

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Bakalářská práce

**Histologické a histochemické metody při studiu vývoje samčích
pohlavních orgánů**

Martina Vávrová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ivan Gelbič, CSc.

Datum odevzdání: 14. 5. 2008

Histological and histochemical methods used in study of development of internal male sex organs

ABSTRAKT

Presented thesis devotes to comparative study of usability of fixation agents and colouring methods for the study of histology and histochemistry of *Culex pipiens* s.l. mosquito males.

The study was carried out in males of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, which is a significant transmitter of filariasis. Histological and histochemistry studies of the structure of the whole abdomens or prepared testicles were carried out on the material fixed by fixation agents Carnoy and Bouin of Dubosque-Brasil modification. Fixed tissue was cast in paraplast or resin. Histological sections were done by means of automatic microtome Leica and half-thin sections by means of ultra microtone Reichert. Section preparations were coloured by Mayer or Harris haematoxylin or by colouring method according to Mallory. Semi-thin sections from materials cast in resin were coloured by toluidine blue.

Fixation agent Bouin, Dubosque-Brasil modification proved as more convenient than Carnoy, either for the preparation of paraffin sections or for fabrication of half-thin sections from tissues cast in resin. The next advantage of this fixation is that fixed tissue can be stored for unlimited period of time without over fixation of the tissue as it is in the case of fixation by Carnoy.

For general histological preparations Mallory colouring is apparently the most convenient from the used methods; it provides better orientation in coloured tissue thanks to the whole spectrum of colours-pink to red colouring of cell nuclei, blue colouring of tissue and secretions. In case of colouring of male genital organs all used colourings (Mallory, Harris and Mayer haematoxylin) seem to be comparable.

Casting in resin with connection to colouring by toluidine blue (also histochemistry proof for carbohydrates) has shown to be suitable for visualisation of finer structures, in male genital organs particular developmental phases of male sex cells were distinguished.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Histologické a histochemické metody při studiu vývoje samčích pohlavních orgánů“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené úpravě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích.....

podpis studenta

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi, CSc. za udělené rady a taktéž za čas, který mi věnoval při vedení bakalářské práce.

OBSAH:

1. Současný stav

1.1. Komáři jako přenašeči chorob

1.1.1. Komárovití

1.1.2. Infekce přenášené komáry

1.2. Techniky využívané při studiu

1.2.1. Fixace

1.2.2. Vypírání po fixaci

1.2.3. Zalévání

1.2.4. Krájení

1.2.5. Barvení

1.2.6. Montování řezů

1.2.7. Histochemie a histochemické metody

2. Cíle práce a hypotézy

3. Metodika

3.1. Metodika chovu

3.2. Příprava materiálu pro histologické studie

3.2.1. Pítky

3.2.2. Fixace

3.2.3. Odvodnění (převádění) a zalití do paraplastu nebo do pryskyřice

3.2.4. Příprava řezových preparátů

3.2.5. Odparafinování

3.2.6. Barvení

3.2.7. Montování

3.2.8. Prohlížení pod mikroskopem

4. Výsledky

5. Diskuse

6. Závěr

7. Seznam použité literatury

8. Klíčová slova

ÚVOD

V poslední době jsme svědky neustálého se zvyšování teploty, což má za následek i změny v druhovém složení krev sajícího hmyzu. Výskyt nových druhů sebou přináší i rizika v podobě nových, dříve se nevyskytujících onemocnění.

Jedním z takovýchto druhů hmyzu jsou právě komáři, kteří ve světě patří k velmi významným vektorům určitých nemocí, mezi kterými je možno jmenovat malárii, žlutou zimnici, filariózy a celou řadu dalších chorob.

Komáři nejsou tedy jen obtížným hmyzem, ale i hmyzem, který může člověka ohrožovat jak na zdraví, tak i na životě. Jejich nebezpečí tkví právě v tom, že mohou sát krev na infikovaných subjektech a tyto infekce pak dále přenášet.

Práce je zaměřená na obsáhnutí celé řady histologických technik, z nichž pak vybrané budou posuzovány v praxi podle jejich vhodnosti pro studium pohlavního ústrojí komárů, respektive pro jednotlivé tkáně.

Výsledky by mohly přispět k následnému selektivnějšímu výběru vhodných histologických technik při studiu komárů.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1. Komáři jako přenašeči chorob

1.1.1. Komárovití

Čeď komárovití (*Culicidae*, *Nematocera*, *Diptera*) patří mezi obtížný hmyz právě tím, že řada z nich saje krev zvířat i člověka. Patří sem přenašeči různých nemocí, jako je malárie, dengue, žlutá zimnice a cela řada dalších virových onemocnění. Základním morfologickým znakem dvoukřídlých je přítomnost jen jednoho (předního) páru křídel, zadní pár je přeměněn v tzv. haltery – kyvadélka, pomocí nichž je udržována rovnováha za letu (**Langrová et al., 2005**).

Komárovití mají ústní bodavě-savé ústrojí, které slouží k sání krve (samice) nebo rostlinných šťáv (samci i samice). Bodavé stiletý jsou v klidu uloženy v dlouhém a žlábkovitém dolním pysku a jejich délka závisí na charakteru potravy. U krevsajících samic jsou dlouhé a ostré a slouží současně k nabodnutí kůže i k sání krve, krátké bodce samců dovolují nanejvýš sání nektaru (**Macek, 2001**).

Vývoj komárů, zejména larev, je většinou úzce spojen s vodním prostředím. Samička klade vajíčka do blízkosti vodního prostředí (např. komáři rodu *Aedes*), nebo přímo do vody (komáři rodu *Culex*) (**Langrová et al., 2005**).

Dospělci líhnoucí se z kulek se živí nektarem a samičky u anautogéních druhů sají krev již v prvním gonotrofním cyklu. Samičky autogéních druhů kladou vajíčka prvního cyklu bez sání krve. Samičky krevsajících druhů potřebují krev pro dokončení vývoje vajíček, teprve po jejím nasátí kladou vajíčka. Zástupci některých čeledí (např. čel. *Culicidae*, *Chironomidae* apod.) v období páření vytváří početné roje shlukující i tisíce dospělců (**Langrová et al., 2005**).

Kutikula komárů je nepropustná pro vodu, znemožňuje smáčení těla, ale také odpařování vody z nitra těla. Má na svém vnějším povrchu výrůstky, ke kterým se upínají svaly. Svaly jsou vesměs příčně pruhované, cévní systém je jako u ostatního hmyzu otevřený. Dýchacím ústrojím jsou tracheje, rourovité útvary, opatřené uvnitř spirálovitou intimou, které jsou zaživa vyplněny vzduchem (**Kramář, 1958**).

Rozmnožovacím ústrojím u hmyzu jsou párové pohlavní orgány (gonády) s párovými vývody splývajícími v nepárovou pohlavní trubici ústící vně pohlavním otvorem (gonoporem). Pohlavními orgány u samců jsou varlata (testes) složená z folikulů pohlavních vývodů (vasa deferentia) spojených do společného chámovodu (ductus ejaculatorius), do něhož ústí i přídatné (akcesorické) žlázy. Rozšířená část chámovodu (vesicula seminalis) slouží k nahromadění spermatu. Přídatné žlázy vylučují sekret sloužící k výživě a přenosu spermií a nebo k tvorbě tzv. spermatoforů vyskytujících se např. u motýlů (**Macek, 2001**).

1.1.2. Infekce přenášené komáry

Mezi infekce přenášené komáry patří především arbovirové encefalidity (východní a západní koňská, japonská, saintlouiská, kalifornská apod.), arbovirové hemoragické horečky (Rift Valley, west Nile, bunyamvera, oropouche), dengue, žlutá zimnice, Chikungunya, valtická horečka, filariózy, leishmanióza kožní, malárie, tularémie a trypanozomiáza africká (spavá nemoc) (**Göpfertová et al., 2006**).

Další choroby přenášené komáry jsou Murray Valley encefalitida (**Husa et al., 2006**), O nyong-nyong, Ross River (způsobené arboviry rodu *Togaviridae*), La Crosse encefalidity (způsobené arboviry rodu *Bunyaviridae*) (**Lobovská, 2001**).

1.1.2.1 Japonská encefalitida, východní a západní koňská, kalifornská aj.

Tato onemocnění jsou vyvolávána infekcemi ze skupin alfavirů, bunyavirů a flavivirů. Jsou to akutní infekce krátkého trvání, většinou probíhají inaparentně nebo mírně. Přenáší se bodnutím infikovaného komára (různé druhy). Japonská encefalitida se vyskytuje sporadicky i v epidemiích, spíše sezónně v mnoha oblastech Asie, od Indie přes Koreu, Indonésii, Čínu, až po Japonsko. Západní a východní koňské encefalidity se vyskytují v USA a v Kanadě a některých oblastech Jižní a Střední Ameriky (**Göpfertová et al., 2006**).

1.1.2.2. Dengue

Je akutní horečnaté onemocnění způsobené flaviviry (**Bartošová et al., 2005**). Častý je dvoufázový průběh (**Göpfertová et al., 2006**). Vysoká horečka, bolesti v kostech, kloubech a svalech jsou charakteristické na počátku onemocnění. Druhá fáze se objevuje s horečkou a vyrážkou na kůži, která postihuje většinu těla (**Husa et al., 2006**). Tato nemoc je častá zejména v tropech a subtropích, její výskyt se v posledních dvaceti letech dramaticky zhoršuje. Nejvyšší výskyt je v karibské oblasti, v jihovýchodní Asii, Indii a Pacifiku, ale v posledních letech bylo hlášeno např. i několik importovaných případů do ČR. Zdrojem je člověk, případně některé druhy opic (**Göpfertová et al., 2006**). Onemocnění se přenáší komáry, především *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* (v posledních letech se šíří po Evropě, pravděpodobně v důsledku klimatických změn), *Ae. sculletaris* (**Husa et al., 2006**).

1.1.2.3. West Nile

Nákaza tímto virem probíhá často velmi lehce, nebo asymptomaticky, jen u 1% infikovaných může vyvolat vážné encefalitidy. Původcem onemocnění je West Nile virus, patřící mezi flaviviry. Nejvýznamnějším rezervoárem infekce jsou ptáci. Přenos probíhá zpravidla bodnutím ornitofilního infikovaného komára rodu *Culex*, výjimečně transfuzí, transplantací nebo vertikálně z matky na dítě. Onemocnění se celá desetiletí vyskytovalo endemicky s časným vzplanutím v epidemiích pouze v Africe a v zemích Středního východu. Později se vyskytlo v Rumunsku, Rusku a ve Středozeří. V roce 1999 se náhle rozšířilo na západní polokouli, zejména do mnoha států USA (**Göpfertová et al., 2006**).

1.1.2.4. Filarióza

Filarióza je zánětlivé onemocnění, které postihuje lymfatický systém. Může vzniknout dokonce až i několik let po návratu z tropických a subtropických oblastí.

Filarie jsou velmi tenčí červi, kteří žijí v lymfatických cestách. Oplozené samičky rodí živé larvy, ty jsou nasáty přenašečem (komáři, ovádi, muchničky), ve kterém dozrávají v infekční larvy, jež jsou bodnutím vpraveny do dalšího hostitele.

Klinické příznaky jsou úměrné rozsahu postižení lymfatického systému. Akutní fázi doprovází horečka, zánět lymfatických cest vede k jejich varixům, které mohou praskat. Chronický proces vede k elefantiáze končetin apod. **(Lobovská, 2001)**

1.1.2.5. Malárie

Je charakterizována třesavkou, zimnicí, horečkou, pocením s následnou apyretickou fází, často se projevují průjmy, rozvíjí se anémie a splenomegalie **(Göpfertová et al., 2006)**. Původcem infekce je prvok *Plasmodium*, který má čtyři druhy (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* a *P. malariae*) **(Podstatová, 2001)**. Nejtěžší formu onemocnění vyvolává *Plasmodium falciparum*. Rozvíjejí se příznaky jaterního a ledvinného selhání, encefalopatie, mozkový edém až kóma, může dojít i ke smrti (více než 10% případů). Ostatní plasmodia vyvolávají lehčí formu většinou neohrožující život pacienta **(Göpfertová et al., 2006)**. Malárie se může přenášet přirozeně bodnutím infikovaného komára rodu *Anopheles*, nebo přímo z krve infikovaného člověka **(Husa et al., 2006)**. Onemocnění se vyskytuje především v tropických oblastech Afriky, Asie, Střední a Jižní Ameriky. Infikování komáři se mohou dostat s leteckou dopravou i do mírného pásma, byly popsány případy onemocnění u lidí v okolí letišť (letištní malárie). V našich podmínkách jsou hlášena importovaná onemocnění většinou u turistů, kteří pobývali ve výše uvedených oblastech **(Göpfertová et al., 2006)**.

Navzdory celosvětové eradikační kampani představuje malárie jeden z největších zdravotnických problémů v tropických oblastech. Jedním z pokusů o eradikaci je přerušení životního cyklu samičky komára rodu *Anopheles*. Ročně je zaznamenáno 300 až 500 miliónů klinických případů a až 1 až 3 milióny lidí ročně na malárii zemře **(Bartošová et al., 2005)**.

1.1.2.6. Žlutá zimnice

Žlutá zimnice je akutní onemocnění různé závažnosti, způsobené flavivirem. Vyskytuje v tropických oblastech Ameriky a Afriky, ale také v Karibiku, USA a jižní Evropě. Onemocnění je přenášeno komárem rodu *Aedes aegypti*, který předtím sál na infikovaném jedinci **(Bartošová et al., 2005)**, virus na člověka přenášejí pouze samičky

komárů (**Göpfertová et al., 2006**). Částečná eradikace tohoto druhu komárů vedla ke snížení epidemického výskytu zimnice. Vektorem v Africe mezi opicemi může být i *Ae. Africanus* a *Ae. simpsoni*. Opice se pak stávají zdrojem aktivního přenosu viru (**Bartošová et al., 2005**).

