2015, 2017).

Chov těchto zvířat v laboratorních podmínkách je dobře zvládnutelný. Proto byl hojně využíván jako modelový druh v naší pracovní skupině (Kubička a Kratochvíl 2009; Starostová a kol. 2010; 2012; 2013; Kubička a kol. 2012; 2015; 2017). Na základě jeho růstových vlastností a snadné chovatelnosti byl tento druh vybrán i pro tuto studii.

5.1.2. Chov experimentálních zvířat

Do experimentu bylo celkem použito 257 jedinců, kteří byli F1 a F2 generací volně odchycených *P. picta*. Pro získání pokusných zvířat jsem kontroloval zapárené samice rodičovské populace, které byly drženy v teráriích o rozměrech 15 x 15 x 45 cm, se směsí lignocelu a písku jako substrátem. K dispozici měly také úkryt a misku na vodu a na vápník. Chov byl v místnosti temperované na 27 °C s dvanáctihodinovým světelným režimem. Krmeny byly 2krát týdně cvrčky (*Gryllus assimilis*) obalenými v Roboranu H (UNIVIT, Česká Republika) v takovém množství, aby byl zajištěn dostatečný přísun energie pro zdárnou reprodukci (obvykle se jednalo o 10 až 12 cvrčků o velikosti nepřesahující délku hlavy samice). Voda s rozpuštěným vápníkem byla podávána dvakrát týdně a jednou za 14 dní byl vápník nahrazen vitamíny A, D3 a E (Combinál E and Combinál A + D3; IVAX Pharmaceuticals, Opava, Česká Republika). Obdobně byli chováni také samci, kteří však byli krmeni méně. K samici byl vždy přiřazen jeden samec, se kterým se každý se měsíc pářila (každých 14 dní až do prvního kladení vajec). Samice tohoto druhu jsou totiž schopné uchovat si viabilní spermie ve svém reprodukčním traktu a využít je i k oplodnění následujících snůšek (Kubička a Kratochvíl 2009; Starostová a kol. 2010; 2013). Samice rodičovské populace (dohromady 20 párů) kladly dvě vejce zhruba každých 14 dní. Při každém krmení byla samicím prohledána ubikace a nalezená vejce byla popsána datem nálezů a uložena do inkubátoru o teplotě 30 °C, při které trvá inkubace přibližně 60 dní (Starostová a kol. 2012). Tato teplota zajišťuje nízkou mortalitu, rychlou inkubaci a také relativně rychlý postembryonální růst (Starostová a kol. 2010; 2012).

Po vylíhnutí byli pokusní jedinci umístěni individuálně v plastových boxech o rozměrech 20 x 20 x 10 cm, u kterých byl znemožněn výhled na ostatní jedince pomocí průsvitné lepící pásky, aby byl co nejvíce omezen stres z přímého vizuálního kontaktu. Plastový box byl standardně vybaven substrátem (směs písku a lignocelu), plastovým úkrytem a miskou

na vodu (obr. 5). Během každého krmení byla, podobně jako u rodičovské populace, doplněna pokusným jedincům čerstvá voda obohacená vápníkem a jednou za čtrnáct dní byl vápník nahrazen vitamínovou směsí A, D3 a E. Krmení probíhalo dvakrát týdně cvrčky obalenými v Roboranu H v přiměřeném množství (tj. v mírném přebytku) a velikosti odpovídající rozměrům gekona (tj. výrazně nepřesahující délku hlavy jedince) tak, aby se vždy nažral do sytosti. Nezkonzumovaní cvrčci byli před následujícím krmením odebráni. Při krmení byla pravidelně ubikace čištěna od trusu a zbytků potravy, dle potřeby byl vyměněn i substrát. Pro zajištění rychlého růstu byli jedinci umístěni v klimaboxech s kontrolovanou teplotou 30 °C, s 12 hodinovým režimem dne a noci a optimální cca. 70 % vlhkostí zajišťovanou nádobami s vodou. Časový rozsah experimentu byl nastaven tak, aby u nejstarších jedinců trval od vylíhnutí po dosažení takové velikosti těla, která se v předchozím experimentu ve stejné teplotě blížila asymptotické velikosti odhadnuté růstovým modelem, což trvalo přibližně rok (Starostová a kol. 2010). V rámci toho experimentu však bylo počítáno s jistou rezervou, a proto byl průměrný věk nejstarší skupiny cca 22 měsíců. Po dosažení váhy 7 g (což přibližně odpovídá čtyřem měsícům věku) byli jedinci v rámci skupiny pářeni, aby byly zajištěny co nejpřirozenější hormonální cykly a fyziologické pochody samců a samic (Starostová a kol. 2010). Samici byl pro tyto účely přiřazen nepříbuzný experimentální samec, se kterým se pářila jednou měsíčně (opět každých 14 dní než samice snesla první vejce). Před každým krmením byla ubikace rozmnožujících se samic prohledána, nalezená vejce byla zvážena a zaznamenána. Gekoni *P. picta* kladou vejce s vápenatou skořápkou, proto rozmnožující se samice měly v ubikaci k dispozici i misku s mletým vápencem pro doplnění minerálů. Pro potřeby růstového experimentu byli všichni pokusní jedinci každých cca 45 dnů změřeni (jako standardní rozměr byla použita délka těla od špičky rostra ke kloace – tzv. SVL) a zváženi (s přesností na 0,001 g).



Obr. 5 Gekon madagaskarský (*P. picta*) ve své ubikaci.

5.2. Postup experimentu

Pro experiment bylo potřeba 14 odběrových skupin různého stáří od čerstvě vylíhlých mláďat až po takovou dosaženou SVL, která se blížila asymptotické SVL, kdy nastává výrazné zpomalení až úplné zastavení růstu. Jedinci byli pro růstovou analýzu usmrceni přibližně po každých 42 dnech, nejstarší skupině bylo průměrně 620 dnů. Pro usmrcení zvířat byla zvolena rychlá dekapitace, která umožňuje získat většinu krve jedince pro následné stanovení hladin hormonů – vzhledem k testovaným hypotézám byly stanovovány hladiny estradiolu a testosteronu. Různé části experimentu vyžadovaly využití různého počtu zvířat – to platí hlavně pro získání dostatečného množství krve pro hormonální analýzy. U vybraných jedinců byl vypreparován femur, dále byla odebrána a zvážena (s přesností na 0,001 g) varlata, vaječníky a vejcovody. Gonády nemohly být zváženy pouze u nejmladších jedinců, kdy hmotnost nedosahovala detekčního limitu používané váhy. Pohlaví u jedinců, kteří ještě nevykazovali vnější dimorfní znaky, bylo zjištěno právě na základě tvaru gonády pomocí binolupy (Kubička a kol. 2006). Po odebrání a zvážení vzorků byli jedinci zmrazeni pro další použití.

5.2.1. Odběry krve a měření hladin steroidních hormonů

Krev byla odebrána všem jedincům ve skupině vždy v rámci jednoho odběru po usmrcení dekapitací. Krev byla nabírána z hlavy a trupu pomocí heparinizovaných skleněných kapilár, které zabraňují srážení krve. Z kapilár byla krev sbírána do 1,5 ml eppendorfek a až do centrifugace byla umístěna maximálně šest hodin v ledové tříšti, než byla zpracována celá skupina zvířat. Pro oddělení krvinek od plasmy byla použita centrifuga chlazená na 4 °C. Cyklus byl nastaven na 15 minut a 1500 otáček. Oddělená plasma byla odsáta a uchována při teplotě -25 °C až do stanovování hladin hormonů, k čemuž došlo po nashromáždění všech vzorků. Hladiny estradiolu a testosteronu byly následně stanoveny komerčně v Endokrinologickém ústavu, Praha. Zejména u mláďat však nebylo dostatečné množství krevní plasmy pro obě analýzy, proto bylo nutné v některých případech plasmu v rámci odběrových skupin smíchat od více jedinců stejného pohlaví (Tabulka 1). Bylo však vždy smícháno stejné množství plasmy od každého jedince, aby některý vzorek objemově nepřevažoval. Objem jednotlivých zastoupených vzorků byl odvozen od toho nejmenšího. Pokud byly vzorky sloučeny, bylo také vždy zaznamenáno, o jaká zvířata se jedná. Pro následná srovnání vlivu gonadálních steroidů na růst a enchondrální osifikaci dlouhých kostí byly všem jedincům se smíchanou plasmou přiřazeny hladiny steroidů stanovené pro celou smíchanou skupinu.

Tabulka 1 Zastoupení jedinců se smíchanou krevní plasmou v odběrových skupinách řazených vzestupně dle věku.

Skupina	Počet jedinců (samci + samice)	Počet jedinců se smíchanou krví (samci + samice)
1	31+36	31+36
2	17+24	17+24
3	7+10	7+9
4	5+5	5+4
5	6+6	4+4
6	6+6	2+5
7	8+6	0+4
8	6+6	2+4
9	6+6	4+4
10	6+6	4+2
11	6+6	0+2
12	6+6	0+0
13	6+6	2+2
14	4+4	0+0

Analýza hladin testosteronu byla provedena metodou radioimunologické analýzy (RIA). Pro tyto vzorky byla aplikována následující metodika: 20 µl plasmy bylo smícháno s 80 µl fyziologického roztoku a 1 ml diethyletheru. Vodní fáze pak byla zmrazena v suchém ledu a zbylá etherová fáze převedena do zkumavky a následně odpařena ve vodní lázni při 37 °C. Takto získaný extrakt byl smíchán se 100 µl antiséra pro testosteron a radioaktivně značeným testosteronem. Směs byla pak inkubována přes noc při teplotě 2 až 4 °C. Následující den bylo přidáno 500 µl suspenze aktivního uhlí a směs byla inkubována 10 minut při 5 °C a poté odstředována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. V supernatantu (bez volných antigenů) byla následně změřena radioaktivita, přičemž vyšší naměřená radioaktivita značila nižší podíl neznačeného testosteronu ve vzorku. Množství obsaženého testosteronu bylo vypočítáno pomocí kalibrační křivky, sestavené v měřitelném rozsahu od 0,01 do 100 ng/ml. Pro stanovení hladin estradiolu byl použit komerční kit ESTR-US-CT (Cisbio Bioassays, Codolet, Francie), který má velmi nízkou spodní hladinu detekce (0,001 ng/ml plasmy). V prvním fázi byl vzorek inkubován s polyklonálními protilátkami s volnými vazebnými místy pro estradiol. Následně byl inkubován ve vodní lázni po dobu jedné hodiny při teplotě 37°C. Po inkubaci byla část

estradiolu navázána na dno zkumavky. Ve druhém kroku se do zkumavky přimíchalo 100 μ l radioaktivně značeného estradiolu. Dále byl vzorek inkubován po dobu jedné hodiny při 37°C. Po inkubaci byl odstraněn nadbytečný radioaktivní estradiol. Následně byla změřena radioaktivita, přičemž vyšší naměřená radioaktivita značila nižší podíl neznačeného estradiolu ve vzorku.

5.2.2. Barvení femuru pro zjištění enchondrální osifikace a jeho vyhodnocení

Pokusní jedinci z dřívějšího odběru vzorků (krev a gonády) byli pro odběr femuru rozmrazeni při pokojové teplotě. Pro dokumentaci průběhu enchondrální osifikace jsem se soustředil na jedince o stáří od vylíhnutí do 122 dnů (tj. do čtvrté skupiny po vylíhnutí), kdy by podle mých předběžných testovacích barvení měla osifikace již proběhnout. Pro pokus bylo použito 22 jedinců, z toho 12 samic a 10 samců.

Při preparaci femuru se prvně odstraní kůže a následně větší podíl masité části. V práci jsem použil tradiční postup pro barvení kalcifikovaných částí, pomocí Alizarin Red a Alcian Blue pro chrupavčité tkáně. Z obarvených preparátů pak bylo možné zjistit, kdy a v jaké míře nastává enchondrální osifikace distální epifýzy femuru. Protokol pro přípravu vzorků byl poupraven podle následujícího schématu Taylor a Van Dyke (1985):

1. Po vypreparování nastává dehydratace vzorků jejich přenesením do ethanolu 96% po dobu 5 dní.
2. Barvení v roztoku alciánové modři 1-3 dny (v závislosti na velikosti konkrétního jedince).
 - Barvicí roztok alciánové modři:
 - 15 mg Alcian Blue 8 GX (Sigma)
 - 80 ml 96% ethanolu
 - 20 ml 100% kyseliny octové (Sigma)
3. Vyprání vzorků v ethanolu 96 % po dobu 1 až 2 dnů.
4. Macerace vzorků v 0,5 % vodném roztoku KOH po dobu několika (3-5) dnů.
5. Barvení v barvicím roztoku alizarinové červeně (16-28 hodin):
 - 1 ml zásobního roztoku alizarinové červeně
 - 8 ml 1% KOH
 - Zásobní roztok 0,004% alizarinové červeně:
 - 0.0157806 g práškového Alizarin Red S (Sigma)

- 500 ml 96% etanolu
6. Prání objektu v 0,5% vodném roztoku KOH.
 7. Převedení vzorků vzestupnou řadou (25, 50 a 75%) roztoku glycerolu v 0,5% vodném roztoku KOH, v každém roztoku jsem je ponechal na 24 hod.
 8. Pro uchování vzorku se převedou do 100% glycerínu a pro kvalitnější zachování vzorku se může do každého přidat malé krystalky fenolu a skladovat při 4 °C. Délka trvání každého kroku a koncentraci použitých roztoků jsem musel přizpůsobit velikosti jedince. Aby nedošlo k odvápnění či úplnému rozpuštění vzorků.

Chrupavčité části barvené pomocí Alcian Blue i kostěné tkáně vizualizované pomocí Alizarin Red byly nasnímány pod binokulární stereo-lupou Olympus SZX12. Výsledný obraz byl složen z několika vrstev pomocí softwaru QuickPhoto Micro. Výsledné fotografie jsem zpracoval pomocí analýzy obrazu ImageJ (Schneider a kol. 2012) pro zjištění nástupu osifikace epifyz u mladých jedinců. Měřila se relativní velikost plochy chrupavky vztažená na šířku kosti. Nejprve se změřila šířka kosti pod růstovou zónou. Tato velikost se definovala jako konkrétní hodnota 10, která byla pro všechny jedince stejná a sloužila tak jako relativní měřítko. Po nastavení měřítka se následně změřila plocha chrupavky. Výsledné hodnoty pak byly pro porovnání s ostatními zjištěnými údaji.

5.2.3. Příprava histologických řezů pro zjištění aktivity růstové ploténky femuru a jejich vyhodnocení

Pro výzkum změny v dlouhodobé aktivitě růstové ploténky dlouhých kostí během života pokusných jedinců jsme navázali úspěšnou spolupráci s Ústavem histologie a embryologie 1.LF UK, kde nám histologické řezy růstové ploténky zpracovali. K pokusu bylo vybráno 95 jedinců od vylíhnutí do věku 620 dnů, tak aby v každé kohortě byli zastoupeni tři až čtyři zástupci obou pohlaví se známými či odhadnutými hladinami estradiolu a testosteronu.

Pro přípravu histologických preparátů jsem, obdobně jako při přípravě vzorků pro barvení, vypreparoval femur a v tomto případě jej uložil ho do 4 % roztoku formaldehydu pro fixaci. V Ústavu histologie a embryologie byly takto fixované femury nejpozději do dvou měsíců dále zpracovány. Po fixaci byly vzorky propláchnuty ve vodě a přeneseny do dekalciфикаčního vodného roztoku 10 % kyseliny mravenčí. Dekalcifikace trvala dle velikosti kosti dva až tři týdny, přičemž byl roztok kyseliny dvakrát týdně měněn za čerstvý. Následně byla po dalším propláchnutí ve vodě celá odvápněná kost (nebo u starších jedinců jen její

koncové části) běžným postupem zalita do parafinu. Byly zhotoveny 7 μ m silné řezy, které byly obarveny metodou hematoxylin-eozin a zamontovány do kanadského balzámu.

