

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Histologické a histochemické studium samčí přídatné pohlavní
žlázy komára *Culex pipiens s.l.* jako modelového živočicha
lidské předstojné žlázy (lat. prostata)**

Bakalářská práce

Autor: Jakub Hodík

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

Datum vypracování: 2009-08-16

Histological and histochemical study of male accessory gonads of the mosquito *Culex pipiens* s.l. serving as a biological model for the human prostate.

ABSTRACT

This thesis is a comparative histological study of accessory gonads (prostate) in model animal males.

The animals compared included males of the mosquito species *Culex pipiens* s.l. as a representative of insects and males of the mouse as representatives of mammals. Furthermore, three staining methods applicable to histological examination of the prostate were compared.

Histological and histochemical investigation of the mosquito was performed on its abdominal part or on its prepared gonads. The urinary bladder with the prostate was prepared from the male mouse. The tissue was fixed in Bouin's fixative or in the Dubosque-Brasil modification. The fixed tissue was embedded in paraffin and sliced on a Leica rotary microtome. Two histological staining methods, viz. the Mallory method and the hematoxylin-eosin method, and one histochemical staining method, using paraldehyde-fuchsin light green orange G, were applied to the histological sections.

Staining after Mallory appeared to suit best the comparative histological examinations. This technique provided the best picture of the tissues and cells in the two species studied. Hematoxylin-eosin staining, popular for mammal tissues, was not very suitable for insect tissues because the cells were not stained to a sufficient extent. As regards the staining of the male gonads with paraldehyde-fuchsin light green orange G, the result was non-representative for either species.

The histological and histochemical comparative studies showed similar structures of the prostate and other organs of the male reproductive system.

For insects to be usable as model animals, many investigations focussing particularly on immunohistochemistry and electron microscopy with immunolabelling or in situ hybridization will have to be performed.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Histologické a histochemické studium samčí přídatné pohlavní žlázy komára *Culex pipiens s.l.* jako modelového živočicha lidské předstojné žlázy (lat. prostata) vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v přiloženém seznamu 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 podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi, CSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři na zajímavém tématu a za pomoc při vedení bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Barboře Kozelkové za rady udělované při metodické práci.

OBSAH

ÚVOD.....	- 7 -
1. SOUČASNÝ STAV	- 8 -
1.1. HMYZ JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS	- 8 -
1.2. POHLAVNÍ SYSTÉM.....	- 8 -
1.2.1. Anatomie mužských pohlavních orgánů	- 8 -
1.2.1.1. Varle (testis).....	- 9 -
1.2.1.2. Vývodné cesty varlete	- 9 -
1.2.1.3. Nadvarle (epididymis).....	- 9 -
1.2.1.4. Šourek (scrotum).....	- 10 -
1.2.1.5. Chámovod (ductus deferens).....	- 10 -
1.2.1.6. Provazec semenný (funiculus spermaticus).....	- 10 -
1.2.1.7. Měchýřkové žlázy (glandulae vesiculosae).....	- 11 -
1.2.1.8. Žláza předstojná (prostata).....	- 11 -
1.2.2. FYZIOLOGIE PROSTATY.....	- 11 -
1.2.3. PATOFYZIOLOGIE PROSTATY	- 12 -
1.2.3.1. Hyperplasie prostaty.....	- 12 -
1.2.3.2. Prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN).....	- 13 -
1.2.3.3. Prostatitis.....	- 13 -
1.2.3.4. Malakoplakie.....	- 13 -
1.2.3.5. Benigní myoadenomatózní hyperplazie	- 14 -
1.2.3.6. Sklerozující adenóza	- 14 -
1.2.3.7. Světlobuněčná kribriformní hyperplázie.....	- 15 -
1.2.3.8. Prostatická intraepiteliální neoplázie (PIN).....	- 15 -
1.2.3.9. Adenokarcinom prostaty (PAK).....	- 16 -
1.2.4. Histologie mužských pohlavních orgánů	- 17 -
1.2.4.1. Testis (varle).....	- 17 -
1.2.4.2. Vmezeřená tkáň varlete.....	- 19 -
1.2.4.3. Vývodné cesty varlete	- 20 -
1.2.4.4. Předstojná žláza (prostata)	- 21 -
1.2.5. Pohlavní systém samce komára <i>Culex pipiens</i>	- 21 -
1.2.6. Bioptická preparace prostaty.....	- 22 -
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	- 24 -

3. MATERIÁLY A METODY	- 25 -
3.1. METODIKA CHOVU	- 25 -
3.2. ODBĚR MATERIÁLU	- 25 -
3.3. FIXACE	- 26 -
3.4. ZALÉVÁNÍ DO PARAFÍNU	- 26 -
3.4.1. <i>Odvodňování</i>	- 26 -
3.4.2. <i>Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafin</i>	- 27 -
3.4.3. <i>Prosycení tkáně parafinem</i>	- 27 -
3.4.4. <i>Vlastní zalití do parafinu</i>	- 28 -
3.5. KRÁJENÍ PARAFÍNOVÝCH BLOČKŮ	- 28 -
3.6. NAPÍNÁNÍ A LEPENÍ PARAFÍNOVÝCH ŘEZŮ	- 29 -
3.7. BARVENÍ PARAFÍNOVÝCH ŘEZŮ	- 30 -
3.7.1. <i>Barvení Hematoxylin – Eozinem</i>	- 30 -
3.7.2. <i>Barvení dle Malloryho</i>	- 31 -
3.7.3. <i>Barvení Aldehydovým fuchsinem světle zelená oranž G</i>	- 32 -
3.8. MONTOVÁNÍ	- 34 -
3.9. MIKROSKOPIE	- 34 -
4. VÝSLEDKY	- 35 -
5. DISKUZE	- 41 -
6. ZÁVĚR	- 45 -
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 46 -
PŘÍLOHY:	- 51 -

Úvod

Téma Histologické a histochemické studium samčí přídatné pohlavní žlázy komára *Culex pipiens s.l.* jako modelového živočicha lidské předstojné žlázy (lat. prostata) jsem si zvolil zejména z důvodu vysokého nárůstu incidence rakoviny prostaty v posledních deseti letech. Nárůst činní přibližně o 100 %, jak je patrné na grafu 1, uvedeného v příloze. Incidence uváděna v literatuře činí 4% všech nádorových onemocnění (60 případů na 100 000 tisíc mužů) (**Dušek, 2006**). Dalším závažným a častým onemocněním je hyperplazie prostaty. Incidence onemocnění prostaty souvisí se stárnutím. Mikroskopicky prokazatelnou benigní hyperplazii prostaty (BHP) má ve třetí dekádě 8 % mužů, v páté dekádě již více než 40 %, v šesté 70 % a nad 80 let přes 80 % mužů (**Kawaciuk, 2002**). Mou prací bych chtěl přispět ke zlepšení poznání vzniku rakoviny prostaty, benigní hyperplazie prostaty a jiných patologických změn pozorovatelných v histologických řezech.

Ve své práci jsem pracoval s experimentálními zvířaty, která jsem využíval k histologické a histochemické studii prostaty. Histologická studie umožňuje zkoumat orgán a jednotlivé tkáně či buňky jako celek, dále umožní rozpoznat rozdíly ve stavbě hmyzí a savčí prostaty na mikroskopické úrovni. Histochemická studie dále umožní rozpoznat funkčně mikroskopickou stavbu prostaty hmyzu.