Žlutá zimnice probíhá ve 2 stadiích. První stádium se rozvíjí náhle, objevuje se vysoká horečka, třesavka, nauzea, zvracení, bolesti v zádech. Typickým příznakem je bradykardie v prvních dnech horečky (Fagetovo znamení). Druhé stádium nastupuje po přechodném poklesu teploty, dochází ke krvácení do trávicího traktu, kůže, dutiny ústní. V této fázi se objevují příznaky z poškození jater, objevuje se ikterus. (**Göpfertová et al., 2006**).

Existují dvě formy žluté zimnice: městská, kdy je přenos z člověka infikovaného komárem na neimunního jedince atd. a džunglová, lesní forma, která je typicky přírodní, s ohniskovou infekcí (**Lobovská, 2001**).

1.2. Techniky využívané při studiu

1.2.1 Fixace

Fixace slouží k rychlému usmrcení buněk a tkání (**Jelínek et al., 2007**). Jejím účelem je zachovat strukturu buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, jaký mají za živa (**Maňáková a Seichertová, 2002**); zastavení procesu autolýzy (**Čech et al., 1998; Sládek, 2000; Čech a Horký, 2005**). Fixační proces je vlastně denaturace buněčných a tkáňových proteinů, spojená s jejich vysrážením. Denaturací bílkoviny ztrácejí enzymovou a hormonální aktivitu, mění se jejich rozpustnost a často i jejich fyzikálně chemické vlastnosti (**Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005**). Fixačními prostředky se způsobí na struktuře buňky relativně menší změny, než jsou vyvolávány posmrtnými pochody (**Sládek, 2000**).

Jsou užívány různé fixační tekutiny a jejich volba se přizpůsobuje sledovaným záměrům, protože ne všechny fixační látky jsou vhodné pro fixaci všech tkáňových komponent (**Jelínek et al., 2007**).

Čech et al. (1998), Maňáková a Seichertová (2002), Čech a Horký (2005), Jelínek et al. (2007) dělí fixační metody na fyzikální a chemické.

Fyzikální fixační prostředky jsou fixace suchým teplem nebo varem, lyofilizace (freeze drying, vysoušení za nízké teploty) a mrazová substituce. Lyofilizace a mrazová substituce denaturuje proteiny pouze v omezené míře a ty si zachovávají antigenní vlastnosti (**Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005**). **Maňáková a Seichertová (2002)** vyzdvihují metodu fixace pomocí mikrovlnné trouby (MW-fixace), jejím principem je povaření ve fyziologickém roztoku (vhodné pouze pro světelnou mikroskopii) nebo v chemickém fixativu.

Pro chemickou fixaci se používají: aldehydy (například formaldehyd, glutaraldehyd), alkoholy (ethanol, methanol), kyseliny (kyselina octová, trichloroctová, pikrová), soli těžkých kovů (HgCl_2 , oxid osmičelý, dvojchroman draselný) (**Maňáková a Seichertová, 2002**).

Mezi hlavní faktory ovlivňující výsledek fixace patří zejména pH, teplota, schopnost penetrace fixačního činidla, osmolalita (tlak osmoticky aktivních látek), koncentrace a doba trvání fixace (**Bancroft a Stevens, 1996**).

1.2.1.1. Formaldehyd, formol a fixační směsi s nimi

Formaldehyd je často využívaný fixační prostředek (**Čech et al., 1998**), uchovává zejména dobře proteiny a lipidy, nikoliv sacharidy (**Čech a Horký, 2005**). Bohužel jeho páry jsou silně agresivní a dráždí všechny sliznice a roztoky formaldehydu působí dráždivě na kůži (**Čech et al., 1998**). Formaldehyd při delším stání, hlavně na světle, částečně oxiduje v ethanol a kyselinu mravenčí, které ho znehodnocují. Kyselinu mravenčí lze z formaldehydu odstranit práškovým uhličitánem vápenatým (**Čech a Horký 2005**). Formaldehyd fixuje i větší objekty do hloubky (**Lelláková et al., 1992**). Formaldehyd či jiné podobné fixační tekutiny se využívají při studiu tuků a tukovitých látek (**Jelínek et al., 2007**). Používá se samotný, tak i ve směsích. Prodáváný roztok je 35-40%, bývá znám pod názvem formalin (**Bancroft a Stevens, 1996**).

Formalín je dnes jednou z nejvíce užívaných fixačních tekutin (**Vacek, 1995**). Formol je dobrý fixační prostředek, vhodný zejména pro přehledné histologické preparáty (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995; Sládek, 2000**), méně vhodný je pro vyšetření cytologická. Rychle proniká, tkáň se po formolu dobře barví, při krátkodobé fixaci nerozpouští tuky, tkáň dobře tvrdí a konzervuje, tkáň se může ponechat ve formolu i delší dobu (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**). Formalin je kromě fixace tuků a lipidů vhodný i pro fixaci nervové tkáně pro stříbření, pro fixaci velkých předmětů, pro plankton. Po fixaci formalinem je vhodné barvení Sudan III pro tuk nebo jinak hematoxylin (**Jírovec, 1958**). Nevýhody formolu jsou v tom, že způsobuje určité zbobtnání tkáně; buňkám dodává sklovitého vzhledu; v krevnatých orgánech (např. slezina) vznikají často po fixaci formolem rezavě hnědě zbarvené „formolové sraženiny“, ty lze však odstranit (**Vacek, 1995**).

Fixačními prostředky s formolem jsou například neutrální formol; slaný formol (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**); brómformol (používá se k fixaci neuroglie); Othova (hodí se pro přehledné preparáty) a Müllerova tekutina (**Vacek, 1995**); Beauchampova fixáž (vhodná pro ploštěnky) (**Lelláková et al., 1992**) a v neposlední řadě i Schafferův formol-alkohol (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**), který se hodí zejména pro celé drobné živočichy, hlavně červy (**Jírovec, 1958; Vacek, 1995**), pro totální preparáty (**Jírovec, 1958**).

1.2.1.2. Etanol a fixační směsi s etanolem

Etanol je čirá, bezbarvá a hořlavá kapalina (**Bancroft a Stevens, 1996**), používá se v systematické zoologii na fixaci a konzervaci suchozemského materiálu v 70% koncentraci. V histologii se používá v 96% až 100% koncentraci, a to buď samostatně nebo jako součást jiných fixačních tekutin. V nižších koncentracích 30-50% je výhodným maceračním prostředkem (**Knoz a Opravilová, 1992**).

Etanol špatně proniká (**Vacek, 1995**), rozpouští lipidy a způsobuje smrštění tkáně (**Vacek, 1995; Čech a Horký, 2005**). Tkáň se ale chemicky nemění, a proto se používá k fixaci pro některé speciální účely, jako např. k průkazu vápníku, železa v neurohistologii, (**Vacek, 1995**), dále například k fixaci hlenu (**Sládek, 2000**). Etanol

fixuje glykogen, ale i jádra, používá se pro totální preparáty hmyzu, po fixaci etanolem se používá jako barvivo pro glykogen Bestův karmín (Jírovec, 1958), jinak Heidenhein, Delafieldův hematoxylin (Jírovec, 1958; Lelláková et al., 1992).

Alkohol-formol-kyselina octová (AAF) je rychle pronikající fixační tekutina, která je zvláště vhodná pro větší fragmenty tkáně. Na přípravu se používá 40% formol, ledová kyselina octová a 96% etanol (Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995).

Alkohol – formaldehyd je výborný pro fixaci vajíček a malé embryony. Jako univerzální fixační prostředek na zoologické objekty - hlavně botanický materiál – se mísí alkohol, formaldehyd, ledová kyselina octová v poměru 60:40:2 (Lelláková et al., 1992).

Na přípravu Carnoyovy fixáže se používá absolutní alkohol, chloroform, koncentrovaná kyselina. Je to jedna z nejlepších fixačních tekutin (Lelláková et al., 1992) a vniká rychle do objektů (Lelláková et al., 1992; Bancroft a Stevens, 1996), hodí se na fixování členovců (Lelláková et al., 1992; Knoz a Opravilová, 1992), na objekty s chitinem, hmyz, pavouky, korýše (Jírovec, 1958), k fixaci tkáně pro průkaz nukleových kyselin a k fixaci pro průkaz glykogenu (Vacek, 1995). Barví se Heidenheinem, Dominicim, hematoxyliny (Jírovec, 1958; Lelláková et al., 1992).

Carnoyho tekutina má různé modifikace – např. Göhreho modifikace Carnoy, která se nejlépe hodí pro objekty s chitinem, hmyz, pavouky, korýše; nebo Newcomerova stálá modifikace Carnoy, která je vhodná pro stejný účel (Jírovec, 1958).

1.2.1.3. Sublimát (chlorid rtuťnatý) a fixační směsi se sublimátem

Sublimát tvoří bílé krystalky rozpustné ve vodě a alkoholu (Knoz a Opravilová, 1992), je jedovatý (Knoz a Opravilová, 1992; Čech a Horký, 2005). Ve směsích se používá nasycený vodný roztok (Knoz a Opravilová, 1992). Sublimát je ve vodném roztoku silným oxidačním prostředkem, který velmi silně sráží bílkoviny. Fixáže obsahující sublimát jsou vhodné pro malé objekty, resp. malé fragmenty tkání (Knoz a Opravilová, 1992). Barvitelnost je po fixážích se sublimátem velmi dobrá (Knoz a Opravilová, 1992; Lelláková et al., 1992). Po fixaci však téměř vždy zůstávají ve tkáni amorfni a krystalické sraženiny černé barvy, které jsou složeny jednak z kovové rtuti, jednak z kalomelu. Je nutné je z preparátů odstranit tzv. jódováním. (Knoz a

Opravilová, 1992). K jódování se používá jódová tinktura nebo Lugolův roztok (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**). Sublimát je využíván pro svou schopnost dobře zachovávat obecnou strukturu cytoplazmy a jádra (**Čech a Horký, 2005; Jelínek et al., 2007**), jádra po fixaci zachovávají svou barvitelnost, metoda se hodí se pro Feulgena a pro fixaci drobných objektů, které jsou zpracovávány pro totální preparáty (**Jírovec, 1958; Lelláková et al., 1992**). Po fixaci je vhodné barvení hematoxyliny, Heidenheinem, Mallorym, Giemsou (**Jírovec, 1958; Lelláková et al., 1992**), Mannova metoda, Azureosin, Feulgen (**Jírovec, 1958**).

Sublimát-alkohol podle Schaudina se používá na některá histologická vyšetření, na fixaci prvků ve tkáních i roztěrech. Na přípravu se používá nasycený vodní roztok sublimátu a 96% etanol (**Knoz a Opravilová, 1992**), podle jiných autorů se přidává ještě kyselina octová (**Lelláková et al., 1992; Vacek, 1995**). Fixace je užívaná i pro některá histochemická vyšetření (Feulgenova reakce, plazmalová reakce) (**Vacek, 1995**). Po této fixaci je vhodné barvení Giemsou, Heidenheinem, Azur-eosinem (**Lelláková et al., 1992; Jírovec, 1958**), Mannovou metodou, metodou podle Malloryho (**Jírovec, 1958**).

Sublimát-Formol-Kyselina octová (tekutina Stieveho) je tekutina, která velmi rychle proniká, hodí se dobře k fixaci i větších kousků tkáně (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**) a pro některé histochemické účely (Feulgenova a plazmalová reakce) (**Vacek, 1995**). Fixace je vhodná pro následné barvení hematoxyliny, Heidenheinem, Malloryho metodou, Mannovou metodou, barvením podle Giemsy, Azureosin, Feulgen (**Jírovec, 1958**).

Fixační směs sublimát-kyselina octová fixuje dobře jádra, je vhodná pro fixaci drobných objektů při zpracování na totální preparáty (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Pro následné barvení jsou vhodné metody: barvení hematoxyliny, Heidenhein, Mallory, Mann, Giemsa, Azureosin, Feulgen (**Jírovec, 1958**).

Zenkerova fixáž fixuje dobře jádro i cytoplazmu (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Přípravu popisují např. (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**). Vhodné jsou barvicí metody Heidenhein, Giemsa, Dominici, hematoxyliny, Mann, Mallory, Feulgen (**Jírovec, 1958**).

Tekutina Hellyho má podobné složení i podobný způsob použití jako Zenkerova tekutina, ale místo ledové kyseliny octové se před použitím přidává neutrální formol. Hodí se zvláště k fixaci krevnatých orgánů (**Vacek, 1995**), fixuje velmi dobře jádra (**Jírovec, 1958; Lelláková et al., 1992**) i plazmu, někdy i mitochondrie, vhodné jsou barvicí metody Heidenhein, Giemsa, Dominici, hematoxyliny, Mann, Mallory, Feulgen (**Jírovec, 1958**).

SUSA (podle Heidenheina) se skládá ze sublimátu, chloridu sodného, destilované vody, kyseliny trichlóroctové, kyseliny octové ledové a formolu (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**), velmi rychle proniká, fixuje dobře jádra. Je vhodná fixáž pro přehledné histologické preparáty (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Po této fixaci jsou vhodná zejména barvení: Heidenhein, Mallory, Dominici (**Jírovec, 1958**).

Steinmannova fixáž se připravuje z koncentrované kyseliny dusičné, koncentrovaného vodného roztoku sublimátu a destilované vody. Barvíme boraxovým karmínem nebo Schubergovým solným karmínem (**Lelláková et al., 1992**).

1.2.1.4. Kyselina chromová a fixační směsi s kyselinou chromovou

Kyselina chromová se samostatně k fixaci neuzívá, osvědčila se však ve směsi s jinými fixačními prostředky, kdy za přítomnosti jiných kyselin zvyšuje barvitelnost tkáně (**Knoz a Opravilová, 1992**). Sloučeniny chromu dobře stabilizují proteiny a fosfolipidy, hydrolyzují však DNA a do tkáňových vzorků pronikají velmi pomalu (**Čech et al., 1998**).