Vyhotovené histologické řezy jsem nasnímal pomocí softwaru QuickPhoto Camera 3.1 pod binokulární stereo-lupou Nikon Eclipse E400. Výsledné fotografie byly zpracovány pomocí analýzy obrazu ImageJ (Schneider a kol. 2012) na rozsah proliferační zóny u růstové ploténky. Měřila se relativní velikost plochy proliferační zóny vztahovaná na šířku kosti. Nejprve se změřila šířka kosti pod růstovou zónou. Tato velikost se definovala jako konkrétní hodnota 10, která byla pro všechny jedince stejná a sloužila tak jako relativní měřítko. Po nastavení měřítka se následně změřila plocha proliferační zóny. Výsledné hodnoty pak byly opět porovnány s ostatními zjištěnými údaji.

5.2.4. Statistické zpracování

Pro statistická zpracování v programech Excel 2016, SegReg (Oosterbaan 2014) a Statistica 13.2. (Statsoft 2016) byly vždy použity údaje získané z posledního měření před usmrcením (hmotnost, SVL, věk) a po usmrcení (váha gonád a vejcovodů, histologická data). Každý jedinec byl v následujících analýzách zastoupen pouze jednou, nedochází tedy k ovlivnění výsledků kvůli pseudoreplikacím. Při zpracování dat jsem u varlat použil pro každého samce průměr obou hodnot, protože mezi oběma orgány byla jen drobná odchylka. U vaječníku a vejcovodů jsem vždy vybral ten větší z obou orgánů od jedné samice, protože zejména v období ovulace a kladení vajec občas docházelo ke značným rozdílům v hmotnosti levé a pravé části těchto orgánů. Normální rozložení dat bylo testováno Shapirovým-Wilkovým testem v programu Statistica, který pokud je na hladině $\alpha = 0,05$ signifikantní, data nemají normální rozložení.

Pro popis růstu sameců a samic *P. picta* byl v programu Statistica použit pro každé pohlaví zvláště nelineární von Bertalanffyho model asymptotického růstu (Clair 1998; Kratochvíl a Frynta 2002; Kubička a kol. 2013; 2015; 2017):

$$SVL = a(1 - e^{-k(t-t_0)})$$

Kde:

- a = asymptotická SVL (mm)
- e = základ přirozeného logaritmu
- k = růstová rychlost
- t = věk (dny)
- t_0 = hypotetický věk při $SVL=0$

Nejdříve byly zjištěny parametry a , k a t_0 pro obě pohlaví. Pro vyjádření rozdílu v růstu mezi pohlavími byly nejprve spočítány reziduály samic od samců tak, že aktuální naměřené hodnoty samic byly odečteny od predikovaných hodnot samců ve stejném věku, které byly odhadnuty samčím růstovým modelem v programu Excel. Takto vzniklé reziduály pak byly otestovány metodou „*piece-wise regression*“, která umožní statisticky odhadnout diskontinuitu, tj. zlom ve věku, kdy se samci a samice začnou potenciálně v SVL lišit. V programu SegReg (Oosterbaan 2014) bylo proloženo sedm různých modelů (žádný vztah mezi reziduály a věkem; jednoduchá lineární regrese s nenulovou směrnici; dva spojené lineární segmenty s nenulovými směrnici; horizontální lineární funkce následovaná přímkou s nenulovou směrnici; příмка s nenulovou směrnici následovaná horizontální funkcí; dva horizontální segmenty s různými průsečíky na ose y ; dva nepropojené segmenty, z nichž aspoň jeden má nenulovou směrnici), nejlepší z nich byl objektivně vybrán na základě množství vysvětlené variability (tj. testu ANOVA zda se vyplatí do modelu zařadit další parametr). Na základě tohoto odhadu byli jedinci obou pohlaví rozděleni na skupinu před a po zahájení pohlavně dimorfního růstu. Nasbírané hodnoty (tj. SVL, hmotnost těla, hmotnost gonád a vaječníků a hladiny estradiolu a testosteronu) byly porovnány pro jednotlivá pohlaví před a po dosažení tohoto věku. Následně byli samci i samice porovnání dohromady před a po dosažení tohoto věku v hodnotách, které to umožňovaly (tj. SVL, hmotnost těla a hladiny estradiolu a testosteronu). Protože data neměla podle Shapirova-Wilkova testu normální rozdělení, byl v programu Statistica pro jejich porovnání použit neparametrický Mannův-Whitneyův U test (M-W test). Grafy vyjadřující závislost parametrů na věku či SVL pokusných jedinců byly vytvořeny v programu Excel. K popisu závislosti velikosti varlat na SVL samců byla v programu Statistica použita lineární regrese, která za použití menšího počtu parametrů vysvětlila stejné procento variability jako proložená kvadratická funkce.

Před vlastním porovnáním případných rozdílů mezi pohlavími v dynamice uzavírání růstových plotének proximálního a distálního femuru v závislosti na věku a SVL bylo

Shapirovým-Wilkovým testem zjištěno, že všechny spojité proměnné nemají normální rozdělení, přičemž byly tyto odchylky hlavně pro SVL a věk značné (viz grafy těchto závislostí ve výsledcích). Protože proximální růstová ploténka již byla uzavřena u většího počtu jedinců obou pohlaví, bylo možné tato data převést na hodnoty s binomickým rozdělením (uzavřená či neuzavřená chrupavka). Následný model GLZ v programu Statistica s binomickým rozdělením a logit spojovací („link“) funkcí pak testoval, zda uzavírání růstové ploténky proximálního femuru záleží na pohlaví jedince (kategoriální faktor) a na věku či SVL jedince (spojité vysvětlující proměnné testované samostatně). Distální růstová ploténka však ještě nebyla uzavřená u dostatečného počtu zvířat, aby i tady bylo možné použít obdobný model jako u proximální chrupavky. Dynamika uzavírání distální chrupavky v závislosti na pohlaví, věku a SVL tak byla pouze vizualizována pomocí grafů.

Před vlastním porovnáním případných rozdílů mezi pohlavími v enchondrální osifikaci distální epifyzy femuru v závislosti na věku a SVL bylo Shapirovým-Wilkovým testem zjištěno, že všechny spojité proměnné, kromě SVL, opět nemají normální rozdělení, ale odchylky od něj nebyly pro věk a enchondrální osifikaci příliš výrazné (viz grafy těchto závislostí ve výsledcích). Proto byla pro testování pohlavních rozdílů v načasování enchondrální osifikace použita v programu Statistica analýza kovariance (ANCOVA) s věkem či SVL jako kovariátou. Grafy těchto závislostí byly vytvořeny v programu Excel.

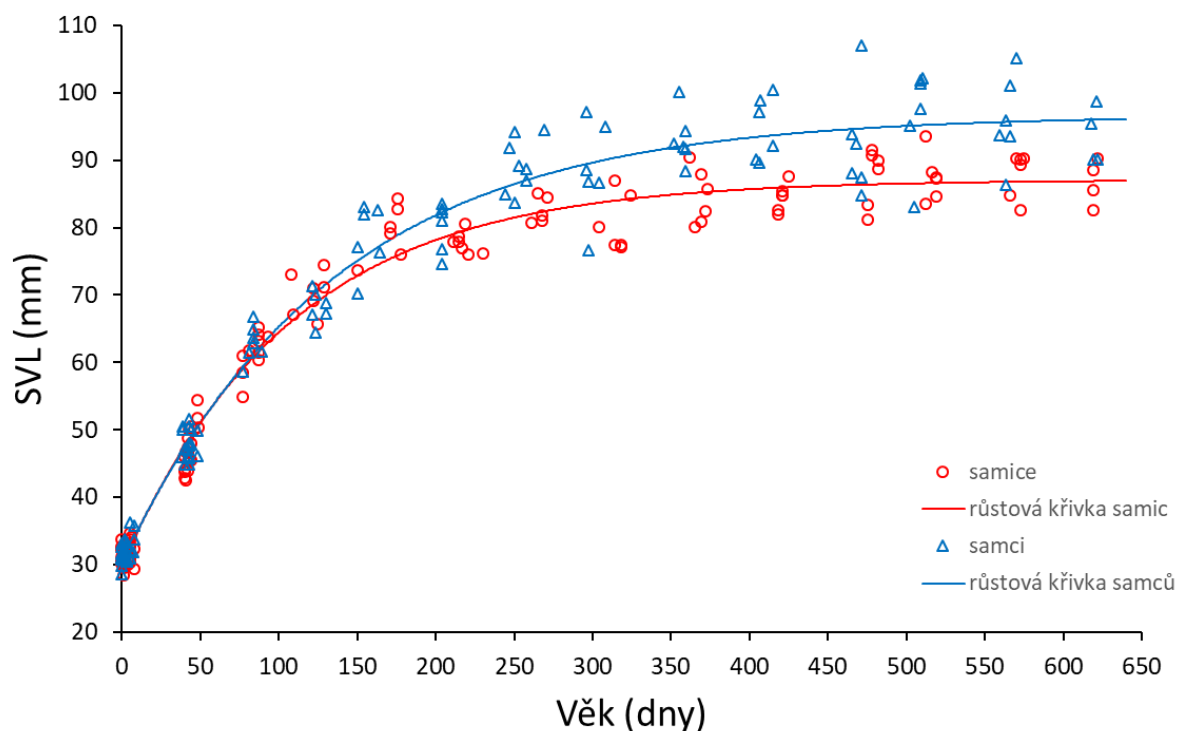
6. Výsledky

6.1. Růstové křivky a reziduály

Růst obou pohlaví gekona *P. picta* evidentně není lineární (Obr. 6). Asymptotický von Bertalanffyho růstový model vysvětlil 97,4 a 98,3 % celkové variability v datech.

Růstový model pro samice: $SVL = 87,1(1 - e^{-0,009(t - (-45,1))})$

Růstový model pro samce: $SVL = 96,1(1 - e^{-0,008(t - (-50,1))})$



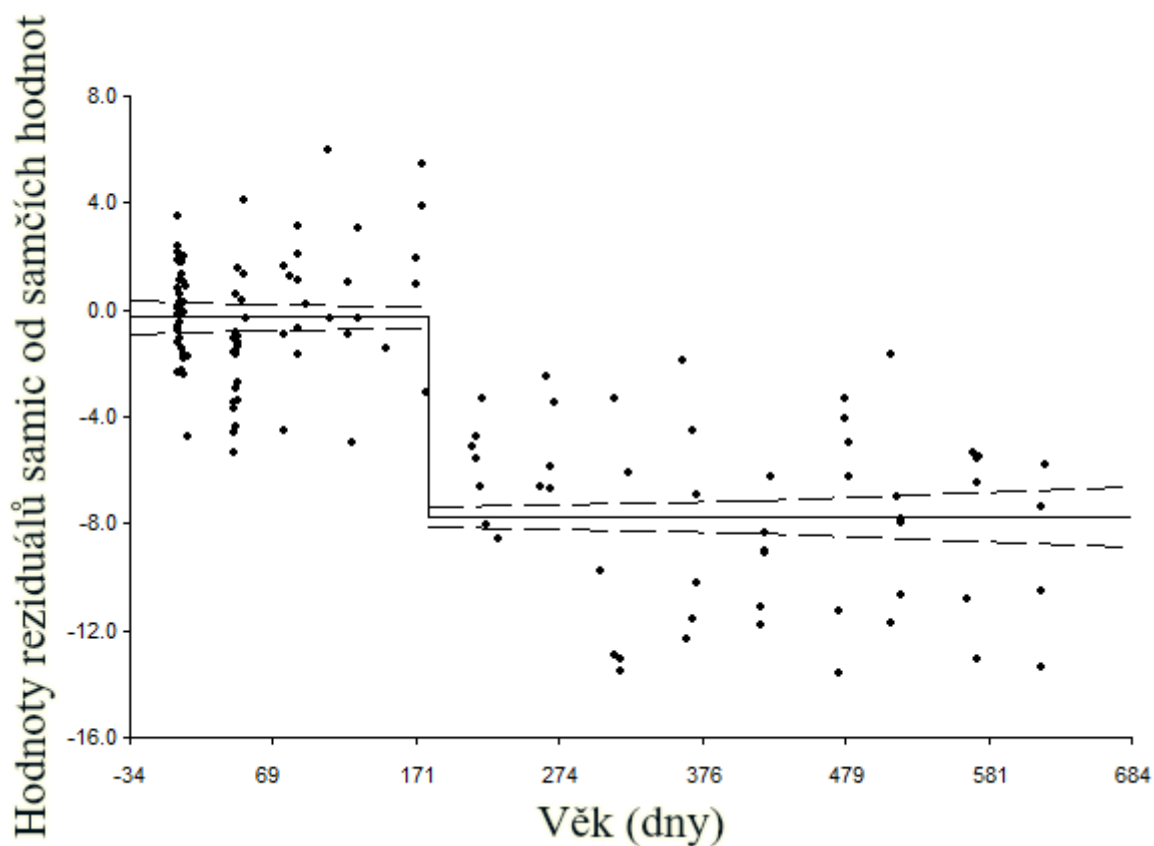
Obr. 6 Vztah mezi věkem a délkou těla z dat z měření při usmrcení jedinců. Samci (modře) dosahují větších velikostí než samice (červeně). Pohlavně specifické křivky růstu jsou odhadnuty na základě von Bertalanffyho modelu.

Na základě kritéria nejvíce vysvětlené variability za použití nejmenšího počtu parametrů vybral program SegReg jako nejvhodnější model se dvěma horizontálními segmenty s různými průsečkami na ose y (Obr. 7). K bodu zlomu, tj. bodu od kterého jsou samci a samice dimorfni v růstu, dochází podle modelu ve věku 180,4 dní \pm 0,53 SE. Před i po bodu zlomu mají obě rovnice lineární regrese nulovou směrnici ($0 \pm 0,005$ SE před a $0 \pm 0,004$ SE po zlomu).

Rovnice lineární regrese před zlomem: $y = 0x - 0,29$

Rovnice lineární regrese po zlomu: $y = 0x - 7,75$

Z Obr. 7 a z rovnic obou lineárních regresí je zřejmé, že reziduály samic od samců jsou do bodu zlomu takřka nulové, protože obě pohlaví rostou stejně rychle. Po 180. dni jsou již samice výrazně menší než samci, kvůli čemuž reziduály dosahují záporných hodnot. Tento rozdíl však zůstává konstantní od bodu zlomu až do konce experimentu, jak je patrné i z Obr. 6.



Obr. 7 Grafické znázornění změn v hodnotách reziduálů samic od samčích hodnot. Z použitého modelu je patrné, že samci a samice rostli do bodu zlomu stejně, zatímco po době zlomu jsou samice výrazně menší než samci. Přerušovaná čára značí 90% konfidenční interval pro výskyt obou křivek lineálních regrese. Bod zlomu je ve věku 180 dní \pm 0,53 SE.

6.2. Porovnání parametrů před a po začátku pohlavně dimorfního růstu

Porovnání samic před a po 180. dnů

Samice měly ve věku, kdy už jsou prokazatelně menší než samci, vyšší hladiny estradiolu (M-W: $U = 579,0$; $p < 0,001$; Obr. 10 a 18). Měly také vyšší hladiny testosteronu (M-W: $U = 1116,0$; $p < 0,001$; Obr. 11 a 19), větší vaječníky (M-W: $U = 208,5$ $p < 0,001$; Obr. 12 a 21) i vejcovody (M-W: $U = 174,0$; $p < 0,001$; Obr. 13 a 20).