1. Současný stav

1.1. Hmyz jako modelový organismus

Komáři se vyskytují od oblastí tropů až po severská pásma. V České Republice se vyskytuje na 40 druhů komárů. Některé druhy komárů jsou známé převážně z epidemiologického hlediska. Přenášejí nebezpečné parazitární infekce (malárie, spavá nemoc) a virové infekce (virus Ťahyňa a West Nile virus, horečka Dengue). Významní mohou být i z hlediska výzkumného. Hmyz jako takový může být využíván místo pokusných savců.

I když se to nezdá, hmyz má podobné orgány jako lidé, například střevo, srdce, nervovou soustavu či vylučovací a pohlavní orgány. Všechny mají mnohem jednodušší stavbu, například organizace nervové soustavy hmyzu je jiná, necítí bolest, a to je jeden z důvodů, proč jsou vhodné jako modelové organismy. Některé pochody v jejich těle lze od sebe snadno oddělit a tím zpřístupnit vědeckému výzkumu.

Jeden z významných vědeckých postupů využívaných při studiu hmyzu je dekapitace. Jedná se o odstříhnutí řídicího centra hmyzu, tedy jeho mozku a hlavního zdroje hormonů. V tomto stavu lze na hmyzu sledovat, jak působí řízené pokusy například dodáváním hormonů.

Hmyz nám slouží jako modelový organismus a má to hned několik důvodů. Jednak jsou to důvody samozřejmě ekonomické, protože chov hmyzu je levnější než chov nějakých vyšších organismů, jako jsou třeba myši. Dále jsou to důvody etické.

1.2. Pohlavní systém

1.2.1. Anatomie mužských pohlavních orgánů

Mužské pohlavní orgány zahrnují vnitřní (*organa genitalia masculina interna*) a zevní (*organa genitalia masculina externa*). Mezi mužské vnitřní pohlavní orgány patří

varlata (*testes*), nadvarlata (*epididymis*), chámovody (*ductus deferentes*), měchýřkové žlázy (*glandulae vesiculosae*) a vypuzovací kanálky (*ductus ejaculatorii*). Dále prostata a močová trubice (*urethra maskulina*). Do *urethry* ústí párové žlázy (*glandulae bulbourethrales*) (Čihák, 2001).

1.2.1.1. Varle (*testis*)

Testis (řec. *orchis*) je párový orgán, mužská pohlavní žláza. Je uloženo ve *scrotu*. K jeho zadní straně přiléhá protáhlé nadvarle. Hilus varlete je místo vstupu a výstupu cév a výstupu vývodných kanálků na zadním okraji varlete. Povrch varlete je kryt *tunica vaginalis testis*, *periorchium* a *tunica albuginea* (Čihák, 2001).

1.2.1.2. Vývodné cesty varlete

Vývodné cesty z varlete začínají jako *tubuli seminiferi recti* z jednotlivých lalůček varlete. Tyto přímé kanálky se scházejí u hilu varlete, navzájem se propojují a vytvářejí *rete testis*. Ze zadu se do *rete testis* přidává vazivo z *tunica albuginea* a zředu do něho přecházejí přepážky oddělující lalůčky varlete (Čihák, 2001).

1.2.1.3. Nadvarle (*epididymis*)

Nadvarle je protáhlý esovitý útvar nasedající na horní pól varlete. Rozeznáváme na něm hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*), jež pokračuje v chámovod. Ocas je společně s varletem připoutána ke *scrotu* pomocí "*ligamentum scrotale*". Hlava se skládá z kanálků vytvářejících nadvarleci lalůčky (*lobuli epididymidis*) pokračující v nadvarleci vývod (*ductus epididymidis*), který tvoří tělo a ocas. Jako pozůstatky vývoje nacházíme v okolí varlete a nadvarlete rudimentární orgány - *appendix epididymidis*, *appendix testis*, *paradidymis*, *ductuli aberantes* (HERÁČEK, 2009).

1.2.1.4. Šourek (*scrotum*)

Scrotum je vak hruškovitého tvaru, tvořený kůží a podkožním vazivem a zavěšený pod symfysou za kořenem penisu (Čihák, 2001). Zakládá se párově, a proto je zcela rozdělen pomocí přepážky (*septum scroti*), projevující se na povrch jako šourkový šev (*raphe scroti*) (HERÁČEK, 2009).

Septum scroti, střední, sagitálně postavená vazivová přepážka, rozděluje *scrotum* ve dvě dutiny, z nichž každá obsahuje varle v jeho obalech. Kůže *scrota* je tenká, pigmentovaná, v dospělosti s řídkými silnými chlupy, s velkými mazovými žlázami a s množstvím potních žláz (Čihák, 2001).

1.2.1.5. Chámovod (*ductus deferens*)

Ductus deferens pokračuje z nadvarlete jako silná svalová trubice. Spojuje nadvarle s močovou trubicí. Prochází *scrotem* spolu s cévami varlete a vytváří *funiculus spermaticus*, provazec semenný (Liepert, 2006).

Poté prochází tříselným kanálem skrze *canalis inguinalis* a po výstupu z *anulus inguinalis profundus* probíhá chámovod subperitoneálně, zahýbá dorzálně a mediálně, posléze i kaudálně za zadní stěnu močového měchýře kde se kříží s *ureterem*. Za měchýřem se chámovod rozšiřuje ve vřetenovitý útvar – *ampulla ductus deferentis*, poté se opět zužuje a po velmi krátkém úseku se spojuje s vývodem semenného váčku v *ductus ejaculatorius*. *Ductus deferens* se nakonec stáčí kaudálně a mediálně k prostatě (UPOL.CZ).

Prochází prostatou a vstupuje zezadu do močové trubice. Tam ústí na bocích hrbolku zvaného *colliculus seminalis* (UPOL.CZ).

1.2.1.6. Provazec semenný (*funiculus spermaticus*)

Funiculus spermaticus je svazek útvarů, které doprovázejí a obklápějí chámovod od jeho výstupu z hlavy nadvarlete až do průchodu inguinálním kanálem. Provazec obsahuje chámovod, tepenné a žilní pleteně, nervové pleteně, mízní cévy a nitkovité zbytky peritoneální výchlípky (Čihák, 2006).

Primární mezenchymální zhoubné nádory semenného provazce jsou velmi vzácným onemocněním, poprvé popsáným v roce 1845. Dle dostupných zdrojů bylo do roku 1978 dokumentováno v literatuře pouze 212 případů tohoto onemocnění. Vyskytují se u adolescentů, a dále pak především u mužů nad padesát let, zatím nebyl publikován liposarkom s metastázami (Vágner, 2008).

1.2.1.7. Měchýřkové žlázy (*glandulae vesiculosae*)

Glandulae vesiculosae jsou párové přídavné žlázy mužského pohlavního aparátu, označované též jako *vesiculae seminales*. Mají protáhlý tvar a jsou uloženy šikmo laterokraniálně vzhůru, za zadní stěnou močového měchýře nad prostatou, laterálně od ampulárního úseku *ductus deferens* a rovnoběžně s ním (Čihák, 2006).

1.2.1.8. Žláza předstojná (*prostata*)

Prostata je přídavná pohlavní žláza muže, uložená kolem začátku močové trubice, těsně pod močovým měchýřem. *Prostata* má tvar komolého, předozadně mírně oploštělého kužele, obráceného bází vzhůru k měchýři. Baze prostaty těsně přiléhá k močovému měchýři. Do baze se vtačuje *cervix vesicae*. Hrot prostaty míří dopředu dolů a dosahuje k *diaphragma urogenitale*.