Formolflemming podle Navašina fixuje dobře jádra. Hodí se pro fixaci velkých objektů, neboť je v něm možno materiál i přechovávat (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Na přípravu se používá 1% vodný roztok kyseliny chromové, 40% formol a ledová kyselina octová. (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Fixace je vhodná pro barvení Heidenheinem, různými hematoxyliny (**Jírovec, 1958**).

Champy fixuje velmi dobře cytoplazmu, mitochondrie, Golgiho aparát. Na přípravu se používá 1% kyselina chromová, 3% vodný roztok dichromanu draselného a 2% kyselina osmičelá (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Pro barvení jsou

vhodné metody Heidenhein, Benda, Altmann, Kuhl-Nassonow, Volkonský (**Jírovec, 1958**).

Němcova fixáž fixuje velmi dobře cytoplazmu, mitochondrie a Golgiho aparát. Na přípravu se používá 1% kyselina chromová, dichroman draselný a 40% formol (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Pro barvení jsou vhodné metody Heidenhein, Benda, Altmann, Kuhl-Nassonow, Volkonský (**Jírovec, 1958**).

1.2.1.5. Kyselina osmičelá a fixační směsi s kyselinou osmičelou

Kyselina osmičelá velmi dobře zachovává strukturu buněk, vhodná je při cytologických vyšetřeních pro zvýraznění mitochondrií, Golgiho aparátu, aj. Jen parami kyseliny osmičelé lze fixovat např. prvky v nátěru na sklíčku (**Knoz a Opravilová, 1992**).

Flemmingova fixáž fixuje velmi dobře jádra, cytoplazmu a někdy i mitochondrie. Na přípravu se používá 1% kyselina chromová, 2% kyselina osmičelá a ledová kyselina octová (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). **Vacek (1995)** doporučuje na přípravu této fixáže oxid chromový 1%, oxid osmičelý 2% a ledovou kyselinu octovou, která se přidává těsně před použitím. Vhodné jsou např. barvicí metody Heidenhein, Benda, Altmann (**Jírovec, 1958**).

1.2.1.6. Kyselina pikrová a fixační směsi s kyselinou pikrovou

Kyselina pikrová (trinitrofenol) jsou žluté krystalky rozpustné v destilované vodě (**Lelláková et al., 1992**), rychle sráží bílkoviny, dobře proniká do objektu. Objekty zbarvuje žlutě (**Knoz a Opravilová, 1992**), vypírá se 70% alkoholem (**Lelláková et al., 1992**). Objekty fixované kys. pikrovou se dobře barví hematoxylinem a karmínem (**Lelláková et al., 1992**).

Kyselina pikrová se používá se ve formě nasyceného vodního roztoku, obvykle v kombinaci s formolem a kyselinou octovou (Bouinova tekutina) (**Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005**). Bouinova tekutina patří mezi hodně používané fixáže. Rychle proniká, zachovává barvitelnost. Fixuje dobře jádra, je vhodná pro povšechný histologický obraz. Není vhodná na fixaci překrvených orgánů, např. sleziny

(hemolyzuje krev a tím vznikají sraženiny) (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**) a pro zalévání do celoidinu. Fixuje i větší objekty, např. embrya, mořské živočichy (**Knoz a Opravilová, 1992**). Dále je to velmi dobrá fixáž pro prvoky, obojživelníky a vůbec mnoho živočišných objektů. Je vhodné následné barvení Boraxovým karmínem, hematoxyliny...(**Lelláková et al., 1992**).

Přípravu Bouin-Allenovy fixáže popisuje (**Jírovec, 1958**). Fixuje dobře jádra, povšechný histologický obraz, i pro větší kusy embrya, mořská zvířata, nehodí se k zalévání do celoidinu (**Jírovec, 1958**).

Dubosque-Brasil fixuje dobře jádra, mořské živočichy a embrya (**Knoz a Opravilová, 1992**), je vhodná i pro povšechný histologický obraz, nehodí se k zalévání do celoidinu (**Jírovec, 1958**). Jde o modifikaci Bouinovy směsi, je vhodná zejména pro fixaci objektů, do kterých jiné fixační prostředky špatně pronikají, např. členovců. Na přípravu se používá kys. pikrová, 80% etanol, koncentrovaná kyselina octová a 40% formol (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**).

Dalšími fixačními směsmi s kyselinou pikrovou jsou například Pasteelsova tekutina (hodí se k fixaci tkání určených k průkazu polysacharidů) (**Vacek, 1995**) a Gendreova tekutina - obě v živočišných tkáních dobře stabilizují glykogen (**Čech et al., 1998**); nebo Rossmanův roztok (**Bancroft a Stevens, 1996**).

1.2.1.7. Metanol

Používá se téměř výhradně na fixaci krevních nátěrů (**Knoz a Opravilová, 1992; Lelláková et al., 1992**). Extrahuje lipidy a tkáň po nich značně ztvrdne a smrští se. Používá se většinou jen ve směsích (**Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005**). Je to čistá, bezbarvá a hořlavá tekutina, která je vysoce toxická, mísitelná s vodou, etanolem (**Bancroft a Stevens, 1996**).

1.2.1.8. Aceton

Aceton je čistá, bezbarvá a hořlavá tekutina (**Bancroft a Stevens, 1996**), která se používá k fixaci tkání, ze kterých chceme zachovat strukturu některých enzymů, např. fosfatáz nebo lipáz. Fixace se provádí za chladu. Vzhledem k tomu, že má slabé pronikací schopnosti, je možné jím fixovat jen malé kousky tkání (**Knoz a Opravilová,**

1992). Extrahuje lipidy z tkáňových vzorků a způsobuje jejich značné smrštění a ztvrdnutí (**Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005**).

1.2.1.9. Kyselina octová

Kyselina octová sama o sobě fixuje živočišné tkáně velmi nedokonale a uplatňuje se proto jen ve fixačních tekutinách nebo směsích (**Čech et al., 1998**).

Ledová kyselina octová (=100%) se používá ve směsích obsahujících sublimát, kyselinu chromovou a kyselinu osmičelou. Její význam spočívá v tom, že snižuje pH roztoku a tím urychluje fixační účinek celé směsi a současně zvyšuje i barvitelnost. Ve slabší koncentraci (1%) v kombinaci s barvivem zvýrazňuje jádra v buňkách (**Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.1.10. Kyselina trichlóroctová

Velmi rychle sráží bílkoviny, rychle proniká (**Knoz a Opravilová, 1992**). Sama o sobě fixuje opět velmi nedokonale a uplatňuje se ve fixačních směsích (**Čech et al., 1998**), zejména se užívá jako příměs k fixázím se sublimátem (Susa) a fixázím obsahujícím kyselinu pikrovou (**Knoz a Opravilová, 1992**). Pro fixaci bezobratlých se přidává 5% kyselina octová v poměru 1:1. Barví se například gentiánovou violetí... (**Lelláková et al., 1992**).

1.2.1.11. Oxid osmičelý

Oxid osmičelý denaturuje velmi jemně proteinové složky a proto jsou užívány i pro fixaci při elektronmikroskopických studiích, bohužel též jeho použití podstatně omezí paletu využitelných barvicích technik pro světelnou mikroskopii (**Jelínek et al., 2007**). Pomalu proniká do tkáně, inhibuje enzymy a je toxický (**Čech a Horký, 2005**). Užívá se k fixaci zejména při cytologických vyšetřeních, např. mitochondrií, Golgiho komplexu, centriolů, dále k fixaci lipidů, které se zároveň s fixací zbarví černě (redukací oxidu osmičelého) (**Vacek, 1995**).

1.2.2. Vypírání po fixaci

Po fixaci je nutné vzorek zbavit fixačního činidla. To se provádí vypíráním vzorku v tekoucí vodě, popřípadě alkoholu (Sládek, 2000; Čech et al., 1998).

1.2.3. Zalévání

Po fixaci a vypírání vzorků tkání a orgánů se buď vzorky zmrazí a krájí na zmrazovacím mikrotomu; a nebo se vzorky prosytí vhodnou látkou, která se po zchladnutí, polymerací či jiným způsobem přemění v dobře krájitelnou hmotu. Vzorky zalité do zalévacího média se označují jako tkáňové bločky; ty se pak krájí na mikrotomech (Čech et al., 1998). Zalévací média se rozdělují na ve vodě rozpustná (želatina, celodal) a ve vodě nerozpustná (parafin a paraplant nebo celoidin) (Čech a Horký, 2005). Nejběžněji se pro světelnou mikroskopii užívá zalévání do parafinu, případně celoidinu (nitrocelulozy) (Jelínek et al., 2007).

1.2.3.1. Zalévání do médií rozpustných ve vodě

Zalévání spočívá v prosycení vzorků tkáně teplou želatinou nebo celodalem, popř. polyetylglykoly (Čech et al., 1998). Mají tu výhodu, že se tkáň nemusí odvodňovat a nedochází k jejímu smrštění. Její nevýhodou je, že se médium přibarvuje a řezy se obtížně napínají (Čech a Horký, 2005). Z médií mísitelných s vodou se používá nejvíce želatiny. Zalévání do celodalu a do vosků nerozpustných ve vodě zůstává omezeno jen pro speciální účely (Vacek, 1995).

Princip zalévání do želatiny je v prosycení tkáňového bločku vypraného ve vodě postupně koncentrovanějšími roztoky želatiny při teplotě 37°C (Vacek, 1995; Čech a Horký, 2005), pak se bloček zchladí, želatina ztuhne a bloček se zpevní formolem (Vacek, 1995), želatinové bločky řežeme na zmrazovacím mikrotomu (Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995).

Do celodalu můžeme tkáň zalévat buď přímo, nebo po prosycení celodalem, zředěným etanolem (Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995). Zalití je rychlé, celodal se dobře řeže, dají se krájet velmi tenké řezy. Nevýhodou je, že se celodal při barvení silně přibarvuje (Knoz a Opravilová, 1992).

Vosky rozpustné ve vodě patří po chemické stránce mezi polyetylenglykoly. Tkáň opět nemusíme odvodňovat; nevýhodou je, že se řezy obtížně napínají na podložní skříčka (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**).

1.2.3.2. Zalévání do médií nerozpustných ve vodě

Většina zalévacích médií není mísitelná s vodou a proto musí být tkáň odvodněná a prosycená médiem, ve kterém se zalévací hmota rozpouští. Obvykle se tkáň odvodňuje stoupající řadou alkoholů, následuje prosycení tkáně rozpouštědlem zalévacího média (**Jelínek et al., 2007**).

Zalévání do médií nerozpustných ve vodě zahrnuje obvykle 4 až 5 kroků, jejichž sled u zalévání do parafinu je následující: odvodnění vzorků etanolem; prosycení vzorků látkou, která rozpouští parafin a mísí se s etanolem (tzv. projasnění); prosycení vzorků čistým parafinem; zalití vzorků do zkvalitněného parafinu (**Čech a Horký, 2005**). Zkvalitněný parafin neobsahuje plynné produkty a mechanické nečistoty z parafinů a je obohacen o včelí vosk (**Čech et al., 1998**). Principem zalévání vzorků tkání do parafinu je prosycení odvodnění tkáně parafinem rozehrátým na teplotu 56 – 58°C. Rozehrátý parafin vyplní všechny štěrby ve tkáni, kde rovněž ztuhne. Poté se při řezání nedrobí, nemačká a tímto způsobem lze dosáhnout ideálních řezů (**Vacek, 1995; Sládek, 2000**). Bohužel zvýšená teplota snižuje aktivitu četných enzymů, rovněž vede k smršťování tkáně (**Jelínek et al., 2007**). Parafin se nehodí k zalévání tkání tužší konzistence a k zalévání tkání, v nichž mají být prokazovány lipidy (extrakce lipidů organickými rozpouštědly) (**Vacek, 1995**).

Po odvodnění se vzorky prosytí látkou, která rozpouští parafin a mísí se s ethanolem: např. benzen a xylen nebo methylbenzoát, methylsalicilát a cedrový olej. Dokonalé prosycení tkáňových vzorků rozpouštědly parafinu se projeví zvýšením jejich transparence, z tohoto důvodu se tato etapa nazývá projasňování vzorků (**Čech et al., 1998**). Následuje prosycení tkání parafinem, kdy se tkáňový bloček přenáší do tekutého parafinu, a to buď přímo nebo při šetrném zalévání přes benzen-parafin (**Vacek, 1995**). Vzorky se prosycují při teplotě 56°C v termostatu, obvykle ve 3 lázních čistého parafinu v otevřených nádobkách. (**Čech et al., 1998**). Poslední fází je zalití vzorků, k čemuž se

používá zkvalitněného parafínu (**Vacek, 1995**). Rozehřátý parafín se nalije do zalévací komůrky a do ní se přenesou vzorky tkáně předtím prosycené parafínem. Když parafín důkladně ztuhne, komůrka se odstraní a přebytečný parafín se odkrojí, čímž se získá parafínový bloček. Od 80. let se k zalévání místo zkvalitněného parafínu používá směs čistého parafínu a plastických polymerů (Paraplast) nebo směs čistého parafínu a plastických polymerů s příměsí dimethylsulfoxidu (DMSO), který slouží jako změkčovadlo (Paraplast-Plus) (**Čech et al., 1998**).

Dalším zalévacím médiem je celoidin: používá se k zalévání velmi hutných tkání a orgánů (šlacha, chrupavka, odvápněná kost a zub) (**Vacek, 1995; Čech a Horký, 2005**) nebo velkých objektů (**Knoz a Opravilová, 1992; Čech a Horký, 2005**). Po odvodnění etanolem se vzorky prosytí rozpouštědlem celoidinu (bezvodý ethanol éter), vzorky se prosytí celoidinem, zalijí se do 10% celoidinu. Poslední a závěrečnou etapu představuje tvrzení celoidinových bločků, při které se celoidinové bloky vloží maximálně na 24 hodin do 70% neb 80% ethanolu (**Čech et al., 1998**). Zalévání do celoidinu nezpůsobuje smrštění tkáně (**Vacek, 1995**); nevýhodou je, že zalévání trvá poměrně dlouhou dobu, krájení celoidinových bloků v tenkých řezech je obtížné (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**). Celoidin se nehodí k zalévání tkání fixovaných tekutinami s kyselinou pikrovou, která brání prosycení tkáně celoidinem, a musí být proto před tím z tkáně složitou cestou odstraněna (**Vacek, 1995**).