Porovnání samců před a po 180. dnů

Samci měli ve věku, kdy jsou už prokazatelně větší než samice vyšší hladiny estradiolu (M-W: $U = 1364,0$; $p = 0,03$; Obr. 10 a 18), měli také vyšší hladiny testosteronu (M-W: $U = 912,0$; $p < 0,001$; Obr. 11 a 19) a větší varlata (M-W: $U = 68,5$ $p < 0,001$; Obr. 14 a 22).

Porovnání samců a samic před dosažením 180. dnů

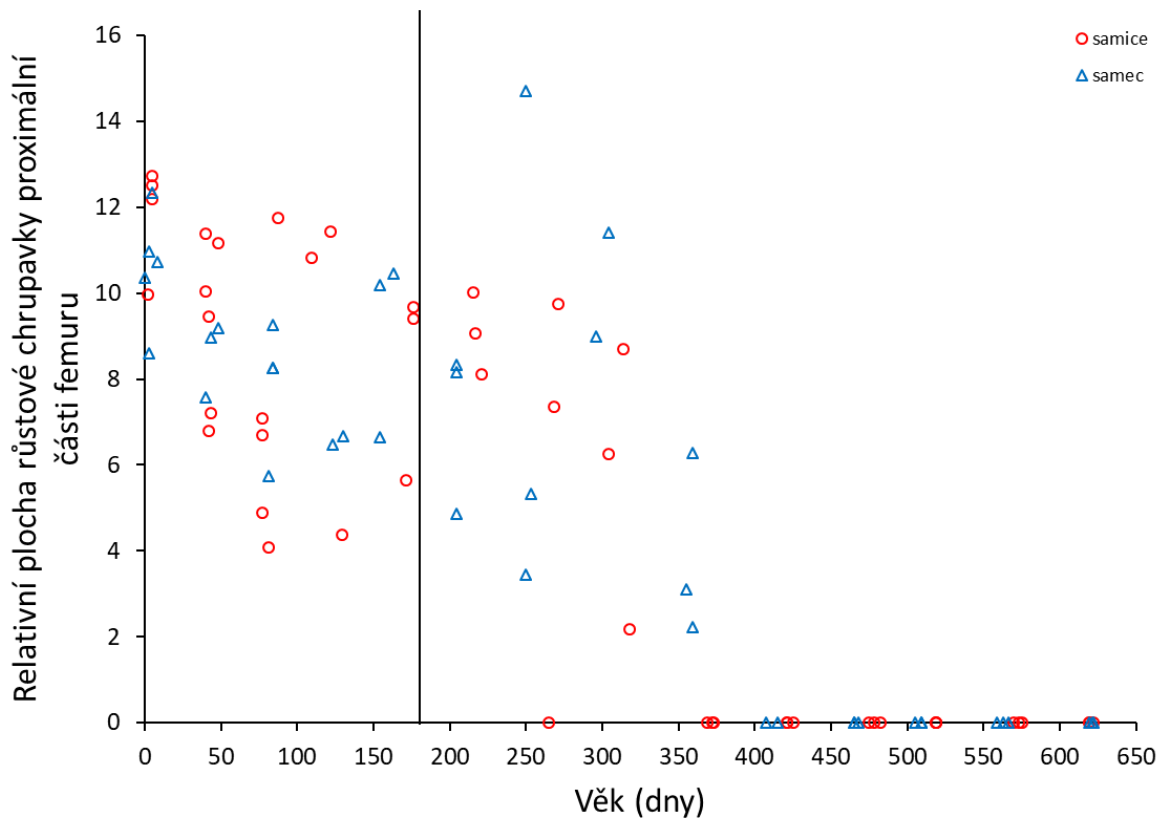
Samci a samice se před 180. dnem věku (tj. v době, kdy se ještě nelišili vzrůstu) nelišili v hladinách estradiolu (M-W: $U = 2207,0$; $p = 0,07$; Obr. 10 a 18), v SVL (M-W: $U = 2714,5$; $p = 0,804$; Obr. 6) a v hmotnosti (M-W: $U = 2714,5$; $p = 0,804$; Obr. 15). Lišili se však v hladinách testosteronu, které byly u samců vyšší (M-W: $U = 31,0$; $p < 0,001$; Obr. 11 a 19).

Porovnání samců a samic po dosažení 180. dnů

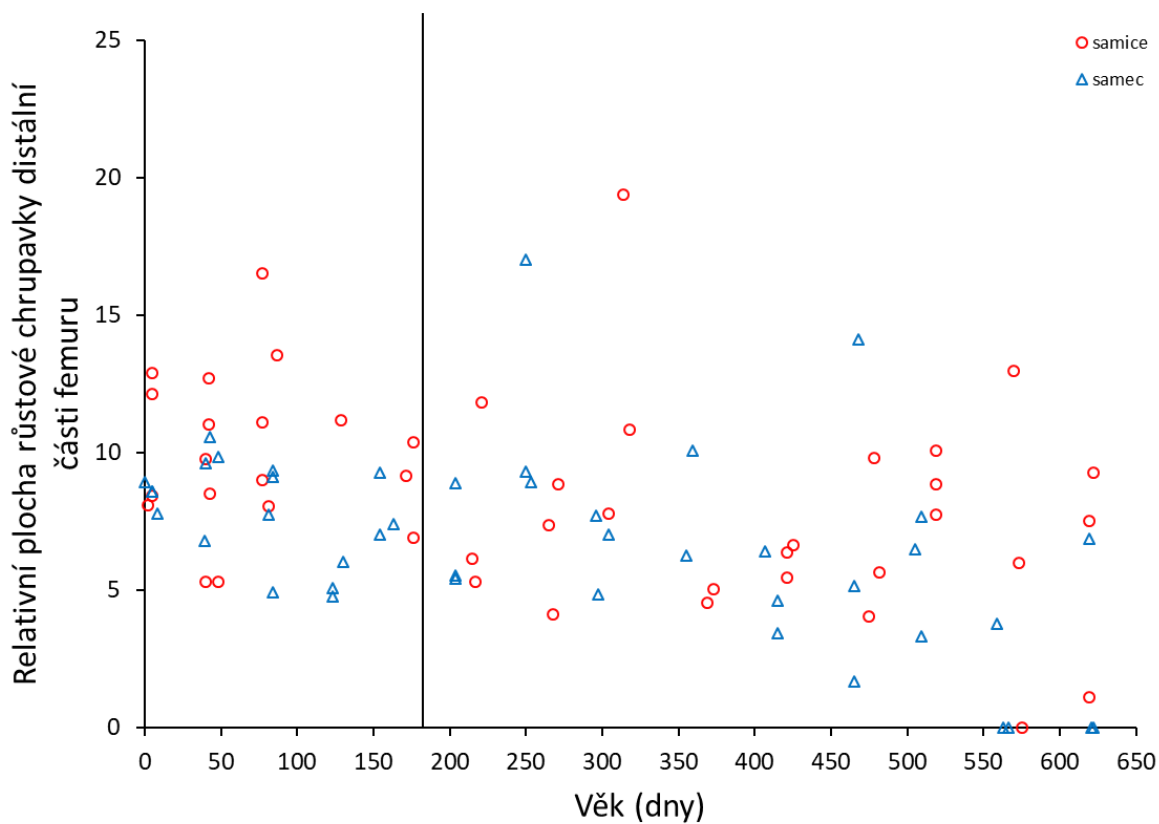
Samice měly po 180. dnu věku (tj. v době, kdy už byly menší než samci) vyšší hladinu estradiolu (M-W: $U = 426,0$; $p = 0,001$; Obr. 10 a 18). Samci měli vyšší hladinu testosteronu (M-W: $U = 12,0$; $p < 0,001$; Obr. 11 a 19), byli těžší (M-W: $U = 12,0$; $p < 0,001$; Obr. 15) a větší (M-W: $U = 569,0$; $p < 0,001$; Obr. 6).

Srovnání parametrů s věkem jedince

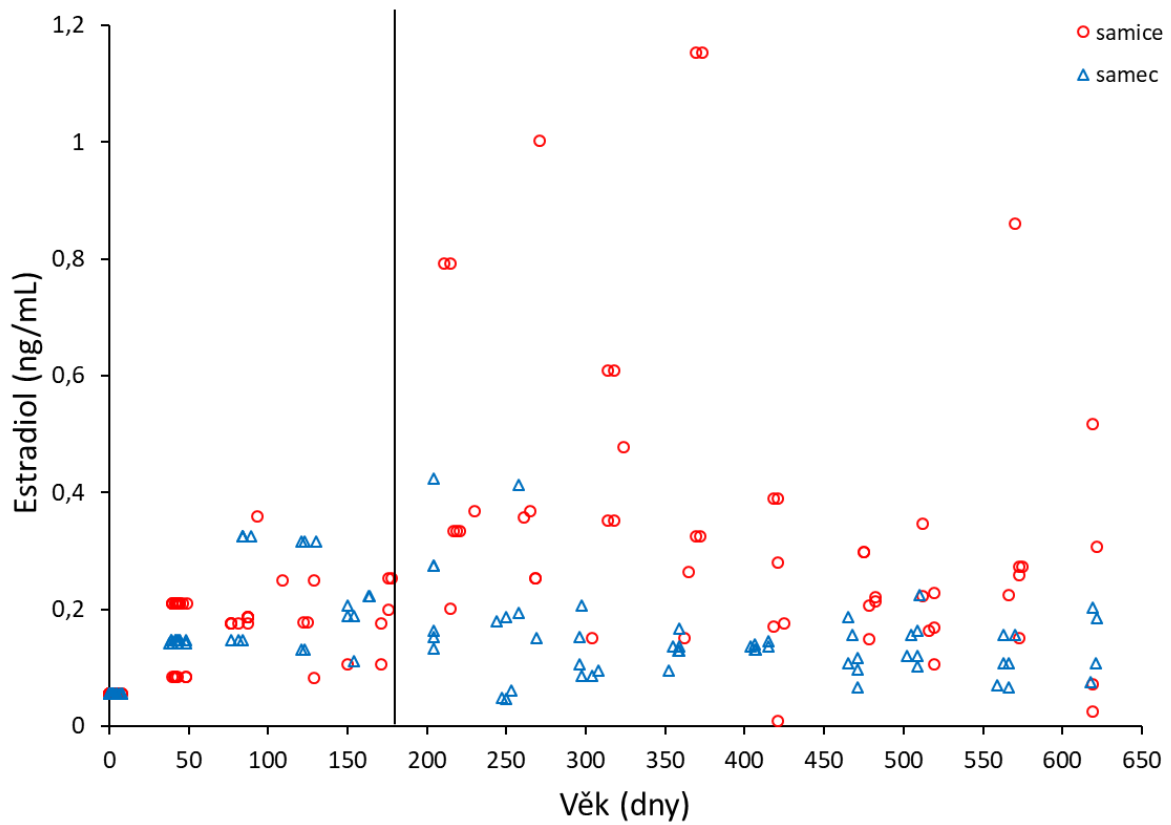
Srovnání sledovaných parametrů (relativní plocha růstové ploténky proximální a distální části femuru, estradiol, testosteron, vaječník, vejcovod, varle, hmotnost) vztažených na věk jedince. V grafu je vždy vyznačen 180. den věku, kdy se podle modelu „*piece-wise regression*“ samci a samice začali v SVL lišit.



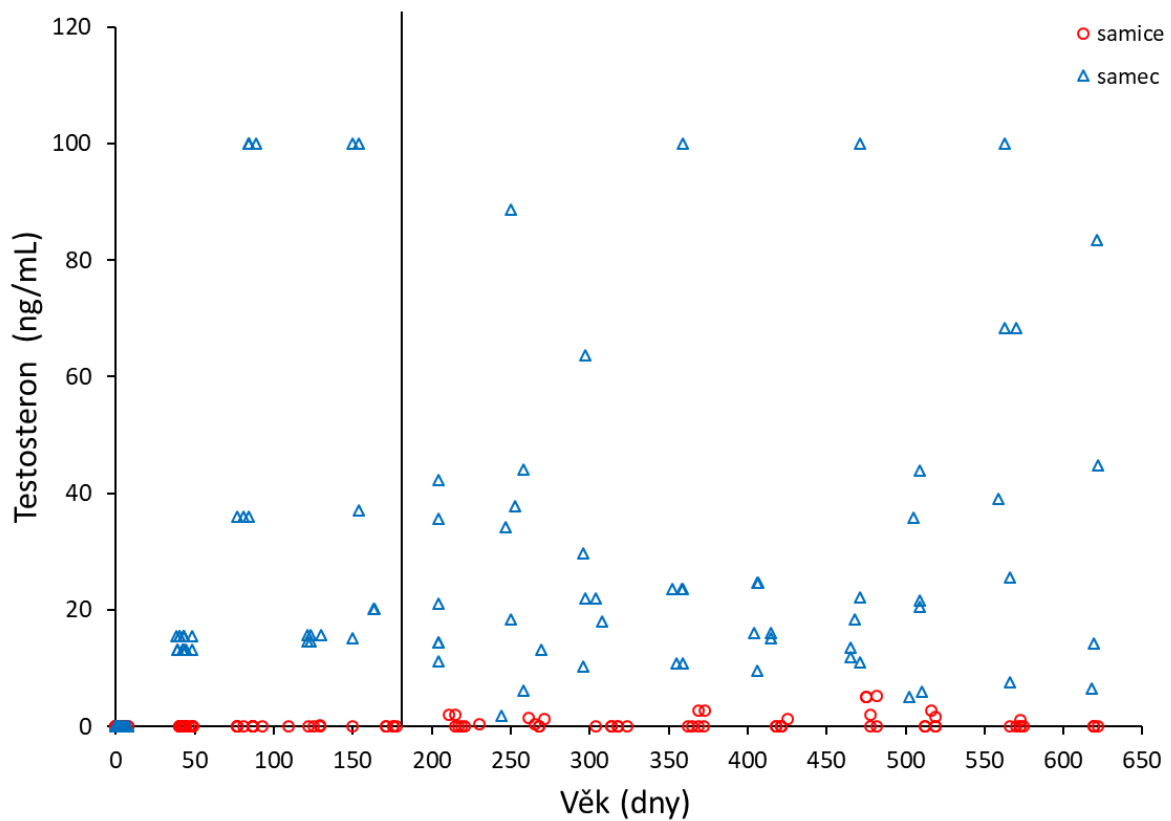
Obr. 8 Vztah mezi věkem a relativní plochou růstové ploténky proximální části femuru u samců a samic. Černá přímka vyznačuje věk 180 dní.