Prostatou od baze k *apexu* probíhá úsek močové trubice. *Urethra* pak dále pokračuje samostatně. Uvnitř *prostaty* probíhá *urethra* blíže přední stěně a dělí *prostatu* na preurethrální část a retrourethrální část.

Mezi *rectum* a *prostatu* je vloženo *septum rectovesicale*. Je to vazivová ploténka do níž jsou také vnořeny *glandulae vesiculosae*.

1.2.2. Fyziologie prostaty

Prostata dodává 15—30% objemu tekutiny ejakulátu. Její sekret je tekutý, bezbarvý, kyselá reakce (pH 6,4). Obsahuje zinek (v glykoproteinovém komplexu), kyselinu

citrónovou, prostaglandiny, polyaminy — spermin a spermidin, imunoglobuliny, kyselou fosfatasu a proteasy.

Zinek ovlivňuje metabolismus testosteronu v prostatě, mimo to se v komplexu příkládá na buněčnou membránu spermií. Kyselina citrónová ve formě citrátů má funkci pufru. Prostaglandiny stimulují svalovinu dělohy a přispívají tím k transportu spermií. Spermin ovlivňuje pohyblivost spermií a jejich schopnost oplození vajíčka (krystaly sperminu lze prokázat v zaschlém ejakulátu, což má význam pro soudní lékařství). Proteasy působí ředění ejakulátu.

Prostata je (jako ostatní přídatné pohlavní žlázy) sensitivní na hormony. Testosteron se ve stromatu prostaty mění pomocí 5- α -reduktasy v účinnější dihydrotestosteron. Ten účinkuje na stroma i na žlázové buňky a udržuje prostatu v činnosti (**Jarolím, 2000**).

1.2.3. Patofyziologie prostaty

1.2.3.1. Hyperplazie prostaty

Častým onemocněním prostaty je hyperplazie žláz oblasti vnitřní zóny, pro zmnožení žlázové tkáně označovaná též jako adenom prostaty. Vyskytuje se ve vyšším věku (někdy však již po 40. roce). Mechanicky omezuje vyprazdňování močového měchýře.

Příčinou je věkem snížená schopnost prostaty odbourávat vznikající dihydrotestosteron, jehož pak ve stromatu přibývá. To vyvolává růst žlázek a jejich novotvorbu ve vnitřní zóně. Dříve se předpokládalo, že tento proces postihuje převážně *lobos medius*. Není tomu tak vždy. V případech, kdy je *lobos medius* postižen a rychle se zvětšuje, může vzhledem k jeho poloze dojít k situaci, že kraniálně vyklene sliznici v oblasti *uvula vesicae* a zezadu ji překlopí přes *ostium urethrae internum*. Dojde pak k ventilovému efektu. Tlak tekutiny v měchýři tiskne vyklenutou sliznici do *ostium internum*, které uzavírá tím pevněji, čím více tlak v přeplněném měchýři stoupá.

Pokud se v prostatě objeví nádorové bujení, vyskytuje se převážně v zevní zóně a je podpořeno androgeny. Jeho průvodním jevem je zvýšená produkce kyselé fosfatasy, jejíž hladina v krvi je pak diagnostickou pomůckou a také testem úspěšnosti léčby nádoru.

Karcinom prostaty (KP) je v současné době považován za jeden z hlavních medicínských problémů v mužské populaci. V posledních letech došlo k významnému nárůstu incidence KP. V Evropě tvoří 11 % všech karcinomů u mužů, v EU umírá na KP 9 % ze všech pacientů, kteří na karcinom umírají (Lukeš, 2009).

1.2.3.2. Prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN)

Jedná se o intraepiteliální neoplastické změny vývodů a acinů prostaty, které dělíme na PIN nízkého stupně a PIN vysokého stupně. Změny tohoto typu jsou obecně uznávány za předchůdce vlastního karcinomu prostaty (Lukeš, 2009).

1.2.3.3. Prostatitis

Histologicky pojem *prostatitidy* znamená přítomnost tkáňové infiltrace zánětlivými buňkami. Obvykle se hodnotí popisně podle jejich přítomnosti (např. neutrofilních leukocytů), mononukleárních leukocytů (lymfocytů, makrofágů, plazmatických buněk), eozinofilních leukocytů nebo granulomů. Podle charakteru infiltrace, dalších změn (edém, hyperemie, jizvení atd.) a spektra buněk lze zánět histologicky charakterizovat jako akutní nebo chronický (Belej, 2007).

1.2.3.4. Malakoplakie

Malakoplakie prostaty je velmi vzácná, velká většina případů je spojena s infekcemi močového traktu způsobených *E. coli*.

Histologický obraz odpovídá nálezům *malakoplakie* v močovém měchýři či ledvině. Problematická je pouze diagnostika tzv. časně *malakoplakie*, kdy je infiltrát tvořen převážně histiocyty s eosinofilní cytoplasmou a kdy velmi věrně napodobuje *adenokarcinom prostaty*. Imunohistochemicky lze snadno prokázat histiocytární povahu léze (Hes et al., 2008).

1.2.3.5. Benigní myoadenomatózní hyperplazie

Benigní myoadenomatózní hyperplazie (BMH) patří k velmi častým nálezům u populace starších mužů. U mužů ve věkovém rozmezí 50-60 let věku se udává zvětšení prostaty u 50 % pacientů. Výsledky z pitevniho materiálu hovoří o prevalenci 8 % u mužů ve věku mezi 40-50 lety a 90 % u mužů kolem 80 let.

Histologický obraz není zcela jednotný. Často je obraz v drobných a arteficiálně poškozených částkách získaných při transuretrální resekci necharakteristický.

Malé noduly mají většinou převážně stromální komponentu tvořenou obvykle řídkou mesenchymální tkání či hladkou svalovinou. U hladkosvalových nodulů je nutné odlišit *leiomyom* prostaty.

Dále je možné nalézt útvary připomínající *fibroadenom* prsu či *fyloidní tumor*. V rámci *hyperplazie* jde o drobné, převážně mikroskopické útvary.

Velké noduly jsou z větší části tvořeny adenomatózní tkání. Tvořeny jsou malými i velkými aciny. U některých větších acínů je možné nalézt papilární projekce do lumen, někdy s fibrovaskulárním stromatem. V okolí acínů jsou často přítomné denzní převážně lymfoplasmocytární zánětlivé infiltráty (Hes et al, 2008).

1.2.3.6. Sklerozující adenóza

Termín sklerozující adenóza použili poprvé Young a Clement v roce 1987, pro velkou podobnost popisovaného prostatického procesu s obdobnou lézí v prsu. Velkou část případů sklerozující adenózy (SA) tvoří vedlejší nálezy v materiálu z prostatektomií. Jde obvykle o lézi, která je svým rozsahem velmi malá.

Při malém zvětšení dominuje nález pruhů a nakupení žlázek či jednotlivých epitelových buněk v prolifерujícím stromatu. V menším počtu případů je stroma edematózní či myxoidní. Afekce je většinou velmi dobře ohraničená. Ovšem na okraji může vytvářet dojem invazivního růstu do stromatu. V okolí SA jsou často hojné větvenovité stromální buňky. Žlásky SA bývají ohraničené eosinofilní hyalinní tkání, což je pro SA velmi typické.

Buňky SA obvykle postrádají výrazné atypie či jádérka. Mitotická aktivita u SA je většinou nulová, avšak sledování přítomnosti mitózy není příliš přínosné (**Hes et al, 2008**).