Zalévání do celoidin-parafínu je kombinací obou předchozích metod. Při zalévání se postupuje dvěma způsoby: buďto se odvodněná tkáň nejdříve předběžně prosytí nízkoprocentním celoidinem v methylbenzoátu nebo methylsalicylátu a poté se obvyklým způsobem zalije do parafínu; a nebo se vzorky podle běžné receptury prosytí a zalijí do celoidinu a po vykrojení bloků z celoidinového koláče se tyto dodatečně prosytí rozeřtým parafínem. Toto zalévání je vhodné pro zalévání vzorků z kůže, z kosterní svalové tkáně (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995; Čech et al., 1998**) a dále pro tkáně, které mají být krájeny v tenkých řezech (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**).

1.2.4. Krájení

Z tkáňových bločků, zalitých do některého z uvedených médií se zhotovují pomocí mikrotomu histologické řezy (**Čech a Horký, 2005**).

Rozlišuje se mikrotom sáňkový a rotační. U sáňkového mikrotomu se pohybuje nůž a bloček je proti němu vysouván o nastavený počet mikrometrů. Rotační mikrotom pracuje na opačném principu – proti pevně uchycenému noži se pohybuje blok upevněný na posuvné tyči. Mikrotomy rotačního typu se používají pro krájení sériových řezů (**Sládek, 2000; Čech a Horký, 2005**). Přístroj, kterým lze krájet nativní i fixovaný materiál při nízkých teplotách (-20°C a více) se nazývá kryostat, používá se hlavně v histochemii (**Čech a Horký, 2005**).

Řezy jsou po nakrájení přeneseny na podložní sklo, kde jsou nataženy na kapce vody (**Maňáková a Seichertová, 2002**). K lepení parafinových řezů na podložní skla se nejčastěji užívá bílek-glycerin, někdy želatina nebo některá syntetická lepidla. Parafinové řezy se po nalepení suší (**Jelínek et al., 2007**) a to v termostatu nebo na 40°C vyhřáté ploténce. Teplem parafin změkne, voda se vypaří a řez na skle se přilepí a napne (**Sládek, 2000**). Pak jsou řezy odparafinovány a převedeny zpět do vody. Ve většině případů jsou pak barveny (**Jelínek et al., 2007**).

1.2.5. Barvení

Cílem barvení je zvýraznit ve tkáních a buňkách ty struktury, které chceme studovat, případně odlišit několik tkáňových součástí tím, že se zvýrazní různými barvivy. Proto se většinou snažíme, aby barvení bylo selektivní, tj. dostatečně specifické pro jednu tkáňovou strukturu (např. hematoxylin barví modře jádra). Barvení difúzní (nespecifické) se používá jen pro dobarvení ostatních struktur (eosin) (**Čech et al., 1998**).

K barvení se užívají přirozená a syntetická barviva. Přirozená barviva jsou hematoxylin, karmín, orcein, šafrán (**Maňáková a Seicherová, 2002; Jelínek et al., 2007**). Hematoxylin je extrakt z kampeškového dubu, karmín je extrakt ze samiček červce nopálového, orcein je extrakt z některých lišejníků a šafrán extrakt z blizen šafránu (**Jelínek et al., 2007**). Syntetická barviva jsou xantinové deriváty (eosin,

erythrosin, fluorescein), trifenylmethylenová barviva (bazický fuchsin, kyselý fuchsin, anilinová modř, světlá zeleň), triazinová barviva (thionin, azury, toluidinová modř, methylenová modř), azo-barviva (olejová červeň, sudanová červeň) **(Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Přirozená i syntetická barviva mohou být kyselá či zásaditá **(Maňáková a Seichertová, 2002; Jelínek et al., 2007)**. Kyselé barvivo je schopno vazby na zásadité (acidofilní) složky tkáně, kdežto zásadité barvivo se váže na kyselé (basofilní) složky tkáně **(Maňáková a Seichertová, 2002)**.

1.2.5.1. Hematoxyliny

Výchozí látkou pro hematoxylinová barviva je hematoxylin, získaný z kameškového dřeva ze střední Ameriky. Je skoro bezbarvý, ale oxidací se mění na vlastní barvivo – hematein **(Titford, 2005)**. Teprve pak tvoří s různými kationty barevné laky **(Jelínek et al., 2007)**. Hematein může vznikat buď přirozenou oxidací (zrání) při vystavení světlu a vzduchu, jde o pomalý proces, příklady takových hematoxylinů jsou Ehrlichův a Delafieldův hematoxylin. Druhý způsob je chemická oxidace, využívá například jodičnan sodný (Mayerův hematoxylin) nebo oxid rtuťnatý (Harrisův hematoxylin), přeměňují hematoxylin na hematein okamžitě.

Hematoxylin Delafieldův je přirozeně zrající kamencový hematoxylin. Pro jeho přípravu se používá hematoxylin, 95% alkohol, nasycený roztok kamence amonného, glycerol **(Bancroft a Stevens, 1996)**. **Jírovec (1958)** uvádí jako vhodné fixační tekutiny skoro všechny fixáže, pokud neobsahují kyselinu osmičelou. Hematoxylin barví jádra a chromatin modře, hodí se k orientačním histologickým preparátům, nutno dobarvovat buď eosinem nebo Van Giesonem. Je vhodný pro totální preparáty, krevní roztěry, roztěry fixované za vlhka, řezy **(Jírovec, 1958)**.

Na přípravu Harrisova hematoxylinu se používá vysoce toxický chlorid rtuťnatý, jde o čisté jaderné barvení **(Bancroft a Stevens, 1996)**. Vhodné fixační tekutiny jsou ty, které neobsahují kyselinu osmičelou. Metoda je vhodná pro stejný účel jako Delafieldův hematoxylin **(Jírovec, 1958)**.

Ehrlichův hematoxylin patří mezi barviva „přirozeně zrající“. Je to jaderné barvivo, barví hlen včetně mukopolysacharidů chrupavky (**Bancroft a Stevens, 1996**). Pro přípravu se používá hematoxylin, absolutní alkohol, voda, ledová kyselina octová, kamenec draselný (**Knoz a Opravilová, 1992**). Nejvhodnější fixační tekutiny jsou fixáže, které neobsahují kyselinu osmičelou (**Jírovec, 1958**). Poskytuje výrazně sytě modré zbarvení buněčných jader a chromatinu (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**). Vhodné pro barvení totálních preparátů, řezů a krevních roztěrů (**Knoz a Opravilová, 1992**).

Heidenhainův železitý hematoxylin je barvení, kde se jako mořidlo / oxidant a diferenciací činidlo síran železito-amonný. Heidenhainův hematoxylin může být používán pro znázornění různých struktur v závislosti na stupni diferenciace (**Bancroft a Stevens, 1996**). Barvení je vhodné po všech fixážích (**Jírovec, 1958**), hodí se k barvení jader (chromatinu), i k barvení některých organel, např. mitochondrií, centriolů, svalových fibril (**Vacek, 1995**). Po obarvení je jádro hnědé až černé a svaly šedočerné (**Maňáková a Seicherová, 2002**), chromatin, mitochondrie, sekreční granula se obarví červenohnědě až černě (**Vacek, 1995**).

Weigertův hematoxylin je železitý hematoxylin, ve kterém je používán chlorid železitý jako barevné mořidlo / oxidační činidlo. (**Bancroft a Stevens, 1996**). Barvení je vhodné použít po formolu, alkoholu i sublimátových fixážích, hodí se zejména pro celoidinové řezy. Po obarvení jsou jádra černá, dobarvuje se van Giesonem, vazivo je pak červené, svaly žluté (**Jírovec, 1958**).

Mayerův hematoxylin je kamencový hematoxylin, používá se zde jodičnan sodný. Používá se jako jaderné barvivo pro zvýraznění glykogenu v enzymových histochemických technikách (**Bancroft a Stevens, 1996**). Připravuje se z hematoxylinu, destilované vody, amonného nebo draselného kamence, jodičnanu sodného, kyseliny citronové, chloralhydrátu (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995; Bancroft a Stevens, 1996**).

Další hematoxylinová barviva jsou například Hematoxylin Böhmerův (**Vacek, 1995**), Loyezův hematoxylin, Verhoeffův hematoxylin, Coleův hematoxylin, Carazziův hematoxylin (**Bancroft a Stevens, 1996**).

1.2.5.2. Barvení Weigert – van Gieson

Jde o kombinované barvení, k barvení jader se používá železitý hematoxylin a dobarvuje se kyselým fuchsinem a kyselinou pikrovou (trinitrofenol) (**Jelínek et al., 2007**). Železitý hematoxylin zbarví jádra (resp. chromatin) temně hnědě, kyselým fuchsinem jsou červeně zbarvena kolagenní vlákna vaziva a kyselina pikrová barví svaly žlutě (**Vacek, 1995; Maňáková a Seicherová, 2002; Jelínek, 2007**). Barvení je vhodné použít po všech různých fixáčích. Metoda je vhodná ke studiu vaziva, pro přehledné histologické preparáty, embrya (**Jírovec, 1958**).

1.2.5.3. Eosin

Eosin je syntetické barvivo, jde vlastně o skupinu barviv; a to bromeosinů a jodeosinů (**Čech et al., 1998**). Je to nejvhodnější barvivo na kombinování s kamencovými hematoxyliny pro znázornění hlavní histologické architektury tkání (**Bancroft a Stevens, 1996**). Cytoplazmu barví lehce růžově, svalovou tkáň červeně a vazivo růžově (**Čech a Horký, 2005**).

1.2.5.4. Barvení hematoxylin-eosin (HE)

Jde o standardní metodu hematoxylinového a eosinového barvení pro parafinové řezy (**Bancroft a Stevens, 1996**).

Nejprve se odparafinované a ve vodě vyprané řezy obarví roztokem hematoxylinu, ten barví buněčná jádra, současně přibarví i vazivo. Pak se řezy vyperou v tekoucí vodě a vloží do eosinu (**Čech et al., 1998**). Po obarvení je jádro modré až černé, kolagen růžový a svaly růžové (**Maňáková a Seichertová, 2002**), cytoplazma buněk je růžová až červená (**Sládek, 2000**).

1.2.5.5. Heidenheinův azan

Metoda využívá k barvení jader roztok azokarmínu G a po diferenciaci tohoto jádrového zbarvení a moření řezů v roztoku kyseliny fosfowolframové se dobarvuje

směsí anilínové modře a G-oranže. Výsledek: červené zbarvení jader, červené zbarvení erytrocytů, modře je zbarvený kolagen, hlen a konečně oranžově-červeně svaly. Cytoplazma řady buněk, na dostatečně tenkých řezech, se obarví bledě modře (**Jelínek et al., 2007**). Metoda umožňuje bezpečné odlišení vaziva od ostatních tkání (**Čech a Horký, 2005**). Materiál se před barvením fixuje fixačními prostředky obsahujícími sublimát (**Knoz a Opravilová, 1992; Vacek, 1995**).

1.2.5.6. Barvení Massonovými trichromy

Barvení Massonovými trichromy se užívá zvláště při vyšetřování kolagenního vaziva (**Vacek, 1995; Čech et al., 1998**). Rozeznávají se tři hlavní druhy trichromů: trichrom modrý (kolagenní vazivo se barví modře), trichrom žlutý (kolagenní vazivo se barví žlutě), trichrom zelený – kolagenní vazivo se barví zeleně. K fixaci jsou vhodné téměř všechny fixační tekutiny až na formol. (**Vacek, 1995**)

Prvním z nich je modrý Massonův trichrom. Pro přípravu tohoto barvení se používá hematoxylin, kyselý fuchsin a anilínová modř (**Maňáková a Seichertová, 2002**). Výsledek tohoto barvení: jádra jsou zbarvena černě, kolagenní vlákna a mukoidní substance modře, cytoplazma většiny buněk je zbarvena červeně (**Jelínek et al., 2007**).

Žlutý Massonův trichrom je metoda, kde se používá hematoxylin, erythrosin a šafrán (**Maňáková a Seichertová, 2002**). Výsledek tohoto barvení: jádra jsou zbarvena modře nebo černě (dle užitého hematoxylinu), cytoplazma buněk je červená a kolagen je zlatožlutý (**Jelínek et al., 2007**), svalstvo se barví červeně (**Vacek, 1995; Maňáková a Seichertová, 2002**).

Zelený Massonův trichrom poskytuje barevné odlišení základních druhů tkání (**Vacek, 1995**). Používá se hematoxylin, kyselý fuchsin a světlá zeleň; po obarvení je jádro modré až černé, kolagen zelený a svaly červené (**Maňáková a Seichertová, 2002**). Metoda je vhodná pro přehledné histologické preparáty obratlovců i bezobratlých živočichů (**Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.5.7. Mallory

Barvení využívá hned 3 roztoky, barvení popsali například **Knoz a Opravilová (1992)**. Poskytuje polychromatické obarvení řezů. Jádra se barví červeně nebo oranžově, jádérka oranžově nebo žlutě, vaziva, sliz a sekrety modře. Je to vhodná metoda při studiu vaziva, chitinu, řezových preparátů hmyzu a embryologických preparátů (**Jírovec, 1958; Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.5.8. Mannova rychlá metoda pro přehledné histologické řezové preparáty

Přípravu popisují **Knoz a Opravilová (1992)**, před barvením jsou vhodné hlavně sublimátové fixáže, ale i Bouin. Barvení poskytuje bichromatické barvení řezových preparátů: chromatin, buněčná jádra a kolagen se zabarví modře; jádra, jádérka a cytoplazma červeně. Metoda je vhodná pro studium buněčných jader a krevních elementů ve tkáních (**Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.5.9. Weigertův resorcin-fuchsin

Konečným výsledkem tohoto barvení je hnědé až fialové zbarvení elastických vláken (**Bancroft a Stevens, 1996**). Používají se barviva resorcin a fuchsin (**Maňáková a Seichertová, 2002**). K barvení lze použít parafínové řezy z tkáně fixované prakticky všemi fixačními tekutinami (**Vacek, 1995**).