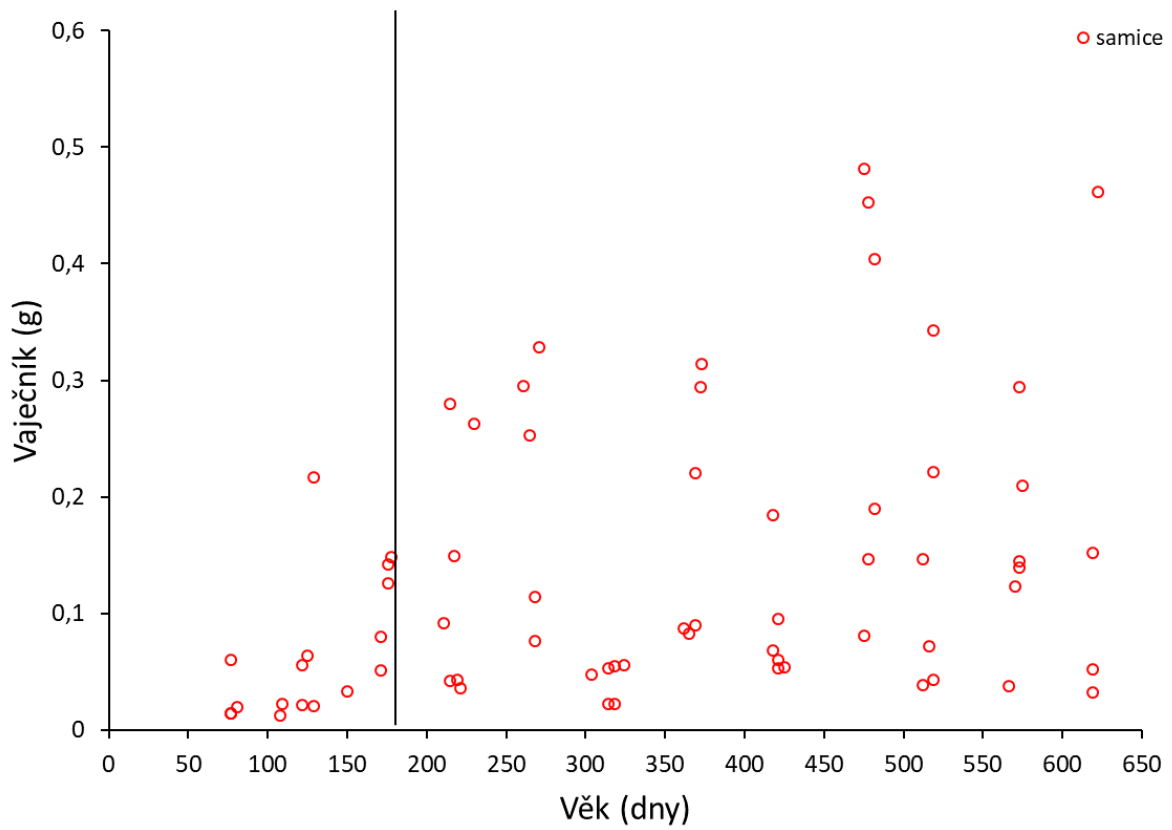
Obr. 9 Vztah mezi věkem a relativní plochou růstové ploténky distální části femuru u samců a samic. Černá přímka vyznačuje věk 180 dní.



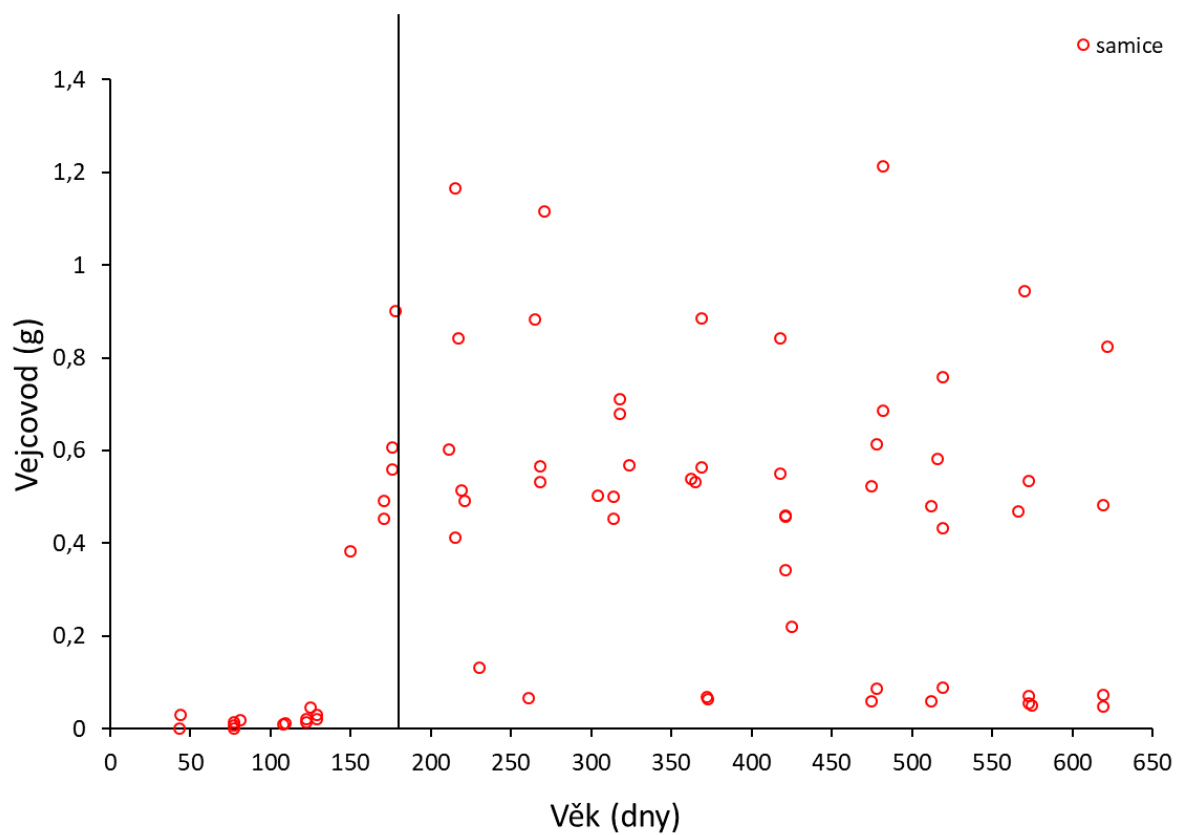
Obr. 10 Vztah mezi věkem a hladinou estradiolu u samců a samic. Černá přímka vyznačuje věk 180 dní.



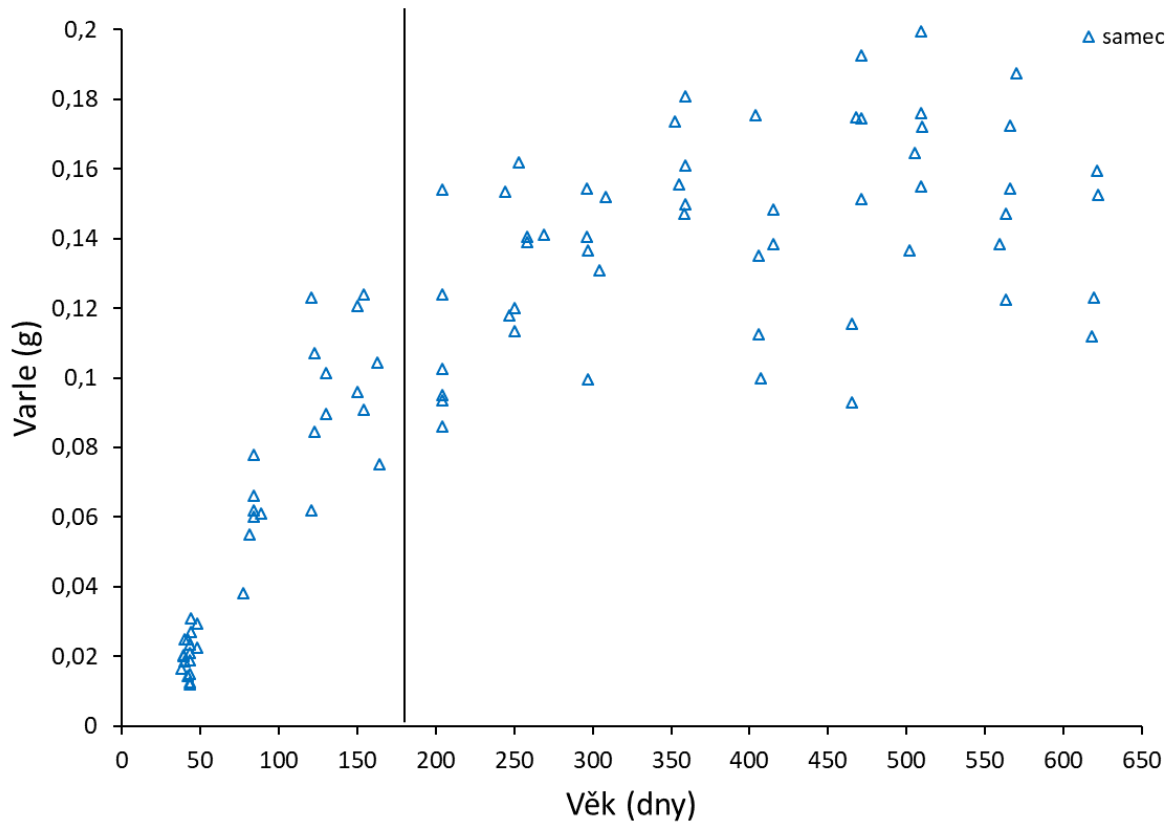
Obr. 11 Vztah mezi věkem a hladinou testosteronu u samců a samic. Černá přímka vyznačuje věk 180 dní.



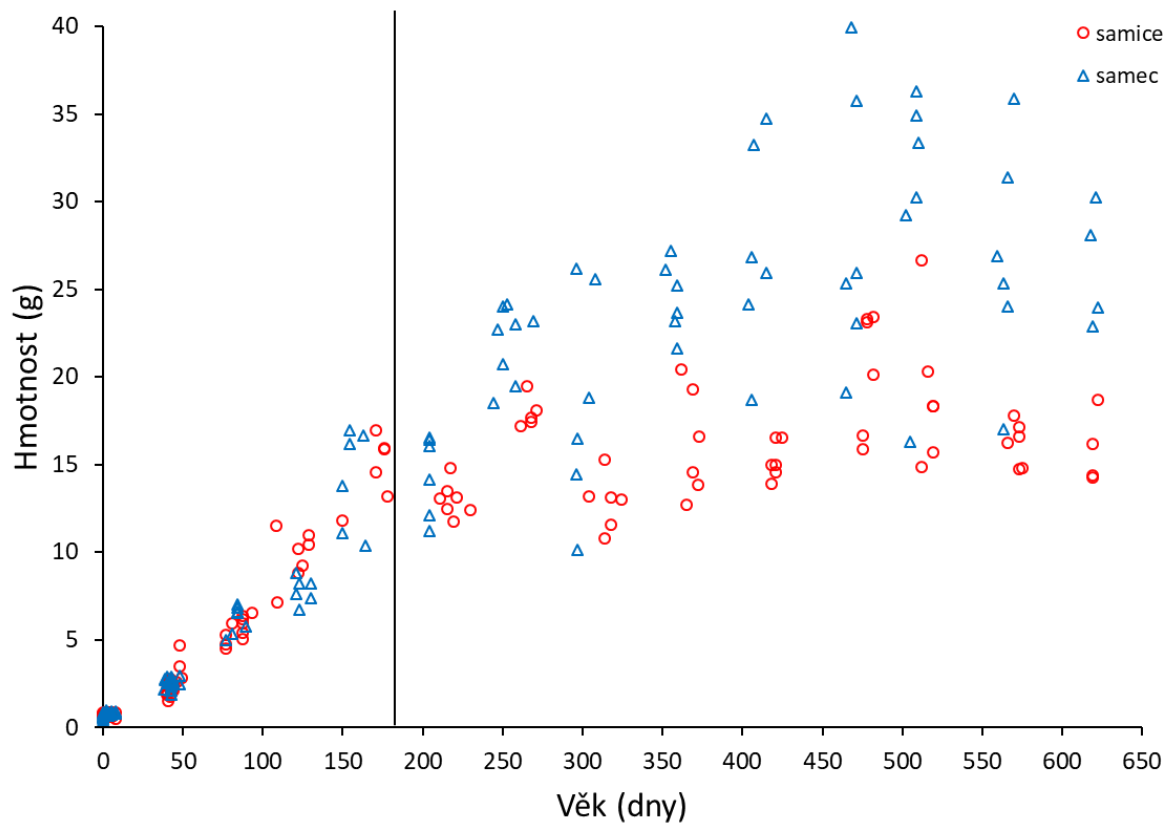
Obr. 12 Vztah mezi věkem a hmotností vaječníků u samic. Černá příčka vyznačuje věk 180 dní.



Obr. 13 Vztah mezi věkem a hmotností vejcovodů u samic. Černá příčka vyznačuje věk 180 dní.



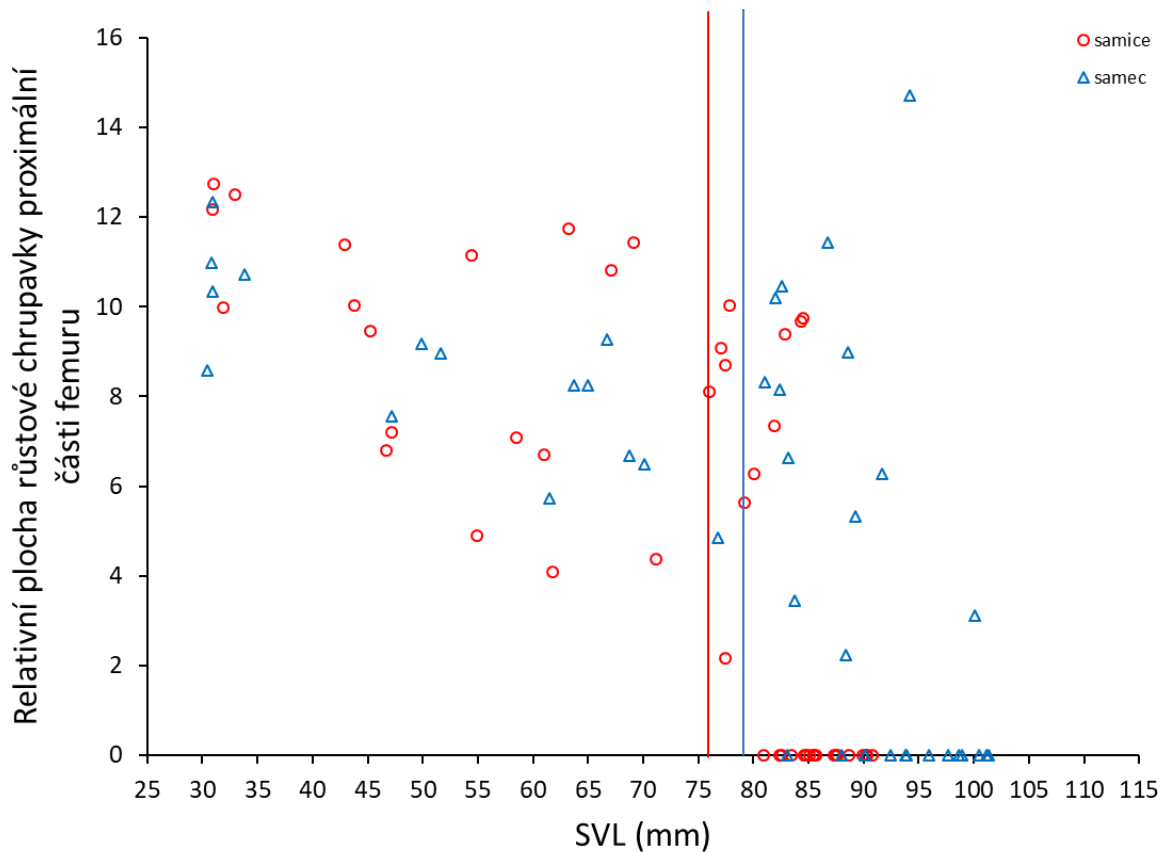
Obr. 14 Vztah mezi věkem a hmotností varlete u samců. Černá příčka vyznačuje věk 180 dní.