1.2.3.7. Světlobuněčná kribriformní hyperplázie

Světlobuněčná kribriformní hyperplázie (SKH) se vyskytuje typicky v centrální části prostaty. Spadá do spektra benigní hyperplázie prostaty. Je tvořena epiteliálními buňkami se světlou cytoplasmou, malými jádry a nevýraznými malými jádérky. Vrstva bazálních buněk je přítomná a ve většině případů je velmi nápadná.

Ovšem vrstva basálních buněk někdy může být inkompletní, zvláště na tangenciálních řezech. Na šikmém řezu rovněž někdy zaniká kribriformní architektura a struktury SKH mají charakter světlobuněčných hnízd (**Hes et al, 2008**).

1.2.3.8. Prostatická intraepiteliální neoplázie (PIN)

V současné době se rozeznávají dvě kategorie PIN: „low-grade“ a „high-grade“.

V mladších věkových kategoriích se spíše vyskytují „low-grade“ PIN, kdežto procento „high-grade“ PIN vzrůstá společně s věkem. Rovněž existují klinicko-patologické studie, které odhadují více jak desetiletou periodu mezi přítomností „low-grade“ PIN a vznikem invazivního karcinomu.

PIN je definována jako intraluminální proliferace sekretorických buněk s cytologickými atypiami, místy neodlišitelnými od buněk karcinomu. Mohou být přítomné cytologické atypie bez zvýšené celulizace.

PIN lze zachytit ve 3 základních růstových typech:

1. Buňky PIN nahradí normální epitel žlázek a zůstane zachována jen vrstva bazálních buněk. PIN tak svým růstem napodobuje intraduktálně se šířící prostatický adenokarcinom (PAK).
2. PIN invazivně roste přes stěnu ductu či acinu.
3. Buňky PIN rostou mezi bazálními buňkami a buňkami sekretorické vrstvy.

Další členění využívá sledování celkové architektury. Rozeznávají se následující architektonické varianty: „trsovité“ (tufting), mikropapilární, kribriformní a ploché.

Mezi vzácné podtypy PIN patří PIN s mucinózní cytoplasmou (včetně prstenčitých buněk), malobuněčná PIN s neuroendokrinními rysy.

Hlavním diagnostickým znakem pro stanovení PIN je vedle architektury tvar jader. Jádra jsou zvětšená, hyperchromatická s nepravidelným chromatinem, parachromatinovým projasněním, s nepravidelnou jadernou membránou a přítomná jsou zvětšená jádérka. Paradoxně jádra u „high-grade“ PIN jsou relativně monomorfní, oproti situaci u „low-grade“ PIN. Jádérka jsou výrazná, nepravidelná, občas mnohotná.

Cytoplasma je obvykle lehce amfofilní a granulární, někdy eosinofilní či vodojasná. V cytoplasmě se může nacházet amorfní eosinofilní sekrece, eosinofilní krystaloidy, *corpora amylacea* a vzácně lipofuscin. V lumen žlázek je někdy přítomen mucin. Dokumentována byla rovněž mucinózní metaplázie v buňkách lemujících PIN (**Hes et al, 2008**).

1.2.3.9. Adenokarcinom prostaty (PAK)

Patří v našich zeměpisných šířkách k velmi častým onemocněním. PAK je velmi vzácný ve věku do 40 let, poté jeho incidence zvolna vzrůstá. Pro Českou Republiku nebyla studie prevalence dosud zpracována. V současné době probíhají diskuse o možném zavedení screeningu PAK. Je poměrně velký rozpor mezi nálezy tzv. latentních PAK při pitvách a výskytem nádorů s klinickou symptomatologií. Prevalence v pitevním materiálu dosahuje až 80% u mužů.

Histologický vzhled PAK se liší podle gradů. Obecně platí, že PAK je tvořen malými nahromaděnými žlázkami, které jsou relativně uniformní. Někdy vytváří glomeruloidní struktury.

Dále je nutné zaměřit se na invazi suspektních žlázek. Podezřelé jsou žlásky infiltrující mezi jednoznačně benigní žlázkou, dále glandulární struktury tvořící pruhy, splývající ve větší celky či naopak jednotlivé buňky mezi normální prostatickou tkání. Vždy je vysoce suspektní, nepodaří-li se prokázat basální vrstvu buněk. U řady dalších afekcí je

basální vrstva nesouvislá. Důležitý je nález buněk s výrazně odlišnou cytoplasmou, než v okolních benigních žlázkách, dále buněk s amfofilní a vodojasnou cytoplasmou. V lumen žlázek PAK se nachází modravý hlen, jemně vločkovitý růžový materiál, krystaloidy či nekrotická hmota (Hes et al., 2008).

1.2.4. Histologie mužských pohlavních orgánů

1.2.4.1. Testis (varle)

Varle má stavbu složené tubulózní žlázy. Povrch varlete je obalen silnou blánou z kolagenního vaziva, zvanou *tunica albuginea*, od níž vybíhají dovnitř výběžky vaziva, jež rozdělují varle na malé lalůčky v počtu 200 – 300 (Vacek, 1995). Zvlnění kolagenních vláken v *tunica albuginea* dovoluje její rozšiřování při erekci (Kelly, 1999).

Každý lalůček je složen z velkého počtu semenoplodných kanálků (*tubuli seminiferi contorti*), jsou to mnohočetně stočené kanálky, kterých je více při bázi lalůčku a ke hrotu lalůčku se sbíhají v jeden kanálek (Čihák, 2001). Semenotvorné kanálky jsou vystlány složitým víceřadým epitelem (Junqueira et al., 1999). V kanálcích se tvoří mužské pohlavní buňky spermie. Stěna kanálků je složena z tenké vazivové blány, na kterou nasedá několik vrstev semenných buněk (Vacek, 1995). Zevně je tubulus obklopen vrstvičkou vaziva, na jejímž vnitřním okraji jsou myeloidní buňky, podobné buňkám hladkého svalstva (Čihák, 2001). Semenné buňky jsou kulovitěho tvaru a mají kulovité jádro. Postupně se dělí a nově vzniklé buňky se posouvají k vnitřnímu povrchu kanálku a nakonec se přeměňují v bičíkovité buňky spermie (Vacek, 1995).

Sertoliho buňky jsou mezi sebou spojeny zvláštním typem mezibuněčných těsných kontaktů, tvořících bariéru mezi vyvíjejícími se pohlavními buňkami a prostorem mezi kanálky, kde probíhají cévy. Vzhledem k přítomnosti této bariéry nemohou proteiny produkované vyvíjejícími se pohlavními buňkami do prostorů mezi semenoplodnými kanálky, odtud do krve a lymfy a indukovat tvorbu protilátek proti pohlavním buňkám. Porušení této bariéry může být příčinou neplodnosti antigenní povahy.

Mezi semennými buňkami jsou uloženy podpůrné buňky Sertoliho. Jsou to podlouhlé, oploštělé buňky pyramidového tvaru s měchýřkovitým jádrem s velkým nukleolem. Ve světelném mikroskopu jsou hranice Sertoliho buněk málo zřetelné v důsledku toho, že jsou opatřeny četnými postranními výběžky. Výběžky Sertoliho buněk jsou spojeny speciálními mezibuněčnými kontakty (**Junqueira et al., 1999, Vacek, 1995**).

Histopatologický výzkum provedený u pacientů s „Peyronie's disease“ prokázal nežádoucí přeměny kolagenního vaziva v *tunica albuginea* (**Anafarta, 1994**). Peyronie je nemoc lokalizována jako poruchy pojivové tkáně. Způsobuje poruchy topoření penisu. Vede k buněčné proliferaci a nadměrné produkci extracelulární matrix v *tunica albuginea*.