1.2.5.10. Dominici (Barvení oranží-eosinem a toluidinovou modří)

Jde o často používané přehledné barvení, užívá se téměř po všech fixacích tkáně mimo fixace oxidem osmičelým. Výsledek barvení – jádra buněk se barví modře, chrupavka a hlen modrofialově, cytoplazma buněk růžově, vazivo červeně, erythrocyty oranžově (**Vacek, 1995**). Metoda je vhodná při studiu buněčných jader a krevních elementů ve tkáních a řezech, v protozoologii a při studiu bakterií v řezech (**Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.5.11. Karmínové barvicí metody

Boraxový karmín Grenacherův je metoda, jejíž metodiku popsali například **Jírovec (1958)**, **Knoz a Opravilová (1992)**, je vhodná po fixaci alkoholem, sublimátovými fixážemi, Canoy, Bouin (**Jírovec, 1958**). Barví jádra červeně (**Jírovec, 1958; Vacek, 1995**), používá se hlavně pro totální preparáty (**Jírovec, 1958**).

Solný karmín podle Schuberga popisují **Knoz a Opravilová (1995)** jako metodu vhodnou pro barvení menších živočichů in toto (při hotovení totálních preparátů) např. motolic, tasemnic, ploštěnek apod. Některé vnitřní orgány, např. gonády, se barví sytě červeně, jiné jsou jen světle červené nebo se při diferenciaci zcela odbarví.

Kamencový karmín podle Mayera je metoda, kde se jako diferenciací roztok používá 0,5 – 1% síran hlinito-draselný. Metodiku pro přípravu tohoto barviva popisují **Knoz a Opravilová (1992)**. Hodí se pro barvení totálních i řezových preparátů, poskytuje monochromatické v různých tónech červené barvy, sytě červeně se barví buněčná jádra (**Knoz a Opravilová, 1992**).

1.2.5.12. Orcein

Orcein je červené barvivo, které se připravuje extrakcí z lišejníků (**Knoz a Opravilová, 1992**). Vhodné pro barvení elastiky, která se běžně nezbarví. Orcein tato vlákna zbarví červenohnědě (**Jelínek et al., 2007**).

1.2.5.13. Aldehydový fuchsin a resorcinový fuchin

Využívají se k barvení elastických vláken, u aldehydového fuchsinu se vlákna zbarví fialově, u resorcinového fuchsinu modročerně (**Čech et al., 1998**). Před barvením aldehydovým fuchsinem je výhodná je zejména fixace Bouinovou tekutinou nebo formolem (**Vacek, 1995**).

1.2.5.14. Barvení jader jádrovou červení

Barvení jádrovou červení slouží k dobarvování jader, která se barví červeně. Toto barvení daleko předčí barvení jader kamencovým karmínem. (**Vacek, 1995**).

1.2.5.15. Barvení jader galocyaninem

Vhodné je zejména k znázornění nukleových kyselin a nervových buněk, nukleové kyseliny barví tmavě modře, ostatní struktury se přibarvují světlou modří (Vacek, 1995).

1.2.6. Montování řezů

Obarvený řez je třeba zabezpečit proti vyschnutí a poškození. Toho se dosáhne tak, že se řez převrství kapkou inertního tuhajícího média a překryje se krycím sklíčkem, tzv. montování. Dříve byl nejpoužívanějším montovacím médiem kanadský balzám (pryskyřice z kanadské jedle), který plně nahradily pryskyřice syntetické (např. Entellan, Eukitt aj.) (Čech a Horký, 2005).

1.2.7. Histochemie a histochemické metody

Histochemie je hraniční obor mezi histologií a chemií, jehož úkolem je zjišťování charakteru a distribuce chemických látek v buňkách a tkáních histologických řezů (Čech a Horký, 2005). Histochemické metody a postupy musí splňovat dva základní požadavky, a to věrohodně reflektovat biochemickou různorodost buněk a tkání a kvalitně zachovávat jejich mikroskopickou strukturu (Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005).

1.2.7.1. Cukry

Cukry jsou v živočišných buňkách a tkáních hojně rozšířeny. Vyskytují se ve formě monosacharidů, oligosacharidů a složených cukrů (Čech et al., 1998).

Složené cukry bývají poměrně často asociovány s proteiny a označují se jako mukosubstance (Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005). Tyto mukosubstance se rozdělují na polysacharidy (glykogen, škrob, celulóza, chitin), proteoglykany (mukopolysacharidy), glykoproteiny (patří sem sekreční produkty endo- a exokrinních žláznových buněk, glykokalyx, amyloid aj). V praxi se z cukrů prokazují právě mukosubstance, k fixaci lze použít většinu fixačních tekutin, vzorky se zalévají do parafínu.

K průkazu mukosubstancí se používají: bazická barviva (alciánová modř, thionin, toluidinová modř nebo metylenová modř), oxidační metody (zejména PAS reakce) a lektiny. Každý z postupů se doporučuje doplnit buď chemickou blokádou funkčních skupin (např. acetylace hydroxylů) nebo enzymatickou extrakcí studované mukosubstance (amyláza, hyaluronidáza, neuraminidáza) (**Čech a Horký, 2005**).

Mezi oxidačními metodami je nejznámější a nejpoužívanější je tzv. PAS reakce (z angl. Periodic Acid – Schiff's reagent) (**Čech et al., 1998**). Průkaz cukrů je založen na jejich oxidaci, která vede k rozštěpení pyranového nebo furanového kruhu cukru a ke vzniku aldehydových skupin, tyto skupiny pak reagují s Schiffovým činidlem a dávají červeno-fialové zabarvení (PAS reakce). Princip klasické PAS reakce je založen na oxidaci pomocí kyseliny jodisté a následné barvené reakci se Schiffovým reagens (kyselina fuchsin siřičitá), pozitivní zbarvení je červeno-fialové (**Maňáková a Seichertová, 2002; Jelínek et al., 2007**).

Bazická barviva používaná k průkazu cukrů jsou alciánová modř, thionin, toluidinová modř, dialyzované koloidní železo. Alciánovou modří se barví kyselé mukopolysacharidy modrozeleně (**Čech et al., 1998**).

Aplikace thioninu, toluidinové a methylenové modří využívá jevu zvaného metachromasie. Pojem metachromasie znamená, že zatímco některé složky tkáně se barví v základním odstínu barviva (nejčastěji modře - thioninem nebo toluidinovou modří), jiné se zbarví metachromaticky (týmž barvivem purpurově). Tuto schopnost vykazují se téměř výlučně thiazinová barviva (**Jelínek et al., 2007**).

Řada kyselých mukopolysacharidů vykazuje výraznou afinitu ke kationtům některých kovů, zejména dialyzovanému koloidnímu železu (Haleova metoda). Koloidní železo vázané na polysacharid se detekuje reakcí s ferokyanidem draselným v kyselém prostředí, při kterém vzniká berlinát železitý (berlínská modř) (**Čech et al., 1998**).

V posledních letech byla rozpoznána možnost prokazovat různé sacharidové zbytky, účastníci se na stavbě, hlavně zevního listu, povrchové buněčné membrány, využitím lektinů, což jsou glykoproteiny vyskytující se jak v říši rostlinné, tak živočišné (**Jelínek et al., 2007**). Získávají se z kořenů a semen čeledě některých vikvovitých, byly

izolovány z tělních tekutin bezobratlých a vajíček některých ryb nebo mohou být i původu bakteriálního, skládající se z proteinů nebo glykoproteinů neimunní povahy (Čech et al., 1998). Mají tedy schopnost vázat se na různé sacharidové zbytky, zpravidla jeden lektin rozpoznává více sacharidů, kombinací různých lektinů je možné určit sledovaný sacharid (Jelínek et al., 2007). Příkladem lektinu a s ním slučitelného cukru je konkavalin a sacharidy manóza, glukóza (Bancroft a Stevens, 1996).

Princip průkazů je poměrně jednoduchý: buněčnou suspenzi nebo řez tkání převrstvíme kapkou značeného lektinu (např. značeného FITC - fluoresceinisothiocyánátem nebo některým enzymem - např. křenovou peroxidázou a pod.), po době nutné pro navázání nenavázaný lektin vypereme a při použití FITC značení je preparát hotový – studuje se ve fluorescenčním mikroskopu. Při použití enzymů je nutné tyto ještě vybarvit (u křenové peroxidázy diaminobenzidinem s přídavkem H₂O₂) (Jelínek et al., 2007).

Dále je možné stanovit rostlinné škroby – například celulózu, tunicin, chitin. Chitin se vyskytuje jako běžná součást kutikuly členovců i dalších bezobratlých, podílí se na utváření buněčných stěn u hub a některých řas. Pro jejich důkaz se používá metoda Schulzeho, kterou popsal například (Knoz a Opravilová, 1992).

1.2.7.2. Tuky

Lipidy jsou látky chemicky značně heterogenní, extrahují se z tkání a orgánů organickými rozpouštědly (např. benzenem, éterem) (Čech et al., 1998; Čech a Horký, 2005).

Čech a Horký (2005) rozdělují tuky na neutrální tuky (triacylglyceroly), vosky (chybějí u savců a člověka), fosfolipidy (glycerolfosfatidy, sfingomyeliny, ceramidy), glykolipidy (zahrnují cerebrosidy, gangliosidy a sulfonamidy), izoprenoidní lipidy (cholesterol a jeho estery), tuky konjugované s proteiny (proteolipidy, lipoproteiny).

Vzorky určené k průkazu lipidů se fixují formolem nebo Bakerovou tekutinou a používají se zmrzlé nebo kryostatové řezy (Vacek, 1995; Maňáková a Seichertová, 2002; Čech a Horký, 2005; Jelínek et al., 2007), které se po obarvení montují do

médií rozpustných ve vodě. Lipoproteiny se v tukových rozpouštědlech nerozpouštějí, lze je prokazovat na rozdíl od ostatních tuků i ve tkáních zalitých do parafinu.

V praxi se pro znázornění lipidů užívají extrakční postupy, fluorescenční a polarizační průkaz, barevné lyzochromní metody a speciální skupinové metody, jejichž užitečným doplňkem jsou blokády. K nim je třeba přikročit zejména v těch případech, kdy je podezření, že na tvorbě reakčního produktu se účastní různé funkční skupiny (**Čech a Horký, 2005**).

Extrakce se provádí nejčastěji na řezech, buď z čerstvých nebo fixovaných tkání, za horka nebo studena. Neutrální lipidy jsou rozpustné již v chladném bezvodém acetonu, ostatní lipidy včetně proteolipidů jsou extrahovány pyridinem nebo chloroformem s etanolem. Velmi stabilní lipoproteiny se rozpouštějí až po rozrušení protein-lipidové vazby kyselou hydrolyzou. Extrakční postupy se používají buď samostatně nebo v kombinaci s ostatními histochemickými metodami pro průkaz lipidů

Při fluorescenčním průkazu se aplikuje vhodný fluorochrom (např. 3,4-benzpyren, akridinová oranž, sulfát nilské modři, Fosfin 3R, Rhodamin B), který interakcí s lipidem vyvolá jeho druhotnou fluorescenci. Na druh tuku se usuzuje z barvy emitovaného světla (jeho vlnové délky).

Polarizačně mikroskopický průkaz využívá toho, že některé tuky po fixaci nebo ochlazení přecházejí do tekutého stavu v krystalické anisotropní útvary, intenzivně zářící na tmavém pozadí při zkřížených hranolech polarizačního mikroskopu (**Čech et al., 1998**).

Barevné lyzochromní metody využívají lyzochromy, barviva, která se přednostně rozpouštějí v lipidové fázi, čímž se tato stane viditelnou ve světelném mikroskopu. Tuto vlastnost mají červená sudanová barviva (Sudan III a IV), sudanová černá a olejová červená (Oil Red O), která díky tomu, že znázorňují i velmi malé kapičky tuku, je používána nejčastěji. S lyzochromy specificky reagují tzv. hydrofobní tuky (triglyceridy, estery cholesterolu a volné mastné kyseliny) (**Čech et al., 1998**). Tukové kapky jsou zbarveny ostře červeně (olejovou červení) nebo temně modře až černě (sudanovou černí) (**Jelínek et al., 2007**), Sudan III nebo IV tuky barví červeně (**Vacek, 1995**).

Dále pro průkaz lipidů **Vacek (1995)** popisuje metodu s oxidem osmičelým, barvení lipidů sulfátem nilské modře, metodu průkazu mastných kyselin (podle Fishlera) nebo metodu k průkazu cholesterolu podle Schultzeho.

1.2.7.3. Bílkoviny a aminokyseliny

Metody vizualizace bílkovin vyžívají detekce buď volných funkčních skupin – NH_2 , $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ (proteiny s vysokým obsahem serinu, threoninu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu) anebo jiných charakteristických radikálů a zbytků, jakými jsou např. – indolyl (tryprofan), -p-hydroxyfenyl (tyrosin), -imidazolyl (histidin), -guanidyl (arginin), -sulfhydryl ($-\text{SH}$, cystein) popř. disulfidové můstky (S-S , cystin). Vhodným chemickým činidlem se prokazovaná skupina nebo radikál na řezu převede v barevnou látku, jejíž lokalizace se hodnotí ve světelném mikroskopu. Materiál určený k vyšetření proteinů se fixuje neutrálním formolem, zalévá se do parafinu. Nezbytným doplňkem každého postupu jsou blokády, kdy se prokazovaná funkční skupina či radikál obsadí látkou znemožňující vznik reakčního produktu (**Čech a Horký, 2005**).

Maňáková a Seichertová (2002) poukazují na to, že bílkoviny jsou konstantní součástí buněk a tkání a není účelné prokazovat zde jejich přítomnost.