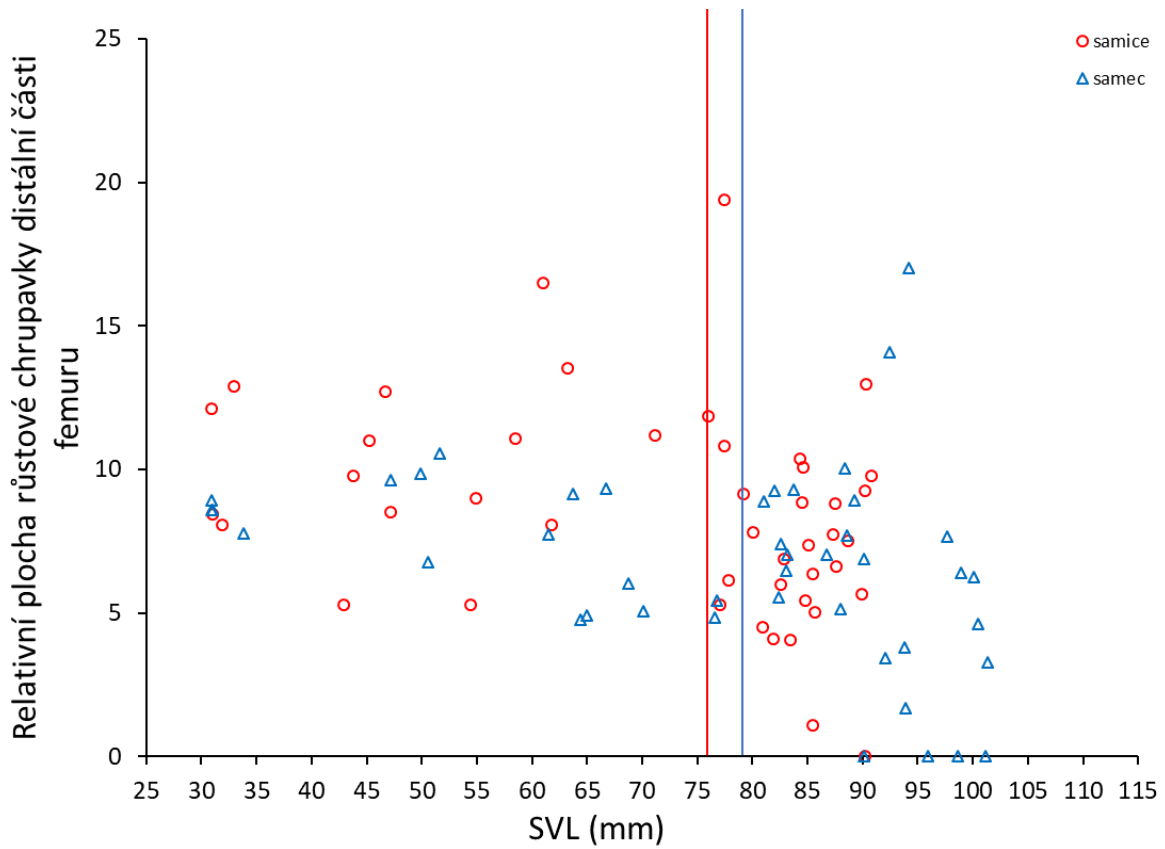
Obr. 15 Vztah mezi věkem a hmotností u samců a samic. Černá příčka vyznačuje věk 180 dní.

Srovnání parametrů s velikostí těla

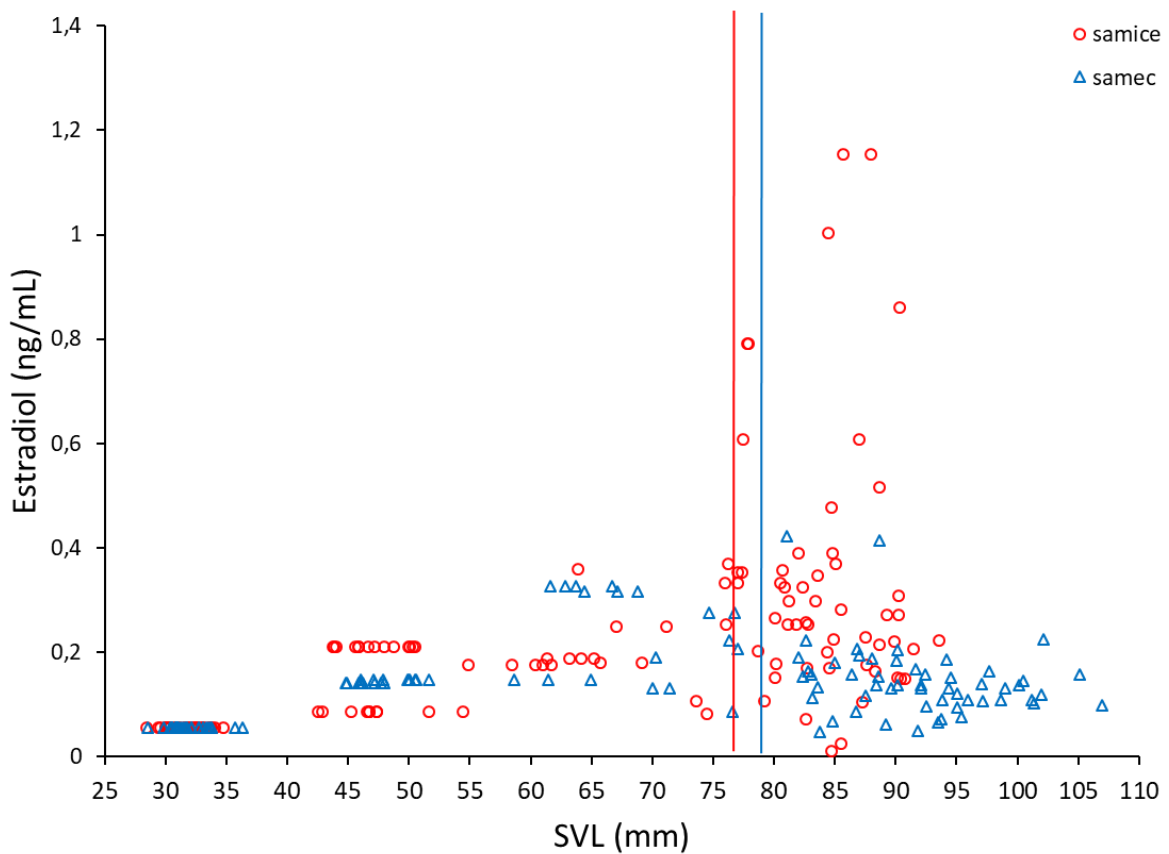
Srovnání sledovaných parametrů (relativní plocha růstové ploténky proximální a distální části femuru, estradiol testosteron, vaječník, vejcovod a varle) vztahených na velikost těla. Podle modelu „*piece-wise regression*“ se začínají pohlaví od sebe lišit 180. den věku, což odpovídá SVL 76 mm pro samice a 79 mm pro samce.



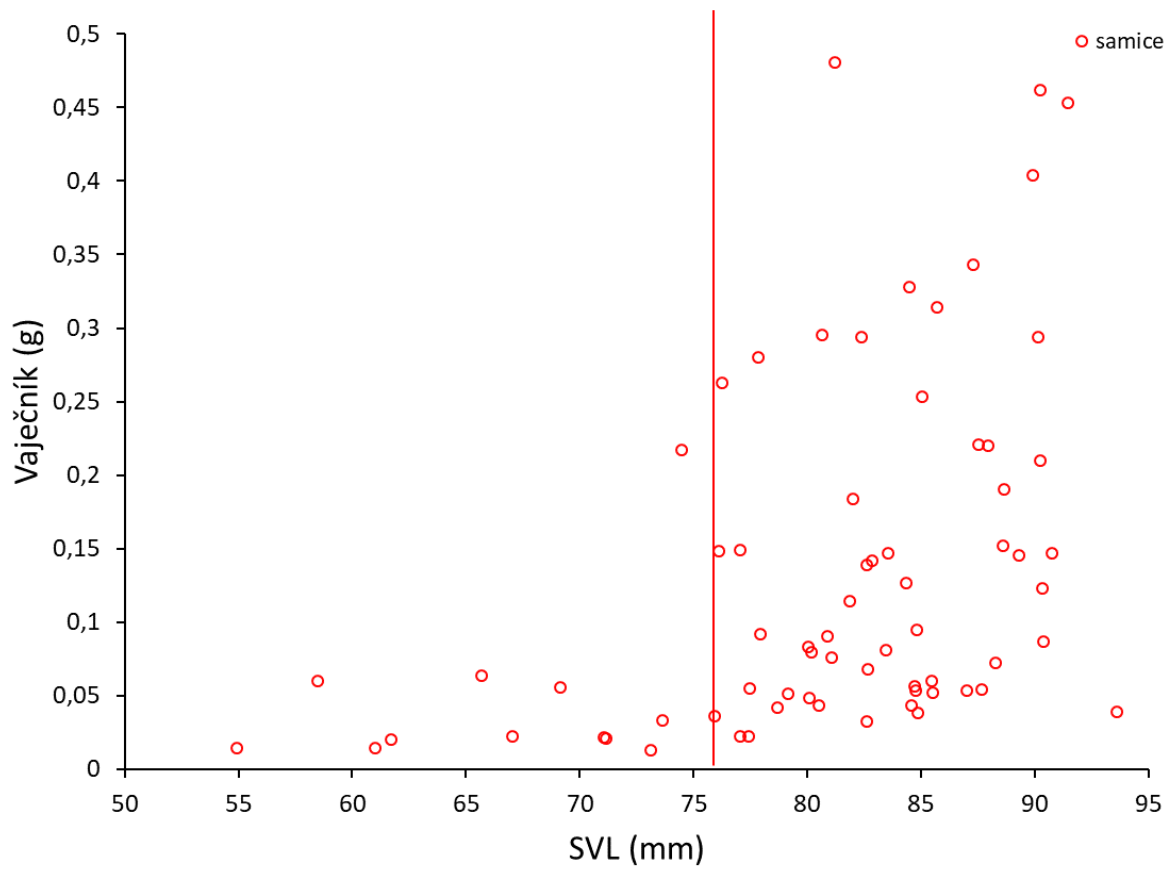
Obr. 16 Vztah mezi SVL a relativní plochou růstové ploténky proximální části femuru u samců a samic. Červená přímka vyznačuje SVL 76 mm a modrá 79 mm.



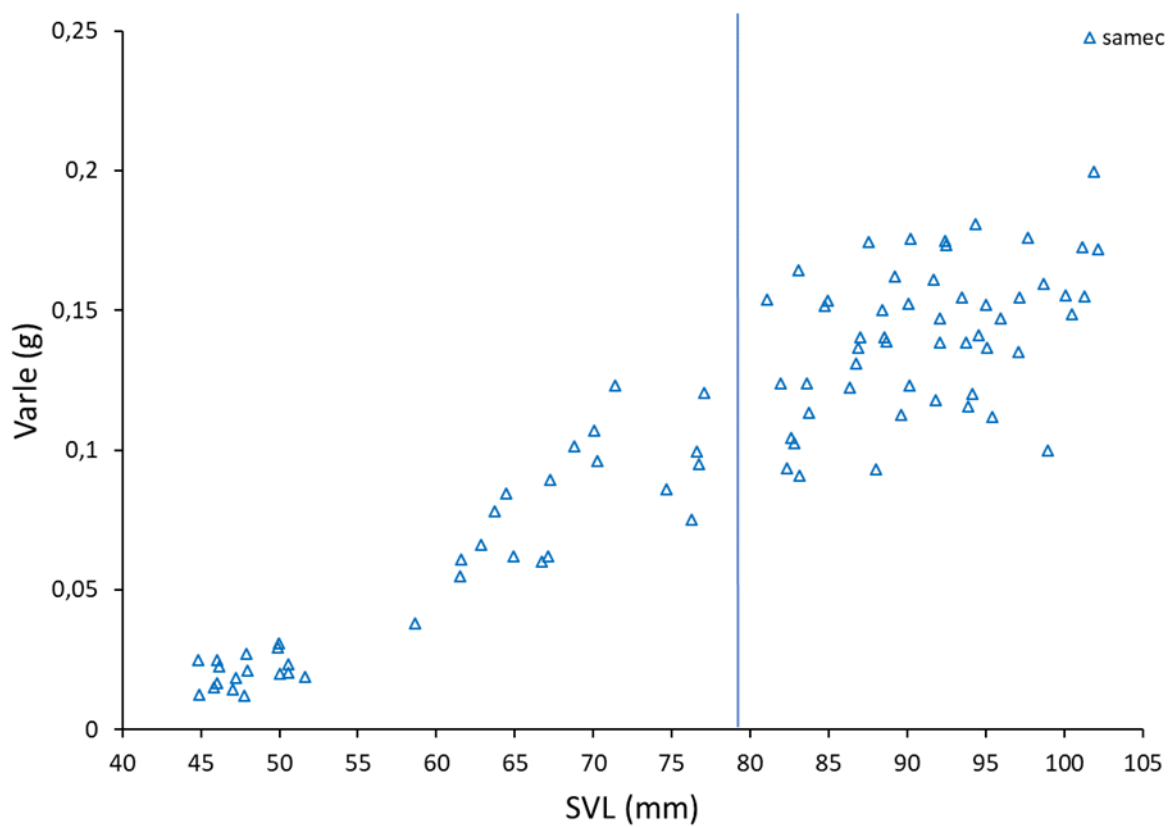
Obr. 17 Vztah mezi SVL a relativní plochou růstové ploténky distální části femuru u samců a samic. Červená příčka vyznačuje SVL 76 mm a modrá 79 mm.



Obr. 18 Vztah mezi SVL a hladinami estradiolu u samců a samic. Červená příčka vyznačuje SVL 76 mm a modrá 79 mm.



Obr. 21 Vztah mezi SVL a hmotností vaječníku u samic. Červená příčka vyznačuje SVL 76 mm.



Obr. 22 Vztah mezi SVL a hmotností varlete u samců. Modrá příčka vyznačuje SVL 79 mm.

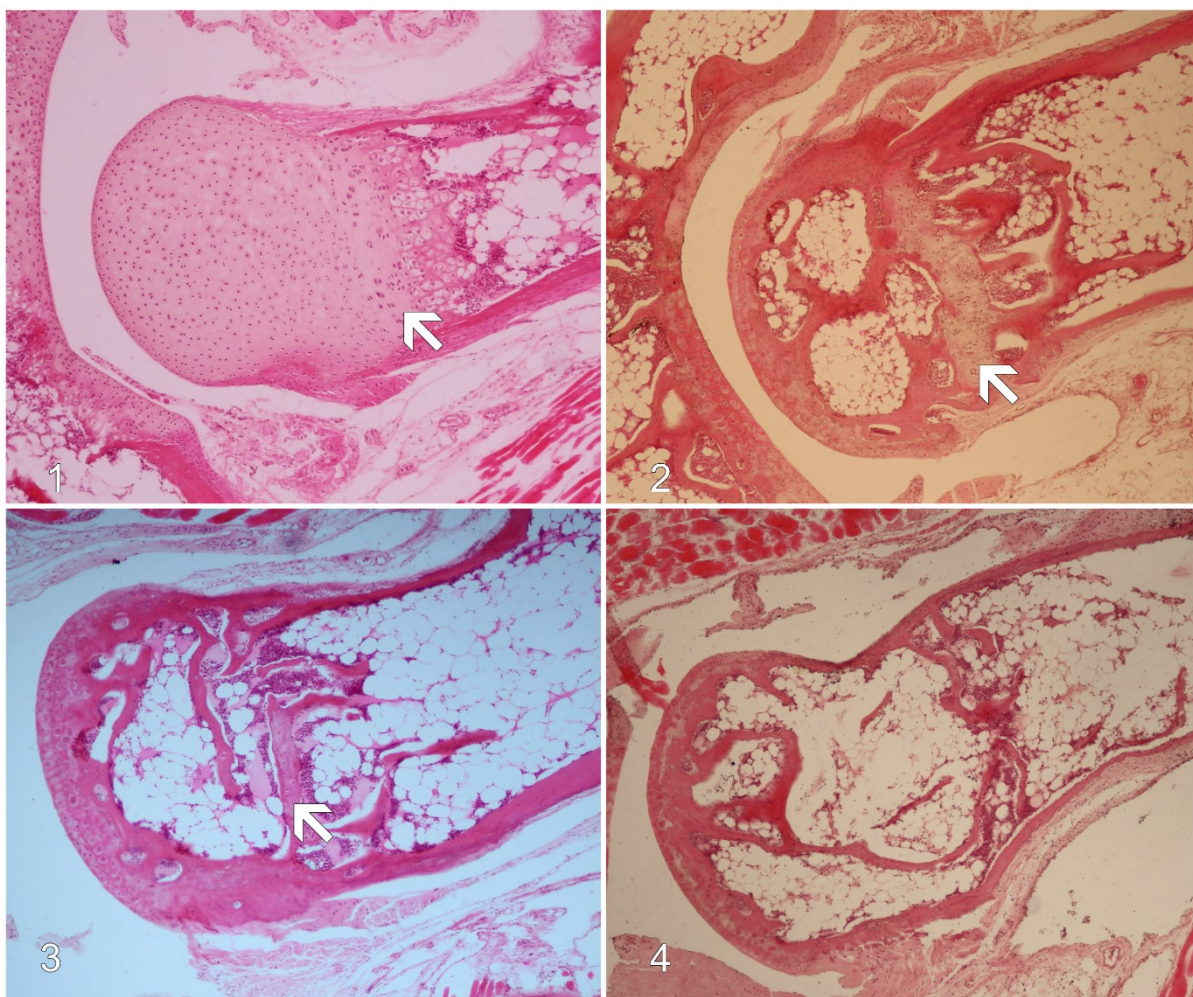
Vztah mezi hmotností varlat a velikostí těla nejvíce parsimonně vysvětlila lineární regrese. Model vysvětlí 86,8 % variability. Varlata rostou se SVL v podstatě lineárně.