Budoucí zdokonalování studia zvířecích modelů by mohlo přispět k podrobnějším znalostem o patofyziologii Peyronieovy choroby a fibromatoses obecně. Navíc zvířecí model může v budoucnu umožnit větší připravenost v hodnocení terapeutické intervence Peyronieovy choroby (**Mulhall, 2004**).

Nádory varlat patří mezi vzácné onemocnění. Většinu nádorů varlat představuje heterogenní skupina germinálních nádorů - od forem benigních po vysoce maligní nádory. Spektrum histologických typů se mění v závislosti na věku pacienta v čase diagnózy.

U více než 80 % nádorů v dospělém věku byly v okolním parenchymu varlete přítomny oblasti intratubulární neoplazie – karcinomu in situ (CIS). CIS znamená přítomnost atypických buněk podobným germinálním v semenotvorném epitelu nebo lumen stočených kanálků testis. Přítomnost CIS v bioptickém materiálu znamená zvýšené riziko vzniku terminálního nádoru varlete (**Bajčiová, 2007**).

Primární tumory varlat patří k nejčastější malignitě mužů mezi 15.–35. rokem života (**Novák, 1998**).

Sekundární tumory orgánů *scrota* jsou vzácnými až raritními nálezy. Byla prokázána metastáza karcinomu žaludku do obalů varlete a nadvarlete, primární tumor byl inoperabilní a generalizovaný v peritoneální dutině. Podle literárních údajů nejčastěji do orgánů *scrota* metastazují nádory plic, prostaty a gastrointestinálního traktu (GIT). Pacienti s anamnézou

tumoru plic, prostaty či GIT mají vyšší riziko rozvoje metastázy ve *scrotu* (**Palička, Domes 2005**).

Metastázy solidních tumorů do orgánů *scrota* bývají v urologické praxi vzácnými nálezy. Lokalizace v obalech varlete a nadvarlete je v literatuře považována za extrémně raritní (**Blefari F, Risi O, Pino P., 1992**).

Nádor varlat je složen z několika typů tkání, které reprezentují různé germinální vrstvy (entoderm, mezoderm a ektoderm). Pokud tkáň teratomu reprezentuje pouze entoderm či ektoderm, bývá označován jako tzv. monodermální teratom. Elementy reprezentující jednotlivé germinální vrstvy mohou být zralé, či nezralé, případně se mohou vyskytovat v kombinaci (**O. Hes, M. Hora, H. Veličkinová, M. Michal, 2006**).

V teratomech bývají nejčastěji přítomny struktury epidermis, dermis a kožních adnex, často bývá přítomna nervová tkáň. Rovněž bývají obvykle zastoupeny různě modifikované sliznice gastrointestinálního či respiračního systému. Na rozdíl od ovariálních teratomů bývá zřídka přítomen parenchym štítné žlázy, vzácně jsou zaznamenány struktury parenchymu ledviny, prostaty, jater či slinivky (**Friedman NB, Moore RA. 1946, Unger PD, Cohen EL, Talerman A. 1998**). Z mezodermy bývá přítomna hladká svalovina (**Damjanov I. 1997, Waxman M, Vuletin JC, Pertschuk LP et al. 1982**).

1.2.4.2. Vmezeřená tkáň varlete

Vmezeřená tkáň varlete vyplňuje prostory mezi kanálky a sestává z řídkého fibrilárního vaziva, bohatého na fibroblasty, žírné buňky a mikrořágy. Ve vazivu jsou obsaženy nervy, krevní a lymfatické cévy (**Vacek, 1995**). Kapiláry jsou fenestrovány a dovolují volnou pasáž makromolekul, jako jsou krevní bílkoviny. Bohaté lymfatické cévy způsobují, že složení tkáňové tekutiny a lymfy izolované z varlete je prakticky totožné (**Junqueira et al., 1999**).

1.2.4.3. Vývodné cesty varlete

Na konci *tubuli seminiferi* se lumen zužuje a pokračuje v krátkém přímém segmentu, označovaném jako *tubulus rectus*. Tyto přímé tubuly propojují semenotvorné kanálky s labyrintem epitelových vývodů vytvářejících *rete testis*. Rete umístěné ve vazivu mediastina je připojeno k horní části *epididymis* prostřednictvím 10-20 *ductuli efferentes* (Junqueira et al., 1999).

Tubuli seminiferi sestávají z tuniky z fibrózního vaziva, dobře vytvořené bazální laminy a složitého zárodečného neboli semenotvorného epitelu. Fibrózní *tunica propria* obalující semenotvorné kanálky je složena z několika vrstev fibroblastů. Nejvnitřnější vrstva přiléhající k bazální lamině sestává z oploštělých myoidních buněk, které mají charakter hladkého svalstva (Junqueira et al., 1999).

Vývodné cesty vycházejí z varlete v podobě spirálovitě stočených kanálků (*ductuli efferentes*), jež vyplňují hlavu nadvarlete. Jsou vystlány jednak kubickým epitelem vylučujícím sekret, jednak cylindrickým epitelem s řasinkami, takže na průřezu mají kanálky hvězdicovitý tvar. Tyto kanálky se postupně spojují v jediný dlouhý klikatý kanálek (*ductus epididymidis*) tvořící tělo a ocas nadvarlete a navazující na chámovod (*ductus deferens*). V kanálcích nadvarlete se hromadí spermie a nabývají tu plné funkční zralosti.

Chámovod (*ductus deferens*) probíhá v semenném provazci (*funiculus spermaticus*). Jeho stěna se skládá ze sliznice, pokryté dvouřadým cylindrickým epitelem, a z vrstvy kruhovitě a podélně uspořádaných snopců buněk hladkého svalstva. V předstojné žláze se chámovod spojuje s vývodem semenných váčků a ústí pak společně do močové trubice.

Semenné váčky (*vesiculae seminales*) mají podobu stočených trubicovitých útvarů, jejichž stěna je složena ze sliznice tvořící četné rozvětvené řasnaté výběžky, pokryté jednovrstevným až dvouřadým kubickým epitelem, vylučujícím hustý, lepkavý sekret. Pod sliznicí je vazivově svalová vrstva, složená z kolagenního vaziva a ze snopců buněk hladkého svalstva.

1.2.4.4. Předstojná žláza (prostata)

Povrch prostaty tvoří vazivový obal, *capsula prostatica*. Ta zahrnuje dvě vrstvy vaziva, *capsula propria* a *capsula periprostatica*. *Capsula propria* je pevně srostlá s vazivem a s hladkou svalovinou prostaty. *Capsula periprostatica* jako husté vazivo obaluje zvenčí prostatu i s *plexus prostaticus* a současně poutá prostatu k okolí.

Ze stavebního a praktického hlediska se prostata člení na zóny žláz. Periuretrální zóna obsahuje slizniční žlázy a obklopuje těsně *urethru* v kraniálních dvou třetinách prostaty nad *colliculus seminalis*. Vnitřní zóna obsahuje submukosní žlázy a rozprostírá se za periuretrální zónou a po jejích bocích dopředu. Vnější zóna obsahuje hlavní žlázy, uložené ve fibromuskulárním stromatu prostaty, obklopuje zezadu a ze stran vnitřní zónu (Čihák, 2006).