Pro průkaz volných aminoskupin se často využívá jejich oxidace v aldehydofunkce, které se Schiffovým činidlem (kyselina leukosulfonová) poskytují červenofialové chinoidní barvivo. Řezy se oxidují ninhydrinem nebo alloxanem, použít lze také chloramin. Ze zcela jiného principu pak vychází metoda s aldehydem 2-hydroxy-3-naftoové kyseliny. Při reakci vzniká almidin a v místě původní $-\text{NH}_2$ skupiny kovalentně vázaný naftol, který s diazoniovou solí dává nerozpustný barvený azoprodukt (**Čech et al., 1998**).

Pro průkaz volných karboxylových skupin se převedou pomocí acetanhydridu v pyridinu při 60°C na karbonyly ($=\text{C-O}$), na které se působí hydrazinem 2-hydroxy-3-naftoové kyseliny. Hydrazonový derivát bílkoviny, který takto vznikne, získá tak v místě původního karboxylu naftolové jádro, které spojením s diazoniovou solí poskytne nerozpustné azobarvivo.

Průkaz sulfhydrylů je založen na schopnostech sulfhydrylů redukovat roztoky obsahující Fe^{3+} a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ v modré nerozpustné barvivo (berlinát železitý). Jiný způsob detekce $-\text{SH}$ skupin je založen na použití organických sloučenin rtuti (např. p-chloro-merkurifenylozo-2-naftolu nebo merkurochrómu).

Arginin je součástí histonů asociovaných s DNA, obsahují ho i některá cytoplazmatická granula. Prokazuje se tzv. Sakaguchiho reakcí s α -naftolem a alkalickým chlornanem nebo bromnanem. Pozitivní výsledek signalizuje růžové nebo červené zbarvení (Čech et al., 1998).

K průkazu tyrosinu se používá buď Millonova reakce s dusičnanem rtuťnatým a kyselinou dusitou (Knoz a Opravilová, 1992; Čech et al., 1998) anebo azokopulační reakce, při které se účinkem kyseliny dusité vzniklý diazotyrosin kopuluje s tzv. S-kyselinou (kyselina 8-amino-1-naftol-5sulfonová) a dává červenofialové barvivo.

Dále se při průkazu bílkovin prosazuje metoda značených protilátek, založená na použití čisté látky proti dokazované bílkovině (antigen) (Čech et al., 1998).

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem předložené práce je nalezení vhodné fixáže pro histologické a histochemické studie komárů – vektorů četných patogenních agens. Studie se zaměřuje na samce, kteří mohou ovlivňovat hematofágní chování samic pomocí sekretu vylučovaného přídatnými žlázami. Tento sekret je součástí ejakulátu předávaného během páření do těla samice.

- 1) Nalézt takovou fixáž, která umožní zalévání studované tkáně do parafinu (či paraplastu) ale i do pryskyřice pro přípravu polotenkých řezů.
- 2) Srovnáním různých barvicích postupů vytypovat nejvhodnější metodu, která vytvoří co nejpřehlednější obraz studované tkáně.

3. METODIKA

Předložená práce pojednávající o histologickém zpracování některých tkání hmyzu se realizovala na samcích komárů *Culex pipiens* s.l.. Konkrétním druhem na kterém byla studie realizována byl druh *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, který je významným přenašečem filariozy.

3.1. Metodika chovu

Komáři se chovali v klimatizované místnosti při teplotě 25°C, fotoperiodě 16L : 8D a relativní vlhkosti 75%. Dospělci byli chováni v plexi boxech (**Olejníček, 1993**), kde byla umístěna miska s vodou pro kladení vajíček, kostka cukru (zdroj potravy zejména pro samce) a samicím byla v týdenních intervalech předkládána myš. Samice 3-4 dny po nasátí krve kladly vajíčka v jednotlivých snůškách (průměrný počet vajíček na snůšku 95). Z vykladených vajíček se po 48 hod embryonálního vývoje líhly larvičky 1. instaru, kterým byl podáván Pangamin jako zdroj potravy. Larvální vývoj je rozdělen do 4 stádií – instarů. Poté následuje stádium kukly trvající 48 hod. Jako první se líhnou samci charakterističtí velkými, silně větvenými tykadly. Z těchto základních chovů byl odebírán pokusný materiál a to ve stádiu kukly. Kukly byly umístěny po jedné do epruvet s malým množstvím vody. Z vylíhlých dospělců byli ke studiu používáni samci a samičky byly vráceny zpět do chovů.

3.2. Příprava materiálu pro histologické studie

3.2.1. Pitvy

Samečci byli z klece odchyceni pomocí exhaustoru a vloženi do nízké teploty sloužící jako anestetikum. Usnutí samečci byli pomocí entomologických špendlíků fixováni na parafinové podložce a pomocí jemných očních pinzet byl oddělen celý abdomen nebo jen vnitřní samčí pohlavní ústrojí a vložen do fixačního roztoku.

3.2.2. Fixace

Získané pohlavní orgány, příp. celé zadečky, byly tedy ihned vloženy do fixačního roztoku, kde byly ponechány podle typu použité fixáže určitou dobu

potřebnou k dokonalému prosycení tkáně fixačním činidlem. K fixování se používaly Bouin, modifikace Dubosque-Brasil a Carnoyho fixáž.

3.2.2.1. Bouin, modifikace Dubosque – Brasil

Byla používána fixáž Bouin, modifikace Dubosque-Brasil, popsaná Otto Jírovcem (**Jírovec, 1958**). Tato fixáž byla připravena smícháním 1g kyseliny pikrové, 150 ml 80% alkoholu, 15 ml kyseliny octové a 60ml 40% formolu. Takto připravený roztok byl uchováván v chladničce. Připravené vzorky (pohlavní orgány a zadečky) se v tomto fixačním roztoku ponechaly přibližně jeden týden.

3.2.2.2. Carnoy

Byla používaná příprava fixačního roztoku podle Jírovce (**Jírovec, 1958**): fixační roztok byl připraven z 6 ml 96% alkoholu, 3 ml chloroformu a těsně před použitím tohoto roztoku byla přidána koncentrovaná kyselina octová (1ml). Roztok se tedy připravuje v poměru 6 (alkohol) : 3 (chloroform) : 1 (kyselina octová). Fixační roztok byl ihned použit, vzorky byly v něm ponechány 5 minut při normální pokojové teplotě, nebo 10 minut v chladničce. Carnoyho fixáž byla pro každé použití připravována čerstvá.

3.2.3. Odvodnění (převádění) a zalití do paraplastu nebo do pryskyřice

Zaliti do paraplastu

Po uplynutí doby potřebné k nafixování objektu byly vzorky vyjmuty z fixačního roztoku a entomologickou pinzetou přeneseny do speciálních košíčku tvořeným nízkou skleněnou trubičkou, která byla na jednom konci opatřena síťovitým dnem.

Dalším krokem bylo tedy odvodnění a převádění do paraplastu. Postup uvádí tabulka č. 1.

Po těchto procedurách se naplnila zalévací komůrka z umělé hmoty paraplastem a do ní byly nahřátou pinzetou přenášeny vzorky. Zalévací komůrka se zchladila vložením do kelímku se studenou vodou, kde byla ponechána až do úplného ztuhnutí paraplastu.

Po ztuhnutí byl z krabičky vyjmut bloček se zalitým vzorkem.

Příprava pryskyřičných bločků

Vzorky fixované v fixáži Bouin – modifikace Dubosgue – Brasil byly zalévány kromě paraplastu i do pryskyřice. Postup je uveden v tabulce č. 6.

3.2.4. Příprava řezových preparátů

Parafinové řezy byly zhotovovány na automatickém mikrotomu značky Leica RM 2165. Nakrájené řezy byly pokládány na podložní sklíčko mírně potřené glycerin-bílkem (slouží k přilepení nakrájené tkáně na sklíčko) a pokapané destilovanou vodou. Takto připravená sklíčka se pokládala na elektrickou plotýnku vytemperovanou na 40° C, kde se na ohřáté vodě řezy napnuly. Sklíčka se ponechávala na plotýnce až do úplného odpaření vody. Takto připravené preparáty se dále zpracovávaly dle následujících postupů.

Polotenké pryskyřičné řezy byly zhotovovány na ultramikrotomu Reichert.

3.2.5. Odparafinování

Postup odparafinování uvádí tabulka č.2.

3.2.6. Barvení

Po odparafinování následovalo barvení. Byly používány 3 druhy barvicích postupů: barvení podle Malloryho, barvení v roztoku Mayerova hematoxylinu a barvení Harrisovým hematoxylinem. Polotenké řezy z materiálu zalitého do pryskyřice byly barveny toluidinovou modří.

3.2.6.1. Mallory

Pro použití tohoto barvení byly potřebné 3 barvicí roztoky: roztok ponceau-kyselý fuchsin, roztok 1% kyseliny fosfomolybdenové a konečně směs Mallory.

Pro přípravu barviva ponceau-kyselý fuchsin se smíchal 1 g ponceau de xylidine, 0,2g kyselého fuchsinu, 294ml destilované vody a 6ml kyseliny octové (ledové).

1% kyselina fosfomolybdenová byla připravena z 1g kyseliny fosfomolybdenové, která byla v odměrné baňce doplněna do 100 ml destilovanou vodou. Tento roztok byl následně ještě přefiltrován.

Směs Mallory byla připravena z 0,5g anilinové modři, z 1g oranže G, ze 2g kyseliny šťavelové a ze 100ml destilované vody. Tato směs se vařila 5 minut, nechala se ochladit a po ochlazení byla přefiltrována.

Postup barvení udává tabulka č. 3.

3.2.6.2. Mayerův hematoxylin

Dalším použitým barvením byl Mayerův hematoxylin, byl připravován podle Wolfa (**Wolf, 1954**). Jeho příprava představuje smíchání 1000 ml destilované vody, 1g krystalického hematoxylinu, 0,2g NaI a 50g kamence draselného. Po rozpuštění všech látek se přidalo 50g chloralhydrátu a 1g kyseliny citronové.

Pro barvení byla používána modifikace postupu podle Wolfa (**Wolf, 1954**). Postup podle Wolfa (**Wolf, 1954**) je uveden v tabulce č. 4.

3.2.6.3. Harrisův hematoxylin

Dalším použitým barvením je Harrisův hematoxylin, byl používán postup přípravy podle Jírovce (**Jírovec, 1958**). Roztok se připravuje následujícím postupem: 1g hematoxylinu se rozpustí v 10 ml 96% alkoholu. Za 24 hodin se přilije 200 ml 10% síranu hlinitodraselného a přidá se 0,5g červeného nebo žlutého HgO, zahřeje se k varu, rychle ochladí a za 24 hodin zfiltruje

Barveno bylo modifikovaným postupem podle Jírovce (**Jírovec, 1958**). Postup podle Jírovce je uveden v tabulce č.5.

3.2.7. Montování

Montování představuje kápnutí kapky montovacího media na sklíčko s řezy a překrytí krycím sklíčkem. Sklíčka se nechala uschnout a poté se mohla pozorovat pod mikroskopem.

3.2.8. Prohlížení pod mikroskopem

Poslední fází bylo prohlížení pod mikroskopem a fotografování mikroskopických obrazů. Fotografie byly zhotovovány digitální kamerou DP 50 firmy Olympus připevněnou na mikroskopu BX 51 firmy Olympus.

Podle výsledků barvení pak byly porovnávány jednotlivé metody barvení a též metody fixace, jejich vhodnost pro použití pro jednotlivé tkáně.

Tabulka č. 1 : Odvodnění a převádění do paraplastu

Procedura	Čas, podmínky
70% alkohol	3x po 8 hod
96% alkohol	3x po 8 hod
Alkohol: methylbenzoát	1 hod
Methylbenzoát	3x po 6 hod
Benzol	2x po 10 min
Benzol-parafín	1 hod, 45°C
Parafín	4x po 4-6 hod

Zdroj: (Gelbič a Knoz, 1972)

Tabulka č.2.: Odparafinování

Procedura	Čas
Xylen I	10 min
Xylen II	10 min
96% alkohol	3x po 5 min
70% alkohol	2x po 5 min
Destilovaná voda	5 min

Zdroj: (Jírovec, 1953)

Tabulka č. 3: Barvení Mallory - postup

Procedura	Čas
Směs ponceau – kyselý fuchsin	3,5 min
Destilovaná voda	Opláchnutí
1 % kyselina fosfomolybdenová	5 min
Destilovaná voda	Opláchnutí
Směs Mallory	10 min
96% alkohol	Opláchnutí
Xylen	Opláchnutí

Zdroj: upraveno podle (Jírovec, 1958)

Tabulka č. 4: Barvení Mayerovým hematoxylinem podle Wolfa

Procedura	Čas
Mayerův hematoxylin	3-6 min
Tekoucí voda	Vypírání, 10 min
Eosin nebo pikrofuchsin	Dobarvení

Zdroj: převzato z (Wolf, 1954)

Tabulka č. 5: Barvení Harrisovým hematoxylinem podle Jírovce

Procedura	Čas
Voda	Vyprání
Harrisův hematoxylin	1-10 min
Obyčejná voda	Ponoření
0,1% eosin nebo 1% kongočerveň, 1% orange G, van Gieson	dobarvení
Převedení do 96% alkoholu	-
Převedení do karbolxylolu	-
Převedení do xylolu	-
Převedení do balzámu	-

Zdroj: převzato z (Jírovec, 1958)

Tabulka č. 6: Příprava pryskyřičných bločků

Procedura	Čas
70% alkohol	Tak dlouho, dokud se neodstraní zbytky kyseliny pikrové
80% alkohol	15 min
90% alkohol	15 min
96% alkohol	15 min
Propylen oxid	15 min
Pryskyřice + propylen oxid 1:2	1 hod
Pryskyřice + propylen oxid 1:1	1 hod
Pryskyřice + propylen oxid 2:1	1 hod
Čistá pryskyřice = exikátor	24 hod
Zaléváme do zalévacích formiček a dáme do termostatu	24 hod

Zdroj: Gelbič, osobní sdělení, nepublikováno

4. VÝSLEDKY

Histologické a histochemické metody byly v této práci realizovány na tkáních samců komárů druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Používané fixační metody byly Carnoy a Bouin, modifikace Dibosque - Brasil. Tkáň byla zalévána do dvou médií – do pryskyřice a paraplastu. Tkáň zalitá do pryskyřice byla v rámci histochemického průkazu sacharidů barvena toluidinovou modří. Tkáň zalitá do paraplastu byla barvena Harrisovým hematoxylinem, Mayerovým hematoxylinem a Mallorym.