$$m_{(\text{průměr varlat})} = 0,003SVL - 0,11$$

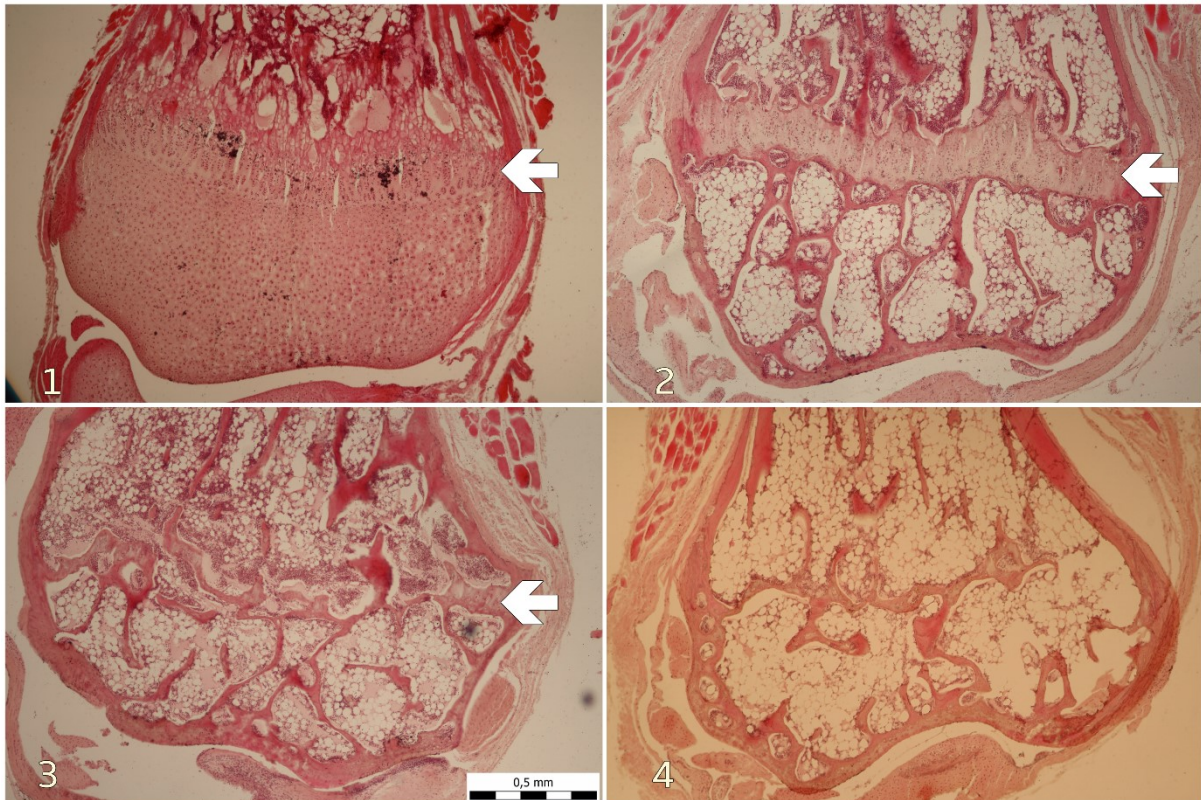
6.3. Porovnání uzavírání růstových plotének femuru

Z Obr. 23, 8 a 16 je patrné, že se růstová chrupavka proximálního femuru uzavírá u obou pohlaví. Test GLZ (binomické rozdělení, logit link funkce) ukázal, že uzavírání proximální růstové ploténky, pokud je jako spojitá vysvětlující proměnná použit věk jedince, nezáleží na pohlaví jedince ($W = 2,96$; $p = 0,085$), záleží však na věku jedince ($W = 6,45$; $p = 0,011$). Z uvedeného vyplývá, že se proximální růstová chrupavka uzavírá u starších jedinců, avšak nezávisle na pohlaví (Obr. 8). Pokud je jako spojitá vysvětlující proměnná použita SVL jedince, pak záleží jak na jeho pohlaví ($W = 9,75$; $p = 0,002$), tak i na SVL ($W = 15,86$; $p < 0,001$). Z toho vyplývá, že samicím se proximální růstová ploténka uzavírá v menší SVL, než samcům (Obr. 16).

Z Obr. 8, 9 a 24 je patrné, že se růstová ploténka distálního femuru uzavírá také uzavírá u obou pohlaví. Z důvodů uvedených v metodice však nelze průběh uzavírání spolehlivě statisticky interpretovat. Na základě grafického znázornění lze odhadnout, že po celou dobu experimentu měli samci i samice růstovou ploténku stejně aktivní a pokud došlo k jejímu uzavření, dosahovali samci větší SVL než samice (Obr. 9 a 17).



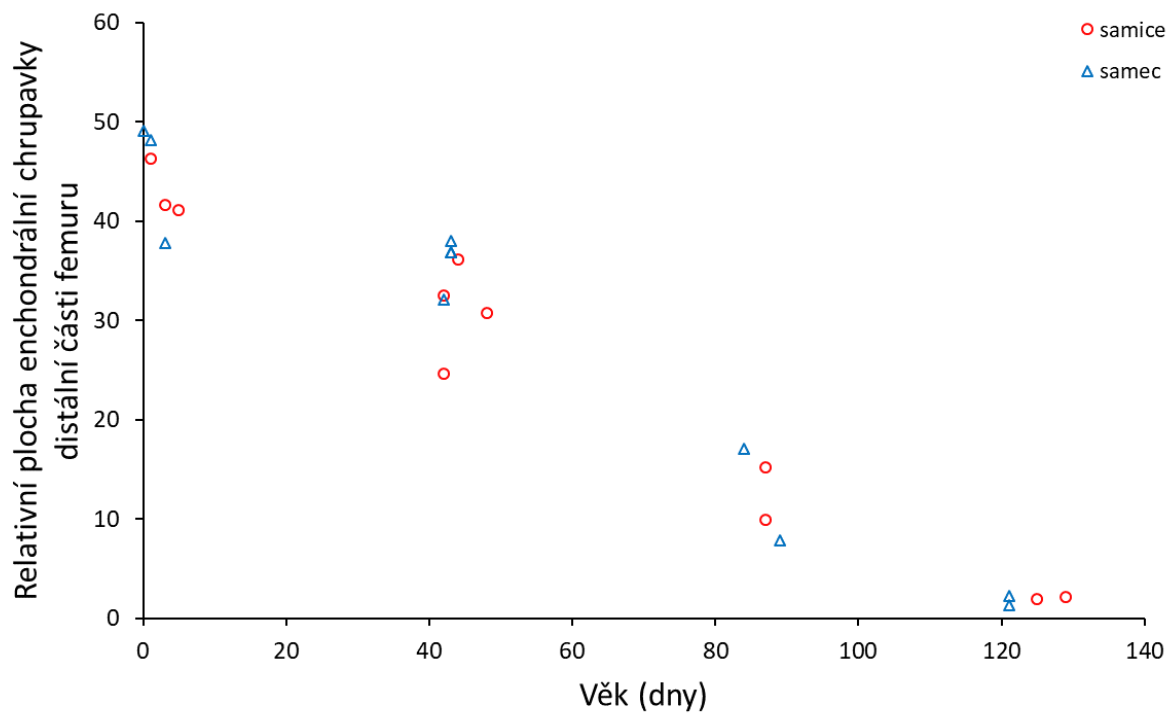
Obr. 23 Změny v růstové ploténce proximální části stehenní kosti (hlavice) během života jedince. 1) Proliferační zóna je plně aktivní a je odlišitelná od chrupavčité tkáně kloubní hlavice před nástupem enchondrální osifikace; (stáří jedince 2 dny; 2) proliferační zóna je plně aktivní, enchondrální osifikace již proběhla (stáří jedince 217 dnů); 3) proliferační zóna již začíná degenerovat (stáří jedince 318 dnů); 4) proliferační zóna již zanikla (stáří jedince 519 dnů). Šipka ukazuje na proliferační zónu.



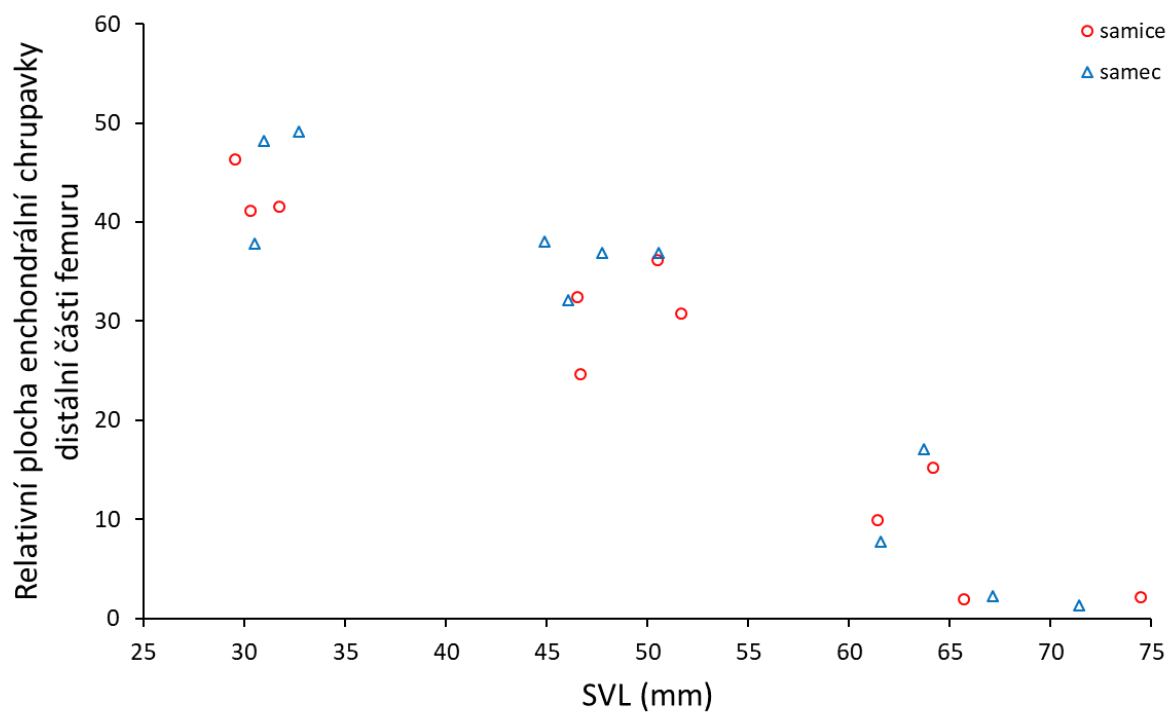
Obr. 24 Změny v růstové ploténce distální části stehenní kosti během života jedince. 1) Proliferační zóna je plně aktivní a je odlišitelná od chrupavčité tkáně kloubní hlavice před nástupem enchondrální osifikace (stáří jedince 1 den); 2) proliferační zóna je plně aktivní, enchondrální osifikace již proběhla (stáří jedince 373 dnů); 3) proliferační zóna již začíná degenerovat (stáří jedince 619 dnů); 4) proliferační zóna již zanikla (stáří jedince 621 dnů). Šipka ukazuje na proliferační zónu

6.4. Průběh enchondrální osifikace epifýzy distálního femuru

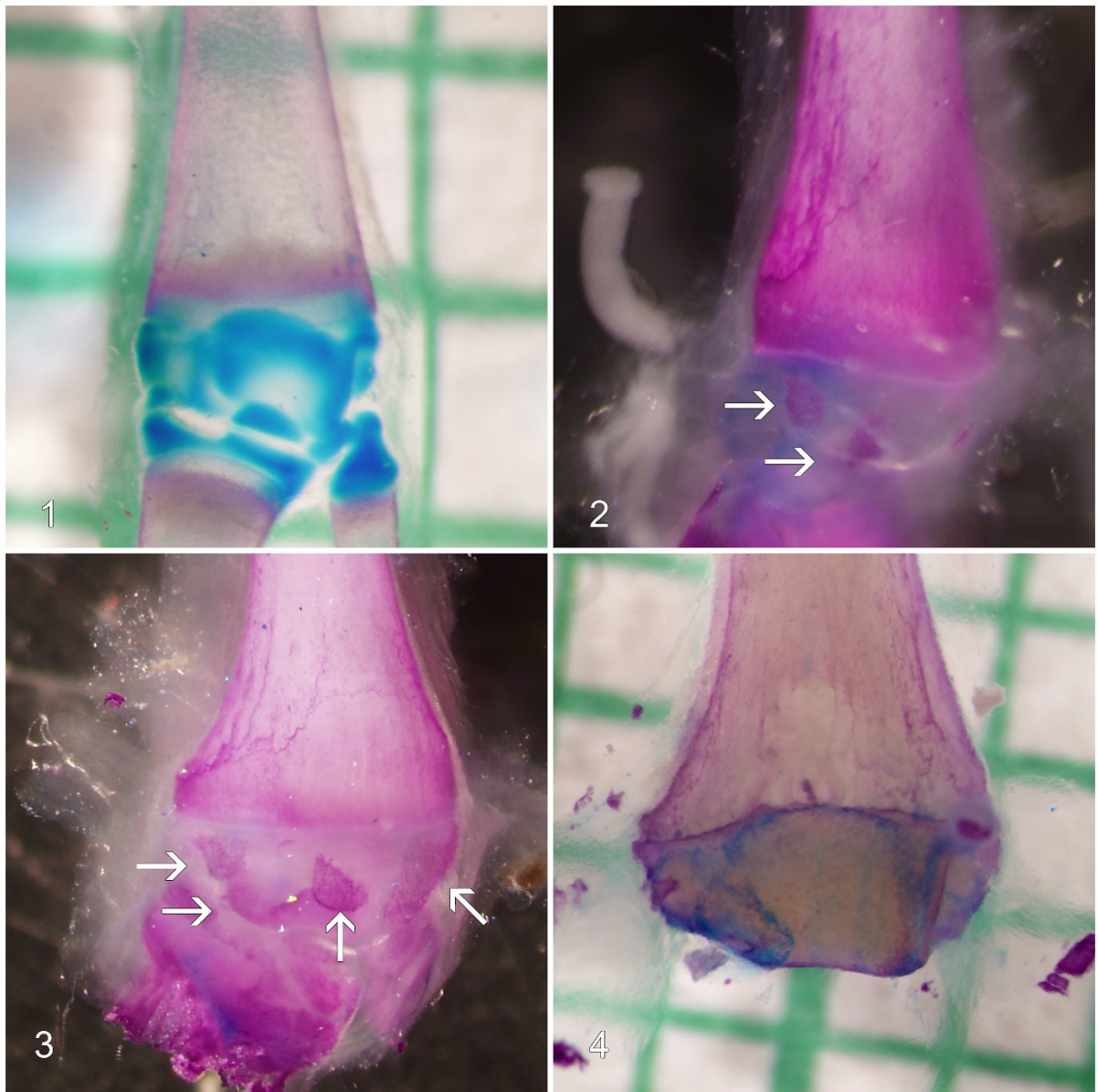
Epifýza distálního femuru osifikuje do 121 dne věku u obou pohlaví (Obr. 25; 27). Průběh osifikace nezáleží na pohlaví ani když je jako kovariáta použit věk (ACNOVA: $F_{(1,19)}=0,70$; $p=0,415$; Obr. 25), ani když je jako kovariáta použita SVL (ANCOVA: $F_{(1,19)}=0,44$; $p=0,514$; Obr. 26).