Žláza předstojná neboli prostata je složena z vazivově svalového stromatu, v němž se nachází 20-30 tuboalveolárních žlázek, jejichž vývody ústí do močové trubice. Žlásky jsou vystlány jednovrstevným nízcí cylindrickým epitelem, vylučujícím sekret bílkovinné povahy, jenž spolu se sekretem semenných váčků tvoří součást spermatu. Sekret se někdy v žlázkách prostaty sráží v podobě vejčitých útvarů, silně barvitelných kyselými barvivy, zvaných konkrementy prostaty. Prostory mezi žlázkami vyplňuje kolagenní vazivo, v němž se nacházejí snopečky buněk hladkého svalu.

Epitel tuboalveolárních prostatických žláz je jednořadý až víceřadý, s buňkami plochými až vysokými cylindrickými. Tvar buněk závisí na sekreční aktivitě, hormonální situaci a na stáří muže. Vysoké cylindrické buňky jsou vlastní činné žlázové buňky (Vacek, 1995).

1.2.5. Pohlavní systém samce komára *Culex pipiens*

Struktura samčího pohlavního ústrojí se u jednotlivých druhů hmyzu odlišuje, přes různé variace však společným znakem zůstává, že vývod přídatných žláz společně s *vas deferens* vstupuje do části ejakulační trubice, kam se během kopulace dostává ze semenných váčků sperma a mísí se sekrety přídatných žláz. Tato směs je během kopulace přenášena do

samičího pohlavního ústrojí. Navzdory morfologické diverzitě přídatných žláz lze formulovat několik základních charakteristik, které jsou společné pro hmyz jako takový. Obecně je sekreční epitel tvořen jedním nebo několika typy buněk, které mají schopnost syntetizovat a sekretovat proteiny. Obvykle začíná být diferenciací sekrečních buněk zřetelná ve stádiu pozdní kukly a končí v začátcích stádia dospělce. Konec diferenciací těchto buněk je charakterizován sekrecí obrovského množství materiálu, který se poté stává součástí spermatu a je přenášen při kopulaci (**Chen, 1984**).

Ramalingam a Craig (1978) popsali ultrastrukturu samčích přídatných žláz u *Aedes triseriatus*. Přídatné žlázy jsou tvořeny jednoduchou vrstvou sloupcovitých epiteliálních buněk, které jsou obklopeny vrstvou kruhové svaloviny. Každá z párové žlázy je rozdělena na anteriorní část s jedním typem sekrečních buněk a posteriorní část s dvěma typy. Transplantační studie prokázaly, že sekrece buněk anteriorní části přídatné žlázy inhibuje vícenásobnou inseminaci a stimuluje ovipozici, zatímco buňky posteriorní části syntetizují látky slizového charakteru, které slouží ke spojení granulí z anteriorní části a tak při oplození umožňují jejich efektivnější přenos do pohlavních orgánů samice (**Ramalingam a Craig, 1976; 1978**).

1.2.6. Bioptická preparace prostaty

Druhy bioptického vyšetření prostaty: punkční jehlová biopsie, transuretrální resekce, intrakapsulární prostatektomie (enukleace), radikální prostatektomie.

Punkční biopsií se odebírají válečky 1 – 2 mm tlusté a 1 – 2 cm dlouhé. Jsou odebírány přes stěnu rekta. Punkční válečky jsou zalévány do parafinu kompletně a hodnoceny po sériovém prokrájení. Před zalitím uvedeme do popisu velikost, tvar a celkovou morfologii punkce (souvislý váleček, rozdrobená tkáň atd.).

Transuretrální resekci jsou zasílány ve formolu fixovány protáhlé tkáňové proužky (většinou 10×5×3 mm). Exaktní přístup je histologické vyšetření všech kousků, což je často technicky i ekonomicky náročné. Za dostatečné lze považovat vyšetření náhodného výběru vzorků.

Radikální prostatektomií se odebírají obě *glandula vesiculosa* a část přilehlých měkkých tkání případně s uzlinami.

Nejlepší a nejprehlednější vyšetření je metoda histotopogramů, kdy se vyšetřuje histologicky průřez celou prostatou (**Dvořák, Karel 2008**).

2. Cíle práce a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce je nalezení optimální barvicí techniky vhodné pro histologické a histochemické studium komárů *Culex pipiens s. l.*. Bakalářská práce studuje samce komárů a myši a snaží se nalézt shodné struktury pohlavních orgánů a jejich shodnou barvitelnost histologickými barvivy. Tato shoda by mohla přispět ke zlepšení studia nádorů prostaty a dalších orgánů pohlavního systému.

- 1) Nalézt barvicí techniku, která umožní zobrazit shodné struktury pohlavních orgánů u komára a myši.
- 2) Srovnat výhody komára jako modelového organismu pro studium pohlavních orgánů savců.
- 3) Nalézt jednoznačně strukturu prostaty u komára *Culex pipiens s. l.*

3. Materiály a metody

3.1. Metodika chovu

Chov komárů probíhal 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 nakladených vajíček se po 48 hod embryonálního vývoje líhly larvy 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 do samostatného plexi boxu s malým množstvím vody. Z vylíhlých dospělců byli ke studiu používáni samci a samičky byly vráceny zpět do chovů.

3.2. Odběr materiálu

Odběr materiálu z komára *Culex pipiens*

Anestézie komára byla provedena umístěním zkoumaného objektu v exhaustoru do mrazu na dobu 10 – 15 minut. Preparaci pohlavních orgánů nebo celé abdominální části se provádí ve fyziologickém roztoku pod binolupou typu Olympus, v prostředí s vhodnou osmolaritou, na voskové podložce.

Odběr materiálu z myši

Anestézie myši byla provedena umístěním zkoumaného objektu do lahve s buničinou nasycenou chloroformem. Myš byla vyjmuta z lahve ve stavu viditelného hlubokého bezvědomí. Myš byla usmrcena předepsaným způsobem. Preparace močového měchýře s předstojnou žlázou byla provedena dle předepsaného postupu.

3.3. Fixace

Fixace byla provedena z důvodu rychlého vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání. Dále aby se zabránilo autolýze a hnilobným procesům, způsobenými vnitřními enzymatickými procesy nebo činností bakterií.

Byla použita Bouinova tekutina, modifikace Duboscq – Brasil, především z důvodu rychlého pronikání do tkáně, která se kvalitně barví.

Tkáň byla fixována po dobu jednoho týdne až jednoho měsíce. Po této době byla dostatečně profixována, ale zároveň silně žlutě zbarvena.

Z důvodu odstranění nejen žlutého zbarvení tkáně, ale především k vytěsnění zbytků kyseliny pikrové byly vzorky fixovány v ethanolu hmotnostní koncentrace 70 % po dobu až tří dnů.

3.4. Zalévání do parafínu

Tkáň byla zalita do parafínu z důvodu prosycení odvodněné tkáně rozehrátým parafínem při teplotě kolem 56-58°C. Parafin vyplnil všechny mikroskopické štěrby v tkáni, kterou bylo možno krájet v tenkých řezech, silných několik tisícín milimetru.

Zalévání do parafínu probíhalo ve čtyřech etapách: 1. odvodnění tkáně, 2. prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin, 3. prosycení tkáně parafínem, 4. vlastní zalití.

3.4.1. Odvodňování

Odvodňování tkáně bylo provedeno vzestupnou řadou ethanolů. Takto se postupuje pro prevenci smrštění tkáně při vložení vzorku do koncentrovaného ethanolu.

Po fixaci Bouinovou tekutinou byl tkáňový bloček přenesen do ethanolu koncentrace 70 %.