Ukázalo se, že obě fixáže se dají používat pro studium tkání komárů. Výhodnější se zdá být Bouin, modifikace Dubosque-Brasil, protože nehrozí přefixování studované tkáně. Fixační prostředek Bouin, modifikace Dibosque-Brasil se ukázal jako vhodný pro následné zalévání jak do parafinu (paraplastu), tak do pryskyřice. Tkáně fixované tímto prostředkem jsou např. na obrázku č. 1, 2, 4, 6, 7, 8.

Tkáně byly v Carnoyho fixáži ponechány 5 minut a nebo 10 minut v chladničce. Výsledné preparáty se pak zdály kvalitnější u všech barvení (Mallory, Harrisův a Mayerův hematoxylin) v případě kratší fixace Carnoyovým fixačním prostředkem – tj. na dobu 5 minut – bylo dosaženo většího rozlišení mezi jednotlivými strukturami. Fixáž Carnoy byla použita u tkání na obrázku č. 3, 5.

Malloryho barvení je podle zjištěných výsledků pro určité struktury vhodnější, buněčná jádra byla zbarvena růžově až červeně, vazivo a sekrety se zbarvily modře. Právě díky poskytování různorodého zbarvení struktur bude zřejmě vhodnější zejména pro přehledné preparáty, které umožňuje kvalitnější rozlišení jednotlivých komponent (obrázek č. 8). Samčí pohlavní orgány se zbarvily v modrém (místy až černém) odstínu, jednotlivé části pak v různém stupni tohoto zbarvení (obrázek č.3).

Postup barvení Harrisovým a Mayerovým hematoxylinem se v praxi upravil do následující podoby, která je uvedena v tabulkách č. 7 a 8.

Barvení Harrisovým a Mayerovým hematoxylinem se zdá být srovnatelné, preparáty se v obou případech zbarvily podobným způsobem. V případě barvení samčích pohlavních orgánů jsou pak obě dvě hematoxylinová barvení podobné barvení Mallorym, s tím rozdílem, že zde byly převážně jednotlivé struktury v závislosti na stupni diferenciaci zbarveny fialově až černě. Barvení samčích pohlavních orgánů

Harrisovým hematoxylinem je na obrázku č. 6, Mayerovým hematoxylinem je na obrázku č. 4 a 5. V případě přehledných preparátů poskytovala tato barvení u jednotlivých struktur opět zbarvení do fialové až černé barvy (Mayerův hematoxylin – obrázek č. 7). Jádra byly u obou těchto hematoxylinových barviv zbarvena do tmavě fialového až černého zbarvení. I když byl při obou těchto barveních hematoxyliny používán na dobarvení eosin, jeho použití se nijak neprojevilo, což je zřejmě způsobeno nevhodnou dobou diferenciování.

Zalévání do pryskyřice ve spojení s barvením toluidinovou modří (též histochemický průkaz pro sacharidy) se ukázalo jako vhodné pro znázornění jemnějších struktur, v samčích pohlavních orgánech byly viditelné jejich jednotlivé struktury (obrázek č. 1 a 2). Pryskyřice je též díky své tvrdosti vhodná k použití zejména u chitinu, jelikož v tomto případě na rozdíl od použití parafínu (paraplastu) téměř nedochází k poškození jeho struktur. Takové potrhání tkáně je viditelné např. na obrázku č. 3 nebo 5. Též použití toluidinové modří k histochemickému průkazu sacharidů v případě těchto tkání se ukázalo jako využitelné, tkáně se obarvily do modrého odstínu.

Tabulka č. 7: Barvení Mayerovým hematoxylinem - postup

Procedura	Čas
Eosin	1-3 min
Destilovaná voda	Opláchnutí
Mayerův hematoxylin	15 min
Voda z kohoutku	5 min proplachování
70% alkohol	2x po 3-5 min
96% alkohol	2x po 3-5 min
Xylen	2x po 3-5 min

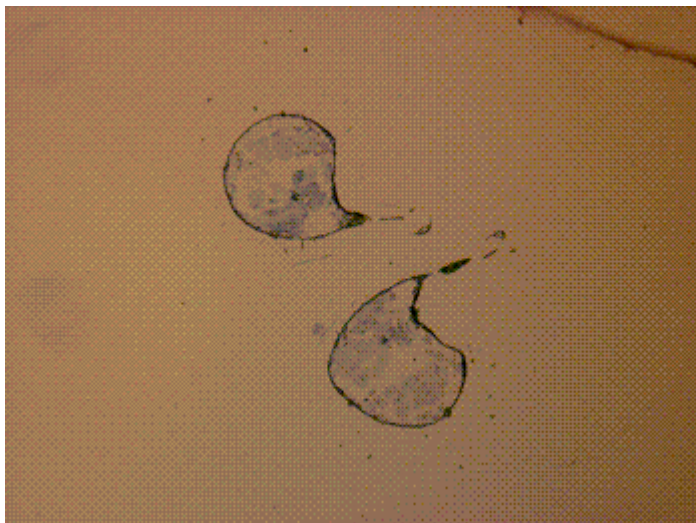
Zdroj: Upraveno podle (Wolf, 1954)

Tabulka č. 8: Barvení Harrisovým hematoxylinem - postup

Procedura	Čas
Eosin	1,5 min
Destilovaná voda	Opláchnutí
Harrisův hematoxylin	2 min
Voda z kohoutku	Proplachování
70% alkohol	2x po 3-5 min
96% alkohol	2x po 3-5 min
Xylen	2x po 3-5 min

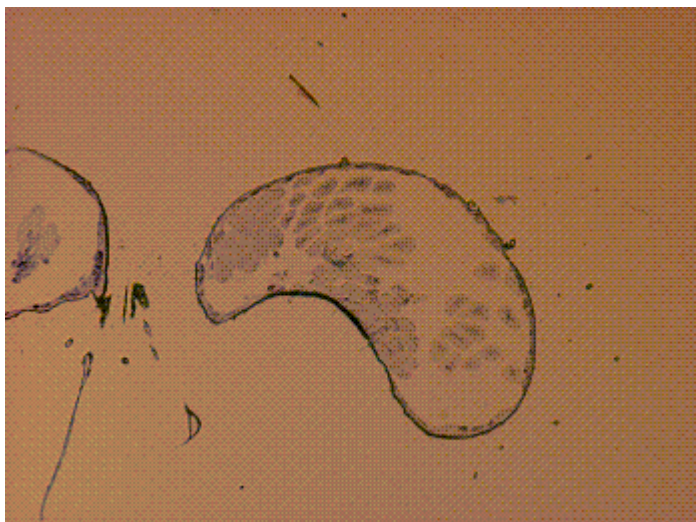
Zdroj: Upraveno podle (Jírovec, 1958)

Obrázek č. 1: Samčí pohlavní orgány (pryskyřice; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; toluidinová modř)



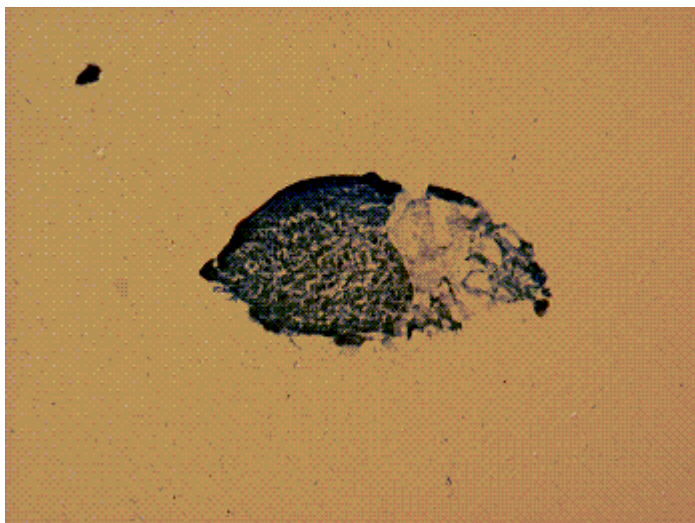
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 2: Samčí pohlavní orgány (pryskyřice; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; toluidinová modř)



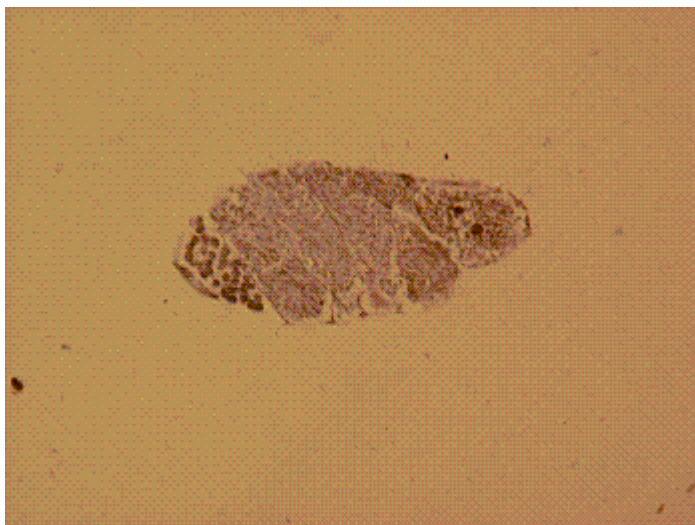
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 3: Samčí pohlavní orgány (paraplast, Carnoy 5 min, Mallory)



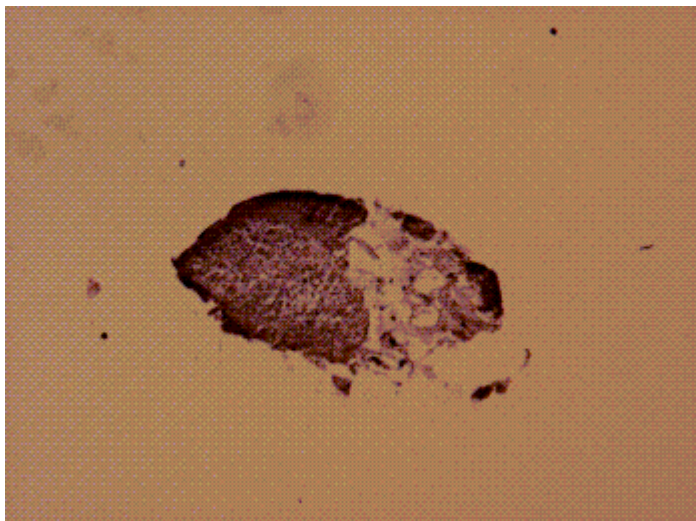
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 4: Samčí pohlavní orgány (paraplast; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; Mayerův hematoxylin)



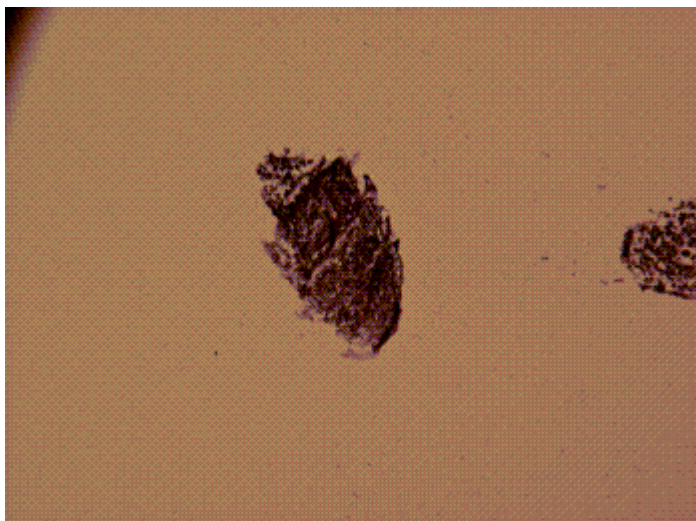
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 5: Samčí pohlavní orgány (paraplast, Carnoy 5 min, Mayerův hematoxylin)



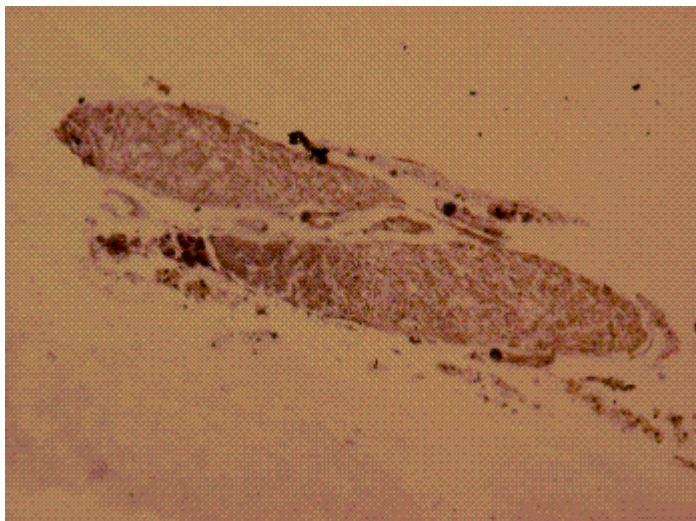
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 6: Samčí pohlavní orgány (paraplast; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; Harrisův hematoxylin)



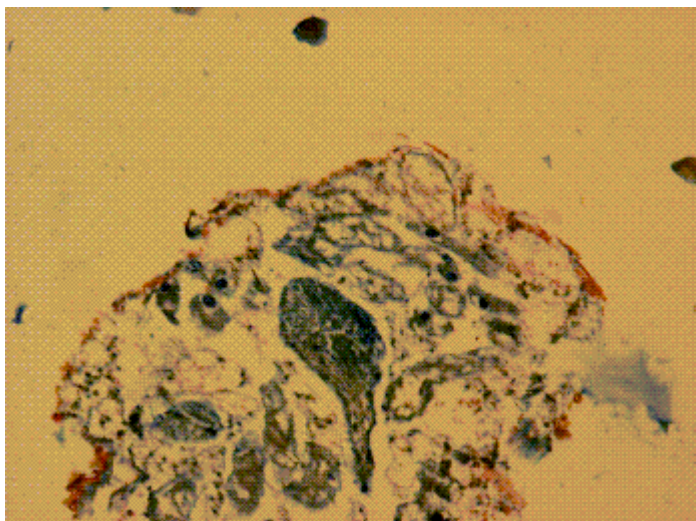
Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 7: Celé zadečky (paraplast; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; Mayerův hematoxylin)



Zdroj: Vlastní výzkum

Obrázek č. 8: Celé zadečky (paraplast; Bouin, modifikace Dubosgue – Brasil; Mallory)



Zdroj.:Vlastní výzkum

5. DISKUSE

Obě fixační metody jsou podle výsledků práce vhodné pro sledovaný účel - studium komárů. Bouinovu fixáž modifikaci – Dubosque - Brasil k podobným účelům použili například **Day (1955)**; **Hernández-Martínez et al. (2002)**. **Parks a Larsen (1965)** tento fixační roztok využívají ke studiu samičího pohlavního orgánu – vaječnicků. Prezentované výsledky v této práci dokazují, že je vhodná i při studiu samčích pohlavních orgánů. Nevýhodu Bouinovy fixáže – modifikace Dubosque – Brasil lze vidět v delší době fixace, naopak výhodu v tom, že ji není nutné pokaždé znovu připravovat a navíc, jak potvrdila delší doba uchovávání tkáně (více než týden) v tomto roztoku, je vhodná též pro uchovávání vzorků. Uchovávaná tkáň se neničí, nedochází k jejímu přefixování. Pouze je nutné zamezit jejímu odpaření, aby nafixovaná tkáň se neznehodnotila vysušením.