Obr. 25 Vztah mezi věkem a relativní plochou enchondrální chrupavky distální části femuru u samců a samic.



Obr. 26 Vztah mezi velikostí a relativní plochou enchondrální chrupavky distální části femuru u samců a samic.



Obr. 27 Obrázek 1 Změny v nástupu osifikace epifýz u mladých jedinců. 1) Chrupavčité tkáně kloubní hlavice před nástupem enchondrální osifikace (stáří jedince 1 den); 2) enchondrální osifikace je plně aktivní (stáří jedince 42 dnů); 3) enchondrální osifikace se rozšiřuje a vyplňuje epifýzu (stáří jedince 89 dnů); 4) enchondrální osifikace již proběhla (stáří jedince 121 dnů). Šipka ukazuje na sekundární osifikační centrum.

7. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo testovat navržené proximální mechanismy ontogeneze SSD u gekona *Paroedura picta* pomocí sledování průběhu růstu a osifikace femuru, typické dlouhé kosti. Zajímalo mě také, jak a kdy se samci a samice začnou lišit v růstu, jak se během ontogeneze mění u obou pohlaví velikost gonád a hladiny významných gonadálních hormonů estradiolu a testosteronu. A v neposlední řadě také, zda a jak působí přirozené hladiny gonadálních hormonů na růstové ploténky, které růst kosti do délky umožňují.

7.1. SSD a pohlavně dimorfní růst kostí

Model *piece-wise* regrese ukázal, že se samice začnou v SVL výrazně odlišovat od samců ve věku 180 dní, to podle růstových modelů odpovídá SVL okolo 76 mm pro samice a okolo 79 mm pro samce (Obr. 6), do té doby rostou obě pohlaví v podstatě stejně. Zajímavé je, že změna SVL samic vůči samcům, ke které dochází brzy po 180. dnu, je poměrně značná, ale už se dále neprohlubuje a tento rozdíl zůstává konstantní až do konce experimentu. Obě pohlaví se tak po tomto náhlém zpomalení růstu samic již v rychlosti růstu opět neliší, tj. jejich růst probíhá víceméně paralelně (Obr. 7). Trend růstu pokusných jedinců *P. picta* je podobný jako v předchozích studiích (Kubička a Kratochvíl 2009; Starostová a kol. 2010; 2013; Kubička a kol. 2015; 2017). Z těchto růstových trendů je patrné, že v pozdějším věku je růst u tohoto gekona takřka minimální až žádný, což úplně neodpovídá definici neukončeného růstu (Charnov a kol. 2001; Obr. 2). Analýza řezů růstových plotének proximálního i distálního femuru potvrdila, že v průběhu experimentu došlo k uzavření těchto plotének u obou pohlaví (Obr. 23 a 24). I když délka femuru je jiné vyjádření velikosti než SVL, obě hodnoty spolu alespoň u tohoto druhu velmi úzce korelují (Jirků 2007). Proto lze předpokládat, že uzavírání růstových plotének femuru bude souviset s uzavíráním růstových plotének obratlů (Raimann a kol. 2017), a že gekon *P. picta* má ukončený růst, podobně jako bylo zjištěno u některých jiných plazů (Castanet a kol. 1988; De Buffrénil a kol. 2005; Frýdlová a kol. 2017). Oproti definici ukončeného růstu (Obr. 2; Charnov a kol. 2001) dochází k uzavírání růstových plotének femuru až po dosažení pohlavní zralosti, přičemž se obě ploténky v načasování uzavírání liší (Obr. 16 a 17). První zaznamenané uzavření proximální růstové ploténky nastalo 265. den, zatímco u distální růstové ploténky nastalo až 566. den. Rozdíl v načasování uzavření růstových plotének by mohl být způsoben, podobně jako u obratlovců s ukončeným růstem (saviců), rozdílnou šíří plochy růstové ploténky, kdy v rámci širší (v tomto případě distální) růstové ploténky dochází k vyčerpání proliferační kapacity později (Šmahela 2001; Serrat a kol. 2007). Domnívám se, že

kdyby se v pokusu pokračovalo, došlo by také k uzavření distální růstové ploténky femuru u více jedinců, podobně jako tomu bylo v proximální části.

Z porovnání uzavírání proximálních růstových plotének femuru mezi pohlavími je patrné, že se pohlaví neliší ve věku, kdy k uzavírání růstové ploténky dochází (Obr. 8), samicím se však ploténka uzavírá při dosažení menší délky těla než samcům (Obr. 16). Uzavírání růstové ploténky nebylo pozvolné, ale docházelo k němu poměrně rychle, opět podobně jako u savců (Weise a kol. 2001; Nilsson a kol. 2014). Vzhledem k malému množství jedinců s uzavřenou růstovou ploténkou distální části femuru a rozložení dat bohužel nebylo možné použít stejný nebo podobný statistický model pro srovnání uzavírání této ploténky. Nicméně v Obr. 9 a 17 lze pozorovat podobný trend jako u proximální ploténky – u obou pohlaví je distální růstová ploténka opět aktivní stejně dlouho až do jejího náhlého uzavření, přičemž samicím se uzavírá při dosažení menší délky těla než samcům. Zdá se tedy, že doba proliferační aktivity růstových plotének je u obou pohlaví stejná, než se poměrně rychle se ve stejném věku uzavře, ale u samců je proliferace umožňující růst kosti do délky výraznější.

7.2. Příčiny pohlavně dimorfního růstu kostí

Při porovnání hladin hormonů u obou pohlaví před a po 180. dnu (tj. před a po začátku pohlavně dimorfního růstu) mají samci vždy vyšší hladiny testosteronu než samice (Obr. 11). Pro obě pohlaví samostatně však také platí, že hladiny testosteronu mají vyšší po 180. dnu. Zvýšené hladiny testosteronu u samic v období pohlavně dimorfního růstu mohou být na první pohled překvapivé, ale lze je vysvětlit tak, že testosteron slouží jako prekurzor pro syntézu estradiolu pomocí aromatázy (viz Obr.1; Norris 2007) a výrazněji zvýšené hladiny testosteronu tak pouze korelují s hladinami estradiolu v době jeho zvýšené syntézy. Tento testosteron by teoreticky mohl nepřímo působit na konečnou délku těla samic (působením na zmenšení vaječnicků a tím i normální produkci ovariálních hormonů; Starostová a kol. 2013), jedná se však patrně o přirozené výkyvy hladin, zatímco v práci Starostové a kol. byly pro zvýšení hladin tohoto hormonu použity testosteronové implantáty. Samcům v mém pokusu rostla varlata víceméně lineárně se SVL (Obr. 14) a i když měli v období pohlavně dimorfního růstu hladiny testosteronu vyšší (Obr. 11), neovlivnilo to tempo jejich růstu (Obr. 6 a 7). Navíc v předchozích studiích Starostové a kol. (2013) a Kubička a kol. (2015, 2017) bylo opakovaně experimentálně zjištěno, že se testosteron na růstu samců tohoto druhu nepodílí.

Před 180. dnem měli samci a samice podobné hladiny estradiolu. Culter (1997) ve studii na lidech usuzoval, že nízké hladiny estrogenů stimulují růst u obou pohlaví. Avšak u

předpubertálních dívek dochází vlivem zvýšených hladin estrogenů, souvisejících s dozráváním pohlavních orgánů, k dřívějšímu epifyzálnímu zrání souvisejícímu s dřívějším ukončením růstu ve srovnání s chlapci. To odpovídá i situaci v této studii, kdy se s nástupem reprodukce těsně po 180. dnu (či po dosažení příslušné délky těla odpovídající tomuto věku) samicím zvedly hladiny estradiolu (Obr. 10 a 18). Souvislost zvýšených hladin estradiolu se zvýšenou aktivitou reprodukčních orgánů samic (zvětšený vaječník znamená, že je orgán v pozdně vitelogenní fázi a zvětšený vejcovod znamená, že obsahuje ovulovaný folikul) je patrná i z Obr. 21 a 12 u vaječniců a Obr. 13 a 20 u vejcovodů.

Zdá se nápadné, že hladiny estradiolu se zvýšily a růst samic se zpomalil krátce poté, co vstoupily do reprodukce (všechny byly poprvé pářeny zhruba v 7 gramech hmotnosti). Z předchozích experimentů je však zřejmé, že omezení alokace do reprodukce, ať už izolací samic od samců nebo odstraněním jednoho z ovárií, nemá na konečnou délku těla samic žádný vliv (Starostová a kol. 2013; Kubička a kol. 2017). Z toho lze vyvodit, že růst samic je u gekona *P. picta* regulován nikoliv vstupem do puberty, ale nástupem do aktivní reprodukce, pro kterou je charakteristická zvýšená produkce ovariálních hormonů včetně estradiolu. To by vysvětlovalo, proč nespárené samice stejného druhu gekona dorostly stejné délky těla, jako rozmnožující se samice (Starostová a kol. 2013). Tyto sociálně izolované samice měly ve vaječnicích výrazně zvětšené folikuly v pozdní vitelogenní fázi a je známo, že produkce žloutku v játrech je u obratlovců právě stimulována zvýšenými hladinami estradiolu (Norris 2007). Tyto samice tak již musely projít fází se zvýšenými hladinami estradiolu, které mohly ovlivnit jejich konečnou délku těla. Bylo by zajímavé otestovat, jaké by dosahovaly samice velikosti, kdyby započaly s rozmnožením v rozdílném věkovém rozestupu, při různé velikosti těla a při jaké velikosti už nemá načasování reprodukce na jejich SVL vliv. Tento experiment je u *P. picta* relativně lehce proveditelný, protože druh dospívá v nízkém věku a sociální izolaci se dá manipulovat s nástupem do reprodukce. Dala by se určit investice do reprodukce či hormonální kontroly růstu pomocí estrogenů. Z mých pozorování lze částečně vyvodit, že by měla konečná délka těla samic korelovat s jejich vstupem do aktivní reprodukce.

Výše uvedená pozorování jsou v souladu s hypotézou, že zvýšená hladina estradiolu nebo jiného ovariálního hormonu negativně ovlivnila proliferační aktivitu růstové ploténky, která umožňuje růst kosti do délky, a samice proto za stejný časový úsek dorostly menší konečné délky těla než samci (Obr. 8, 16, 9 a 17). Má studie je korelativní povahy a nemůže tedy prokázat, že skutečně estradiol a ne jiný ovariální hormon zastavuje růst samic. Avšak ovariální hormony produkované zralou gonádou v období aktivní reprodukce prokazatelně

omezují proliferační aktivitu růstové ploténky dlouhých kostí a potažmo i obratlů, jejichž pohlavně dimorfní růst se na SSD tohoto gekona nejvíce podílí (Vohralík 2016). V pokusech Weise a kol. (2001) a Nilsson a kol. (2014) podáváním estradiolu ovariektomizovaným samicím králíků zjistili, že u nich tento hormon působí na proliferační aktivitu chondrocytů v proliferační zóně a na velikost chondrocytů v klidové zóně. Obecně je počet dělení chondrocytů v proliferační zóně omezen a jeho vyčerpáním dochází k rychlému uzavírání plotének. Estradiol podle navrženého modelu Weise a kol. (2001) ještě více redukuje kapacitu dělení chondrocytů, patrně urychlením zkracování telomer. Oproti kontrolám tak došlo k uzavření růstové ploténky dříve, ale ne okamžitě po podání estradiolu. Tento navržený mechanismus je odlišný od závěrů mé studie, protože doba aktivity femorálních plotének byla u obou pohlaví zkoumaného gekona stejná. Zatímco u králíku estradiol snižuje počet dělení v proliferační zóně plotének, u *P. picta* estradiol (nebo jiné ovariální hormony) patrně snižují frekvenci těchto dělení. To by také mohlo vysvětlit, proč v předchozím pracích Starostová a kol. (2013) a Kubička a kol. (2017) ovariektomizované samice *P. picta* (bez zdroje ovariálních hormonů) mohly vyrůst stejně jako samci. Nejspíše to umožnila životnost růstové ploténky, která je u obou pohlaví aktivní po stejně dlouhou dobu a jejíž proliferační aktivita nebyla hladinami ovariálních hormonů omezena. K rozdílnému růstu mezi pohlavími stačil jako zdroj gonadálních steroidů pouze jeden vaječník, který je pro zachování přirozených hormonálních cyklů dostatečný (Kubička a kol. 2017). Z výše uvedeného je proto zřejmé, že pohlavně dimorfní růst kostí je u gekona *P. picta* řízen ovariálními hormony a samci jsou v tomto ohledu spíše neutrální pohlaví.

7.3. Enchondrální osifikace distální epifýzy femuru

Enchondrální osifikace epifýzy probíhala kontinuálně (Obr. 25). Pohlaví se nelišilo v průběhu osifikace v závislosti na věku (Obr. 25) a ani na SVL (Obr. 26). Kompletní osifikace epifýzy proběhla ještě ve věku do 180. dne, kdy růst není dimorfní a nezávisle na této události zůstala zachována růstová ploténka. Samci před 180. dnem měli oproti samicím mírně zvýšené hladiny testosteronu, které však na průběh enchondrální osifikace epifýzy neměly vliv. V pracích Fabrezi a kol. (2007) a Jerez a Tarazona (2009) sledovali u šupinatých plazů ontogenezi růstu končetin a zjistili, že ke kompletní osifikaci epifýzy také dochází ještě před dosažením pohlavní zralosti. U lidí probíhá enchondrální osifikace epifýzy také v prepubertálním věku, kdy se ještě mezi sebou chlapi a dívky neliší. V pubertě růst pokračuje pouze pomocí růstových plotének, které se po ukončení puberty uzavřou (Grave a Brown 1976; Roche 1986).