1. Ethanol 70% 8 hodin
2. Ethanol 70% 8 hodin
3. Ethanol 80% 8 hodin
4. Ethanol 90% 8 hodin

- 5. Ethanol 90% 8 hodin
- 6. Ethanol 90% 8 hodin

3.4.2. Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafin

Tkáň byla prosycena z důvodu dokonalého odstranění ethanolu. Prosycení bylo provedeno látkou, která je rozpustná v parafínu, ale zároveň se mísí s ethanollem. Při studii bylo zvoleno použití methylbenzoátu.

- 1. Ethanol-methylbenzoát 1 hodin
- 2. Methylbenzoát 6 hodin
- 3. Methylbenzoát 6 hodin
- 4. Methylbenzoát 6 hodin

3.4.3. Prosycení tkáně parafinem

Po prosycení tkáně methylbenzoátem byly přeneseny tkáňové bločky do benzen-parafínu. Benzen-parafin je nasycený roztok parafínu v benzenu při 45°C. Z benzen-parafínu byla tkáň přenesena do čistého parafínu.

Prosycení parafinem probíhalo v otevřených nádobách, a to postupně třemi lázněmi parafínu vždy čistého, aby se z tkáně dokonale odstranil benzen.

- 1. Benzen 10 minut
- 2. Benzen 10 minut
- 3. Benzen-parafin 1 hodina při 45°C
- 4. Parafin 6 hodin
- 5. Parafin 6 hodin
- 6. Parafin 6 hodin
- 7. Parafin 6 hodin

3.4.4. Vlastní zalití do parafinu

K vlastnímu zalití bylo použito zkvalitněného a přefiltrovaného parafinu. Zalití bylo provedeno do zalévací plastové komůrky.

Zkvalitňování parafinu

Parafin byl ponechán v otevřené Petriho misce v termostatu při teplotě 60-70°C po dobu nejméně jednoho týdne. Po této době byl parafin přefiltrován. Přefiltrování je velmi důležité, protože parafin přicházející z výroby obsahuje často příměs různých pevných nečistot.

Výbornou kvalitu má též parafin, získaný ze zbytků starých bloků a z parafinových řezů odpadlých při krájení bloků. Tento recyklovaný parafin byl také používán při studii a proto se zbytky z krájení shromažďovaly.

Provedení zalití

Do zalévací komůrky byl nalit parafin zahřátý na 60°C a byl rychle do něho přenesen pinzetou tkáňový vzorek. Vzorek byl v komůrce podle potřeby orientován zahřátou pinzetou do svislé polohy. Poté byl ponechán parafin ztuhnout. Komůrka byla ponořena do studené vody, v níž byl ponechán.

Zalévací komůrka byla odstraněna po dokonalém ztuhnutí parafinu. Parafinový bloček byl přiříznut do obdélníku nebo čtverce tak, aby vrstva parafinu okolo tkáně byla 3-5 mm široká.

3.5. Krájení parafinových bločků

Parafinové bločky byly krájeny na rotačním mikrotomu typu Leica. Parafinový bloček byl zhruba seříznut do tvaru čtyřbokého hranolu a přitmelen ke krájecí podložce.

Přitmelení bylo provedeno nahráním bločku na spodní straně lopatičkou nebo nožem a bloček byl rychle přitisknut na podložku, případně bylo před tím na podložku nakápnuto několik kapek horkého parafinu. Poté byl po stranách bloček obkroužen zahřátou lopatičkou nebo nožem a tím bylo utěsněno spojení bločku s podložkou (**Culling, 1957, Vacek, 1995**).

Krájecí podložka byla upevněna do neapolské svorky mikrotomu. Do svorky byl zasazen mikrotomový nůž a nastaven tak, aby jeho podélná osa byla kolmá na směr řezu, tj. aby ostří nože bylo rovnoběžné s přední hranou bločku. Sklon nože byl upraven tak, aby nůž svíral s rovinou řezu úhel menší nežli 10°. Horní plocha bločku byla přiblížena k rovině ostří nože. Bloček byl opět seříznut skalpelem, aby řezná plocha měla podobu přesného hranolu (rovnoramenného lichoběžníku, čtverce, obdélníku), přičemž přední hrana bločku musí být rovnoběžná s ostřím nože.

Byla nastavena tloušťka řezu na mikrometrického šroubu na žádanou velikost.

Při krájení parafinových bloků v sérii byly získány všechny řezy z krájeného bločku v souvislém sledu. Jednotlivé řezy byly při krájení spojeny v souvislou a pokud možno rovnou pásku.

3.6. Napínání a lepení parafinových řezů

Parafinové řezy byly lepeny na podložní sklíčka směsí bílku s glycerinem. Směs bílku s glycerinem byla připravena přidáním stejného dílu glycerinu k vaječnému bílku. Směs byla ušlehána a přefiltrována. K filtrátu byl přidán pěti milimetrový kousek kafru za účelem konzervace.

Na čisté podložní sklíčko bylo nanášeno malé množství směsi bílku s glycerinem a rozetřeno hranou malíku stejnoměrně po celé ploše sklíčka. Bylo připraveno několik podložních sklíček. Na sklíčko bylo kápnuto pár kapek destilované vody vytemperované na 46°C. Na sklíčko byly poté přeneseny štětečkem série parafinových řezů. Série nesmí být příliš dlouhá, aby se při napínání řezy nepřehrnuly přes okraj sklíčka.

Podložní sklíčko bylo umístěno na ploténku vyhřátou na 45 – 50°C a bylo podlito destilovanou vodou. Teplem parafin změkkl, řez plovoucí na vodě se natáhl. K napnutí řezu docházelo účinkem povrchového napětí vody na zahřátý parafin. Poté, co byl řez narovnan, bylo sklíčko ponecháno na ploténce dokud se voda neodpařila. K dokonalému přilepení řezů k podložnímu sklíčku, byly sklíčka ponechány na vyhřívání ploténce přes noc.

3.7. Barvení parafínových řezů

Pozorujeme-li neobarvený preparát v obyčejném světelném mikroskopu, nerozeznáme jednotlivé složky tkáně, protože se vzájemně mnoho neliší lomivostí světla (Vacek, 1995). Z tohoto důvodu byly řezy barveny vhodnými barvivy. Různé součásti buněk a tkání vážou různá barviva, z tohoto důvodu se pak dají v mikroskopu zřetelně odlišit.

Řezy tkání byly barveny jak kyselými, tak zásaditými barvivy. Ze skupiny zásaditých barviv byly použity Harrisův hematoxylin a bazický fuchsin. Použita byla k obarvení jader buněk. Ze skupiny kyselých barviv byly použity eozin, light green. Dalším barvivem použitým při práci byla Oranž G, která se řadí do skupiny anionických azo barviv.

K barvení byla použita barviva rozpustná ve vodě, proto byly tkáňové řezy nejprve odparafinovány xylenem. Jelikož je xylen také nerozpustný ve vodě, musely se tkáňové řezy dále odvodnit vzestupnou řadou ethanolů.

3.7.1. Barvení Hematoxylin – Eozinem

Jádra buněk byla barvena komerčně dodávaným Harrisovým hematoxylinem, přesně vzato jde o barevný lak, v němž je hematoxylin oxidován na hematein. Cytoplazma buněk byla barvena eozinem, který patří do skupiny červených bromeozinů.