Carnoyho fixáž je fixační metoda, která je opět při studiu komárů využívána. **Yiping Lia et al. (2003)** tuto fixáž používají pro fixaci celých komárů. Tento fixační roztok je nutné připravovat znovu pro každé použití a doba fixace je krátká. Používání Carnoyho fixáže může být nevýhodné v tom, že lehce dojde k přefixování tkáně, která se během dalších zpracování drobí se a třísťí. **Wolf (1954)** potvrzuje, že při delším účinku se dostavuje smrštění a ztvrdnutí (zejména kolagenu). V této fixáži proto není možné tkáň přechovávat, je nutné ji převést do 70% alkoholu. Rovněž je nutné stanovení vhodné doby na prosycení studované tkáně fixáží. Toto vyžaduje zpracování větší množství materiálu a tím pádem se cela studie prodlužuje ale i prodražuje.

Malloryho barvicí metoda se převážně využívá pro barvení samičích reprodukčních orgánů hmyzu – např. dvoukřídlého hmyzu Diptera, Nematocera (**Abul – Nasr, 1950**), kam se systematicky řadí i komáři. **Parks a Larsen (1965)** pomocí této metody studovali vaječnický komárů. **Gelbič a Knoz (1972)** používali tuto barvicí metodu při srovnávacím studiu mozkových nervů u larev muchniček. Předložené výsledky této práce potvrzují, že je vhodná i pro studium samčích pohlavních orgánů komárů. Nevýhodu Malloryho metody je možné vidět v nutnosti její modifikace (zejména v používané době barvení u jednotlivých barvicích roztoků) pro každý objekt

zvláště, jak též uvádí například **Jírovec (1958)**. Barvení přesto poskytuje lepší rozlišení jednotlivých studovaných struktur. Nejproblematictější je po obarvení diferenciaci, která musí probíhat rychle a citlivě, aby nedošlo k vyplavování jednotlivých barviv tvořících vlastní barvicí roztok. Špatná diferenciaci má za následek vyplavení všech barev kromě modré.

Metody barvení Harrisovým a Mayerovým hematoxylinem jsou při studiu komárů opět využívány, i když Harrisův hematoxylin je používán zřejmě častěji. Přitom v této práci nebyla zjištěna vyšší vhodnost jednoho nebo druhého hematoxylinového barvení. Harrisův hematoxylin využívají ke studiu komárů např. **Lucarotti (1987)**; **Hernández-Martínez et al. (2002)**; **Yiping Lia et al. (2003)** aj. Většinou jsou preparáty dobarvovány eosinem. Tyto barvicí metody neposkytují takové barevné rozlišení jako Malloryho metoda.

Zalévání do paraplastu je, jak je uvedeno v této práci, vhodné při studiu komárů. Řada studií zabývajících se tímto tématem jej také hojně využívá - např. **Lucarotti (1987)**.

Zalévání do pryskyřice je spíše dominantní v elektronové mikroskopii (**Vacek, 1995**). **Land et al. (1997)** toto zalévací médium v elektronové mikroskopii využívají při studiu komárů v kombinaci s fixací 1% OsO₄ a barvením methylenovou modří. Tato práce ovšem dokazuje, že je zalévání do pryskyřice vhodné též pro světelnou mikroskopii a následné barvení toluidinovou modří, umožňuje pozorování jemnějších struktur samčích pohlavních orgánů. Metodu používá pro podobný účel – pro studium samčí přídavné žlázy **Pavlásek (2003)**. Navíc se pak kombinace zalévání do pryskyřice a barvení toluidinovou modří ukázala jako vhodná při histochemickém průkazu sacharidů.

6. ZÁVĚR

Předložená práce ukázala:

1) Obě fixační metody (Carnoy a Bouin – modifikace Dubosque – Brasil) jsou použitelné pro studium samčích reprodukčních orgánů komárů.

Bouin – modifikace Dubosque – Brasil se zdá být výhodnější díky skutečnosti, že v ní nehrozí přefixování tkáně a uchovávaná tkáň se neničí. Po použití tohoto fixačního prostředku lze zalévat tkáň jak do parafínu (paraplastu), tak do pryskyřice.

V případě Carnoyho fixáže je vždy potřebné stanovení doby na prosycení studované tkáně fixáží. Při delší době působení tohoto fixačního činidla (na rozdíl od Bouinovy fixáže – modifikace Dubosque – Brasil) lehce dochází k přefixování studovaného objektu a ta se následně během dalšího zpracování znehodnocuje, drobí a tříští.

2) Používané barvicí metody (Mallory, Harrisův a Mayerův hematoxylin) lze též pro studium komárů využívat, stejně tak pro samčí pohlavní orgány. V případě barvení reprodukčních orgánů jsou výsledky jednotlivých barvicích metod svou kvalitou srovnatelná.

Malloryho barvení je vhodné zejména pro přehledné preparáty, poskytuje různorodé zbarvení struktur a tak umožňuje kvalitnější rozlišení jednotlivých komponent. Buněčná jádra zbarvuje růžově až červeně, vazivo a sekrety modře. Metoda je využitelná i pro barvení samčích pohlavních orgánů - barví v různé intenzitě v modrém (místy až černém) odstínu.

Barvení Harrisovým a Mayerovým hematoxylinem si jsou velmi podobná, preparáty se v obou případech barví obdobným způsobem. V případě barvení samčích pohlavních orgánů lze pak obě dvě hematoxylinová barvení srovnávat s barvením Mallory, s tím rozdílem, že zde se jednotlivé struktury v závislosti na stupni diferenciaci barví převážně fialově až černě. Jádra se v případě obou těchto hematoxylinových barviv zbarví též do tmavě fialového až černého zbarvení. Tyto barvicí metody ovšem neposkytují takové barevné rozlišení jako Malloryho metoda.

3) I když je zalévání do pryskyřice spíše dominantní v elektronové mikroskopii, v této práci byla dokázána její využitelnost i v případě mikroskopie světlené. V kombinaci s následným barvením toluidinovou modří umožňuje pozorování jemnějších struktur samčích pohlavních orgánů. Stejně tak je použití této kombinace vhodné při histochemickém průkazu sacharidů, tkáň se barví do modrého odstínu.

Pryskyřice je navíc díky své tvrdosti vhodná k použití u chitinu, jelikož v tomto případě na rozdíl od použití parafínu (paraplastu) téměř nedochází k poškození jeho struktur.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABUL – NASR S.E. Structure and development of the reproductive systém of some species of nematocera (order diptera: suborder nematocera). *Phylosaphical Transactions of the Royal societa of London. Series B, biological Sciences.* 1950, vol. 234, no. 614, pp. 339-396.
- BANCROFT, J.D., STEVENS, A. *Theory and practice of histological techniques.* First published. New York: Churchil livingstone, 1996. 766s. ISBN 0-443-04760-X.
- BARTOŠOVÁ, D., HUSA, P., CHALUPA, P., KRBKOVÁ L., HOLČÍKOVÁ A. *Infekční lékařství.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 142s. ISBN 80-210-3791-1
- ČECH, S., HORKÝ, D. *Přehled obecné histologie.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 140s. ISBN 80-210-3854-3.
- ČECH, S., HORKÝ, D., LAUSCHOVÁ I., SEDLÁČKOVÁ M., ŠTASTNÁ J. *Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 1998. 162s. ISBN 80-210-1774-0.
- DAY, M.F. A new sense organ in the head of the mosquito and other nematocerous flies. *Australian journal of zoology.* 1955, vol. 3, no. 3, pp. 331 – 335.
- GELBIČ I., KNOZ J. Differences in the structure of the labrofrontal nerve in larvae of various groups of the family Simulidae (Diptera, Nematocera). *Acta ent. bohemoslov.* 1972, vol. 69, pp. 305 - 311.
- GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., DÁŇOVÁ, D. *Epidemiologie.* 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 299s. ISBN 80-246-1232-1.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ S., LANZ H., RODRGUEZ M. H., GONZÁLEZ – CERON L., THUTSUMI A. Cellular-Mediated Reactions to Foreign Organisms Inoculated into the Hemocoel of Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* 2002, vol. 39, no. 1, pp. 61-69 (9)
- HUSA, P., KRBKOVÁ, L., HOLČÍKOVÁ A. *Infectious diseases.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2006. 91s. ISBN 80-210-4116-1.

- JELÍNEK, R., DOSTÁL, M., LÍKOVSKÝ Z., HALAŠKOVÁ M., MAŇÁKOVÁ E., PETERKA M., PETERKOVÁ R., TITLBACH M., VELICKÝ J., ZEMANOVÁ Z. *Histologie embryologie*. [online]. [cit.2007-07-19]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>.
- JÍROVEC, O. *Zoologická technika*. 3. vydání. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1958. 314s.
- KNOZ J., OPRAVILOVÁ V. *Základy mikroskopické techniky*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 1992. 195s. ISBN 80-210-0473-8.
- KRAMÁŘ, J. *Fauna ČSR: Komáři bodaví – culicinae (řád: dvoukřídlí – diptera)*. Praha: Nakladatelství československé akademie věd, 1958.
- LAND M. F., GIBSON G., HORWOOD J. Mosquito eye design: conical rhabdoms are matched to wide aperture lenses. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*. 1997, vol. 264, no.1385, pp. 1183 – 1187.
- LANGROVÁ I., KURFÜRST J., VRABEC V., KUBÍK Š., BARTÁK M. *Pracovní sešit ze zoologie*. 2. přepracované vydání. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2005. 166s. ISBN 80-213-1428-1.
- LELLÁKOVÁ, F., ČERNÁ, Ž., HABROVÁ V., CHVÁLA M., STOKLASA J., VOHRALÍK V. *Zoologická technika*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 1992. 120s. ISBN 80-7066-669-2.
- LOBOVSKÁ, A. *Infekční nemoci*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2001. 263s. ISBN 80-246-0116-8.
- LUCAROTTI, C. J. Coelonomyces stegomyial infection in adult aedes aegypti. *Mycologia*. 1987, vol. 79 no.3, pp. 362-369
- MACEK, J. *Svět zvířat XI. Bezobratlí (2)*. 1. vydání. Praha: Albatros, 2001. 170s. ISBN 80-00-00918-8
- MAŇÁKOVÁ, E., SEICHERTOVÁ, A. *Metody v histologii*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002. 54s. ISBN 80-246-0230-X.
- OLEJNÍČEK, J. Plexiglas box system for mosquito rearing. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*. 1993, vol. 18, pp. 38-39.

- PARKS J. J., LARSEN J. R. A morphological study of the female reproductive system and follicular development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1965, vol. 84, no. 1, pp. 88 – 98.
- PAVLÁSEK J. *Vývoj a funkce samčí přídatné žlázy u komárů komplexu Culex pipiens*. České Budějovice: 2003. 19s. Diplomová práce na Biologické fakultě Jihočeské univerzity. Vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Ivan Gelbič, CSc.
- PODSTATOVÁ H. *Mikrobiologie – epidemiologie – hygiena*. 1. vydání. Olomouc: EPAVA, 2001. 285s. ISBN 80-86297-07-1
- SLÁDEK, Z. *Anatomie a histologie hospodářských zvířat: Přehled obrazů mikroskopovaných histologických preparátů*. 1. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2000. 58s. ISBN 80-7157-466-X.
- TITFORD, M. The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*. March 2005, vol. 80, no. 2, pp. 73 – 78 (6).
- VACEK, Z. *Histologie a histologická technika: Histologická technika II. část*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. 185s. ISBN 80-7013-202-7.
- WOLF, J. *Mikroskopická technika*. 2. vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954. 656s.
- YIPING LIA, HERNANDEZ-MARINEZ S., UNNITHANC G. C., FEYEREISEND R., NORIEGA F. G. Activity of the corpora allata of adult female *Aedes aegypti*: effects of mating and feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003, vol. 33, no. 12, pp. 1307-1315

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Komár – mosquito

Histologie – histology

Histochemie – histochemistry

Barvicí metody – stain technology

Mallory - Mallory

Hematoxylin – haematoxylin

Samčí pohlavní orgán – male reproductive organ