8. Závěr

Proximální mechanismy růstu a pohlavního dimorfismu ve velikosti těla (SSD) u šupinatých plazů nejsou zcela dostatečně prozkoumány. Pro studium ontogeneze pohlavně dimorfního růstu kostí jsem použil gekona *Paroedura picta*, jehož samci jsou větší než samice, a který má mezi gekony nejlépe prozkoumané proximální mechanismy SSD. Zjistil jsem, že u obou pohlaví dochází k uzavírání femorálních růstových plotének, které umožňují růst kosti do délky, což potvrzuje, že *P. picta* má ukončený růst. Femorální růstové ploténky se u obou pohlaví uzavíraly náhle ve stejném věku, přičemž u proximální ploténky k tomu docházelo v nižším věku než u distální ploténky. Samicím se však růstové ploténky uzavíraly při menší délce těla než samcům. Protože investice do rozmnožování nemá na růst či konečnou délku těla samic tohoto druhu vliv, ke zpomalení jejich růstu pravděpodobně došlo až působením zvýšených hladin estradiolu (či jiného ovariálního hormonu) produkovaného reprodukčně aktivní gonádou. Pozorování jsou v souladu s hypotézou, že estradiol patrně snižuje frekvenci dělení chondrocytů v proliferační zóně růstové ploténky a tím zpomaluje růst samic oproti samcům. Pohlavně specifické hladiny hormonů ale nemají na uzavírání růstových plotének žádný vliv. Bude však zapotřebí manipulativních experimentů k potvrzení této kauzality. Enchondrální osifikace distální epifýzy femuru není ovlivněna pohlavními hormony, protože tento proces probíhal shodně u obou pohlaví v období nedimorfní fáze růstu. Po osifikaci epifýzy zůstala zachována růstová ploténka a tím i možnost růstu kosti do délky. Lze tedy shrnout, že pohlavně dimorfní růst kostí je u gekona *P. picta* řízen zvýšenými hladinami ovariálních hormonů produkovanými vaječníky v období aktivní reprodukce, které zpomalují proliferační aktivitu růstových plotének a že samci jsou v tomto ohledu spíše neutrální pohlaví.

9. Zdroje

- Abouheif, E., & Fairbairn, D. J. (1997). A comparative analysis of allometry for sexual size dimorphism: assessing Rensch's rule. *The American Naturalist*, *149*(3), 540–562.
- Badyaev, A. V. (2002). Growing apart: an ontogenetic perspective on the evolution of sexual size dimorphism. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(8), 369–378.
- Bartoniček, J., & Heřt, J. (2004). *Základy klinické anatomie pohybového aparátu*. Maxdorf.
- Bryden, M. M. (1968). Control of growth in two populations of elephant seals. *Nature*, *217*(5134), 1106–1108.
- Castanet, J., Newman, D. G., & Girons, H. S. (1988). Skeletochronological data on the growth, age, and population structure of the tuatara, *Sphenodon punctatus*, on Stephens and Lady Alice Islands, New Zealand. *Herpetologica*, 25–37.
- Clair, R. C. S. (1998). Patterns of growth and sexual size dimorphism in two species of box turtles with environmental sex determination. *Oecologia*, *115*(4), 501–507.
- Cox, R. M. (2006). A test of the reproductive cost hypothesis for sexual size dimorphism in Yarrow's spiny lizard *Sceloporus jarrovii*. *The Journal of Animal Ecology*, *75*(6), 1361–1369.
- Cox, R. M., Stenquist, D. S., & Calsbeek, R. (2009). Testosterone, growth and the evolution of sexual size dimorphism. *Journal of evolutionary biology*, *22*(8), 1586–1598.
- Cox, Robert M., Butler, M. A., & John-Alder, H. B. (2007). The evolution of sexual size dimorphism in reptiles. *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*, 38–49.
- Cox, Robert M., & John-Alder, H. B. (2005). Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *Journal of Experimental Biology*, *208*(24), 4679–4687.

- Cox, Robert M., Skelly, S. L., & John-Alder, H. B. (2005). Testosterone inhibits growth in juvenile male eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*): implications for energy allocation and sexual size dimorphism. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4), 531–545.
- Cutler, G. B. (1997). The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3), 141–144.
- Čihák, R. (2001). *Anatomie I*. Praha: Grada Publishing, a.s.
- de Buffrénil, V., Ineich, I., & Böhme, W. (2005). Comparative data on epiphyseal development in the family Varanidae. *Journal of Herpetology*, 39(2), 328–335.
- Dixon, J. R., & Kroll, J. C. (1974). Resurrection of the generic name *Paroedura* for the phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia*, 24–30.
- Dunham, A. E., Tinkle, D. W., & Gibbons, J. W. (1978). Body Size in Island Lizards: A Cautionary Tale. *Ecology*, 59(6), 1230–1238.
- Fabrezi, M., Abdala, V., & Oliver, M. I. M. (2007). Developmental basis of limb homology in lizards. *The Anatomical Record*, 290(7), 900–912.
- Fairbairn, D. J. (1997). Allometry for sexual size dimorphism: Pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1), 659–687.
- Fairbairn, Daphne J. (2013). *Odd couples: extraordinary differences between the sexes in the animal kingdom*. Princeton University Press.
- Fairbairn, Daphne J., Blanckenhorn, W. U., & Székely, T. (2007). *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford University Press.
- Frýdlová, P., Nutilová, V., Dudák, J., Žemlička, J., Němec, P., Velenský, P., Jirásek, T., & Frynta, D. (2017). Patterns of growth in monitor lizards (Varanidae) as revealed by computed tomography of femoral growth plates. *Zoomorphology*, 136(1), 95–106.

- Frynta, D., Frýdlová, P., Hnízdo, J., Šimková, O., Cikánová, V., & Velenský, P. (2010). Ontogeny of Sexual Size Dimorphism in Monitor Lizards: Males Grow for a Longer Period, but not at a Faster Rate. *Zoological Science*, 27(12), 917–923.
- Frynta, D., Vejvodová, T., & Šimková, O. (2016). Sex allocation and secondary sex ratio in Cuban boa (*Chilabothrus angulifer*): mother's body size affects the ratio between sons and daughters. *The Science of Nature*, 103(5–6), 48.
- Fukuda, S., & Matsuoka, O. (1979). Maturation Process of Secondary Ossification Centers in the Rat and Assessment of Bone Age. *Experimental Animals*, 28(1), 1–9.
- Gardner, E. D. (1963). The Development and Growth of Bones and Joints. *JBJS*, 45(4), 856–862.
- Geiger, M., Forasiepi, A. M., Koyabu, D., & Sánchez-Villagra, M. R. (2014). Heterochrony and post-natal growth in mammals – an examination of growth plates in limbs. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(1), 98–115.
- Grave, K. C., & Brown, T. (1976). Skeletal ossification and the adolescent growth spurt. *American journal of orthodontics*, 69(6), 611–619.
- Chagin, A., Lindberg, M., Andersson, N., Moverare, S., Gustafsson, J.-Å., Sävendahl, L., & Ohlsson, C. (2004). Estrogen Receptor- β Inhibits Skeletal Growth and Has the Capacity to Mediate Growth Plate Fusion in Female Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(1), 72–77.
- Charnov, E. L., Turner, T. F., & Winemiller, K. O. (2001). Reproductive constraints and the evolution of life histories with indeterminate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9460–9464.
- Jerez, A., & Tarazona, O. A. (2009). Appendicular skeleton in *Bachia bicolor* (Squamata: Gymnophthalmidae): osteology, limb reduction and postnatal skeletal ontogeny. *Acta Zoologica*, 90(1), 42–50.

- Jirků, H. (2007). Ontogeneze pohlavního dimorfismu ve velikosti a tvaru těla a sexuální chování gekona *Paroedura picta*. *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta*.
- Klein, N., Scheyer, T., & Tütken, T. (2009). Skeletochronology and isotopic analysis of a captive individual of *Alligator mississippiensis* Daudin, 1802. *Fossil Record*, 12(2), 121–131.
- Kratochvíl, L., & Frynta, D. (2002). Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 76(2), 303–314.
- Kratochvíl, L., & Kubička, L. (2007). Why reduce clutch size to one or two eggs? Reproductive allometries reveal different evolutionary causes of invariant clutch size in lizards. *Functional ecology*, 21(1), 171–177.
- Kratochvíl, L., Kubička, L., & Landová, E. (2006). Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Canadian Journal of Zoology*, 84(11), 1683–1687.
- Kubička, L., Golinski, A., John-Alder, H., & Kratochvíl, L. (2013). Ontogeny of pronounced female-biased sexual size dimorphism in the Malaysian cat gecko (*Aeluroscalabotes felinus*: Squamata: Eublepharidae): A test of the role of testosterone in growth regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 188, 183–188.
- Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2009). First grow, then breed and finally get fat: hierarchical allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional ecology*, 23(3), 595–601.
- Kubička, L., Schořálková, T., Červenka, J., & Kratochvíl, L. (2017). Ovarian control of growth and sexual size dimorphism in a male-larger gecko. *Journal of Experimental Biology*, 220(5), 787–795.

- Kubička, L., Starostová, Z., & Kratochvíl, L. (2012). Temperature-dependent rate of clutch production in a tropical lizard (*Paroedura picta*: Gekkonidae): Intraspecific test of the metabolic theory of ecology. *Journal of Thermal Biology*, 37(3), 179–184.
- Kubička, L., Starostová, Z., & Kratochvíl, L. (2015). Endogenous control of sexual size dimorphism: Gonadal androgens have neither direct nor indirect effect on male growth in a Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*). *General and Comparative Endocrinology*, 224, 273–277.
- Kupfer, A. (2009). Sexual size dimorphism in caecilian amphibians: analysis, review and directions for future research. *Zoology*, 112(5), 362–369.
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(1), 46–62.
- Magrath, M. J. L., Brouwer, L., & Komdeur, J. (2003). Egg size and laying order in relation to offspring sex in the extreme sexually size dimorphic brown songlark, *Cinclorhamphus cruralis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(3), 240–248.
- Marler, C. A., Walsberg, G., White, M. L., Moore, M., & Marler, C. A. (1995). Increased energy expenditure due to increased territorial defense in male lizards after phenotypic manipulation. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 37(4), 225–231.
- McGuire, W. L. (1978). Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Seminars in Oncology*, 5(4), 428–433.
- Myhrvold, N. P. (2013). Revisiting the estimation of dinosaur growth rates. *PloS one*, 8(12), e81917.
- Nagy, K. A. (2005). Field metabolic rate and body size. *Journal of Experimental Biology*, 208(9), 1621–1625.

- Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M., & Baron, J. (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone research in paediatrics*, 64(4), 157–165.
- Nilsson, O., Weise, M., Landman, E. B., Meyers, J. L., Barnes, K. M., & Baron, J. (2014). Evidence that estrogen hastens epiphyseal fusion and cessation of longitudinal bone growth by irreversibly depleting the number of resting zone progenitor cells in female rabbits. *Endocrinology*, 155(8), 2892–2899.
- Norris, D. O. (2007). *Vertebrate endocrinology*. Academic Press.
- Olsent, P. D., & Cockburn, A. (2004). Female-biased sex allocation in peregrine falcons and other raptors. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 28(6), 417–423.
- Oosterbaan, R. J. (2013). *SegReg software*. Získáno z <https://www.waterlog.info/segreg.htm>
- Perron, A. D., Miller, M. D., & Brady, W. J. (2002). Orthopedic pitfalls in the ED: Pediatric growth plate injuries. *The American Journal of Emergency Medicine*, 20(1), 50–54.
- Raimann, A., Javanmardi, A., Egerbacher, M., & Haeusler, G. (2017). A journey through growth plates: tracking differences in morphology and regulation between the spine and the long bones in a pig model. *The Spine Journal*.
- Ricklefs, R. E. (1968). Patterns of growth in birds. *Ibis*, 110(4), 419–451.
- Rijk, J. C. W., Bovee, T. F. H., Groot, M. J., Peijnenburg, A. a. C. M., & Nielen, M. W. F. (2008). Evidence of the indirect hormonal activity of prohormones using liver S9 metabolic bioactivation and an androgen bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3), 417–425.
- Roche, A. F. (1986). Bone Growth and Maturation. In *Postnatal Growth Neurobiology* (s. 25–60). Springer, Boston, MA.
- Röll, B. (2000). Gecko vision—visual cells, evolution, and ecological constraints. *Journal of neurocytology*, 29(7), 471–484.

- Sanger, T. J., Seav, S. M., Tokita, M., Langerhans, R. B., Ross, L. M., Losos, J. B., & Abzhanov, A. (2014). The oestrogen pathway underlies the evolution of exaggerated male cranial shapes in *Anolis* lizards. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *281*(1784), 20140329.
- Serrat, M. A., Reno, P. L., McCollum, M. A., Meindl, R. S., & Lovejoy, C. O. (2007). Variation in mammalian proximal femoral development: comparative analysis of two distinct ossification patterns. *Journal of Anatomy*, *210*(3), 249–258.
- Setchell, J. M., Lee, P. C., Wickings, E. J., & Dixon, A. F. (2001). Growth and ontogeny of sexual size dimorphism in the mandrill (*Mandrillus sphinx*). *American Journal of Physical Anthropology*, *115*(4), 349–360.
- Shine, R. (1990). Proximate determinants of sexual differences in adult body size. *The American Naturalist*, *135*(2), 278–283.
- Shine, R., & Charnov, E. L. (1992). Patterns of survival, growth, and maturation in snakes and lizards. *The American Naturalist*, *139*(6), 1257–1269.
- Shohoji, T., & Sasaki, H. (1987). An aspect of growth analysis of weight in savannah baboon. II. Gender comparison by adjusting age. *Growth*, *51*(4), 425–431.
- Schenk, R. K., & Hunziker, E. B. (1991). Growth plate: histophysiology, cell and matrix turnover. *Rickets*, *21*.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671–675.
- Schönecker, P. (2008). *Geckos of Madagascar, the Seychelles, Comoros and Mascarene Islands*. ACS Glaser.
- Schwarzkopf, L. (1993). Costs of Reproduction in Water Skinks. *Ecology*, *74*(7), 1970–1981.
- Stamps, J. A. (1993). Sexual size dimorphism in species with asymptotic growth after maturity. *Biological Journal of the Linnean Society*, *50*(2), 123–145.

- Stamps, J., & Tanaka, S. (1981). The Influence of Food and Water on Growth Rates in a Tropical Lizard (*Anolis Aeneus*). *Ecology*, 62(1), 33–40.
- Starostova, Z., Angilletta, M. J., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2012). Thermal dependence of reproductive allocation in a tropical lizard. *Journal of Thermal Biology*, 37(3), 159–163.
- Starostová, Z., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2010). Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of evolutionary biology*, 23(4), 670–677.
- Starostová, Zuzana, Kubička, L., Golinski, A., & Kratochvíl, L. (2013). Neither male gonadal androgens nor female reproductive costs drive development of sexual size dimorphism in lizards. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1872–1880.
- Statsoft. (2016). Statistická analýza dat - Data mining - Prediktivní modelování - Credit Scoring - Fraud detection - SPC. Získáno 13. srpen 2017, z <http://www.statsoft.cz/>
- Šmahel, Z. (2001). *Principy, teorie a metody auxologie*. V Praze: Karolinum.
- Taylor, W. R., & Van Dyke, G. C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9(2), 107–119.
- Tinkle, D. W., Wilbur, H. M., & Tilley, S. G. (1970). Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution*, 24(1), 55–74.
- Torres, R., & Drummond, H. (1999). Variably male-biased sex ratio in a marine bird with females larger than males. *Oecologia*, 118(1), 16–22.
- Twigg, G. I. (1965). Studies on *Holochilus sciureus berbicensis*, a cricetine rodent from the coastal region of British Guiana. *Journal of Zoology*, 145(2), 263–283.
- Uetz, P., Hošek, J., & Hallermann, J. (2014). *The reptile database*.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic Press.

- Vohralík, M. (2016). Variabilita v počtu obratlů a evoluce velikosti těla gekonů. *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta.*
- Weise, M., De-Levi, S., Barnes, K. M., Gafni, R. I., Abad, V., & Baron, J. (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(12), 6871–6876.
- White, A., & Wallis, G. (2001). Endochondral ossification: A delicate balance between growth and mineralisation. *Current Biology, 11*(15), 589-R591.
- Woodward, H. N., Horner, J. R., & Farlow, J. O. (2011). Osteohistological evidence for determinate growth in the american alligator. *Journal of Herpetology, 45*(3), 339–342.
- Zoetis, T., Tassinari, M. S., Bagi, C., Walthall, K., & Hurtt, M. E. (2003). Species comparison of postnatal bone growth and development. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 68*(2), 86–110.