Vlastní barvení

Odparafinování

1. Xylen 10 minut
2. Xylen 10 minut
3. Ethanol 96% 5 minut
4. Ethanol 80% 5 minut
5. Ethanol 70% 5 minut
6. Destilovaná voda..... 5 minut

Barvení

7. Harrisův Hematoxylin 5 minut

8. Destilovaná voda..... opláchnout
9. Diferenciace v kyselém ethanoluněkolik vteřin
4 kapky HCl na 100 ml etoh
10. Vypírání v tekoucí vodě 5 minut
diferenciaci kontroluji pod mikroskopem, popřípadě postup opakuji
11. Eozin 0,5%1 minuta
12. Destilovaná voda
13. Diferenciace v kyselém ethanoluněkolik vteřin
kontroluji v mikroskopu
Odvodnění
14. Ethanol 96% 3 krát 5 minut
15. Karbol – xylen 1:7 5 minut
Projasnění
16. Xylen 5 minut
17. Xylen 5 minut
Montování do kanadského balzámu

Výsledky barvení: Jádra buněk tmavě modrá, kolagenní vazivo růžová, svalstvo červená, chrupavka modrá

3.7.2. Barvení dle Malloryho

Mořidlo obsahuje kyselý fuchsin, anilinovou modř a oranž G. Používá se především pro studium hmyzí tkáně.

1. Xylen 10 minut
2. Xylen 10 minut
3. Ethanol 96% 5 minut
4. Ethanol 80% 5 minut
5. Ethanol 70% 5 minut
6. Destilovaná voda..... 5 minut

7. Ponceaus S – kyselý fuchsin3,5 minuty
8. Destilovaná voda
9. 1% roztok kyseliny fosfomolybdenové 5 minut
10. Destilovaná voda
11. Malloryho roztok 9 minut
12. Destilovaná voda2x propláchnout
13. Ethanol 96% 3 krát 5 minut
14. Karbol – xylen 1:7 5 minut
15. Xylen 5 minut
16. Xylen 5 minut

Montování kanadským balzámem

Výsledek barvení: jádra buněk modře, kolagenní vazivo tmavě modře, svalstvo červeně

3.7.3. Barvení Aldehydovým fuchsinem světle zelená oranž G

1. Oxidační roztok 30 sekund
2. Kyselina šťavelová do zbělení
3. Vypírání v tekoucí vodě 5 minut
4. Ethanol 70%1 minuta
5. Aldehydovým fuchsin 5 minut
6. Ethanol 96%diferenciace
7. Ethanol 70% 5 minut
8. Destilovaná voda..... opláchnout
9. Harrisův hematoxylin 5 minut
10. Vypírání v tekoucí vodě 5 minut
11. Světle zelená – oranž G 5 minut
12. Ethanol 96%diferenciace
13. Ethanol 96% 3 krát 5 minut
14. Karbol – xylen 1:7 5 minut

15. Xylen 5 minut
 16. Xylen 5 minut

Montování tkáňových řezů kanadským balzámem

Příprava roztoku aldehydového fuchsinu

Destilovaná voda 100 ml

Bazický fuchsin..... 1 gram

Fuchsin jsem rozpustil ve vroucí vodě a vařil 1 minutu. Po zchlazení jsem roztok přefiltroval a přidal:

Kyselina chlorovodíková 2 ml

Paraldehyd..... 2 ml

Roztok byl důkladně promíchán a nechán v otevřené nádobě 7 dní. Poslední den byla provedena kontrola dostatečného „vyzrání“ paraldehydfuchsinu tak, že byla kápnuta kapka roztoku na filtrační papír. Uprostřed kapky zůstala červená sraženina a do okolí filtračního papíru se nešířilo červené zbarvení.

Hotový roztok byl přefiltrován. Sraženina paraldehydfuchsinu zachycená na filtračním papíru byla vysušena v termostatu. Vysušený prášek byl uchováván v prachovnici.

Příprava oxidačního roztoku

Manganistan draselný 2,5%..... 1 díl

Kyselina sírová 5% 1 díl

Destilovaná voda 6 dílů

Příprava roztoku paraldehydfuchsinu

Ethanol 80% 100 ml

Paraldehydfuchsinu 0,5 gramů

Před barvením jsem přidal několik kapek kyseliny octové ledové.

Příprava roztoku světle zelená – oranž G

Destilovaná voda 100 ml

Světlá zeleň (light green)..... 0,2 gramů

Oranž G..... 2 gramy

Kyselina fosfowolframová..... 1 gram

Kyselina octová ledová 1 ml

Roztok byl zahříván při 60°C do úplného rozpuštění barviv. Po zchladnutí byl roztok přefiltrován do zásobní lahve a byla přidána kyselina octová ledová.

Výsledky barvení: Jádra buněk modře až hnědočerně, elastická vlákna fialově, kolagenní vlákna zeleně, erytrocyty oranžově, sekreční granula v závislosti na povaze dekretovaného produktu zeleně, purpurově nebo červenofialově.

3.8. Montování

Montování bylo provedeno kanadským balzámem nebo syntetickým médiem.

3.9. Mikroskopie

Obarvené histologické a histochemické preparáty byly prohlíženy použitím mikroskopu značky Olympus typu BX51.

Fotografie byly pořizovány fotoaparátem připojeným k mikroskopu.

4. Výsledky

Histologické a histochemické metody se v této studii požívaly na tkáních samců komára *Culex pipiens s. l.* a myši. Studie potvrdila možnost použití histologických a histochemických metod pro studium samčí přídatné pohlavní žlázy komára *Culex pipiens s. l.* a předstojné žlázy myši.

Nejlepší barvení se jeví Malloryho technika. Tato histologická technika byla použita pro znázornění kolagenního vaziva, sekrečních buněk přídatné žlázy a svalové tkáně. V pohlavním systému samce komára jsou přítomny další tři žlázy. Lokalizace přídatné pohlavní žlázy je na obrázku 2. Schématické zobrazení žlázy na obrázku 1. Epitel je složen z jedné vrstvy kubických buněk produkujících sekrety nezbytné při procesu rozmnožování. Tubus žlázy je obklopen vrstvou kolagenního vaziva, jak je viditelné na obrázku 3. Jádra sekrečních buněk jsou kolovitého tvaru. Jádra jsou obarvena světle hnědou. Jejich umístění je ve středu buňky. Jádra viditelná ve 400 násobném zvětšení jsou označena na obrázku 3.

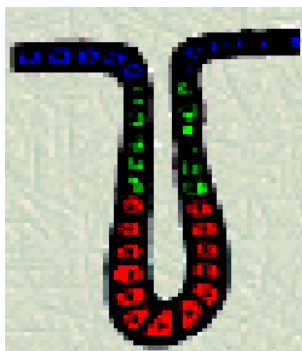
Předstojná žláza myši barvená dle Malloryho je na obrázku 4. Patrná je přítomnost několika tubulózních žláz. Jednotlivé žlázy jsou uloženy v obalu z kolagenního vaziva. Buňky jsou cylindrické a uloženy v jedné vrstvě. Vazivo mezi žlázkami obsahuje snopečky hladké svaloviny.

Barvení Harrisovým hematoxylinem eozinem prokazuje srovnatelné výsledky a metodou dle Malloryho. Preparáty v obou případech znázorňují samčí přídatné pohlavní žlázy. Žlázy jsou zobrazeny na obrázku 5 a 6. V případě barvení hematoxylinem eozinem jsou lépe znázorněna jádra sekrečních buněk obarvena tmavě modrou. V případě myši předstojné žlázy jsou jádra umístěna při bázi buňky. Jádra sekrečních buněk samčí přídatné pohlavní žlázy komára *Culex pipiens s. l.* jsou zbarvena tmavě růžově (Obrázek 5). Kolagenní vazivo není patrné ani u jednoho z modelových organismů. V preparátech získaných z myši předstojné žlázy jsou přítomny snopečky hladké svaloviny obarveny světle růžově (Obrázek 6).

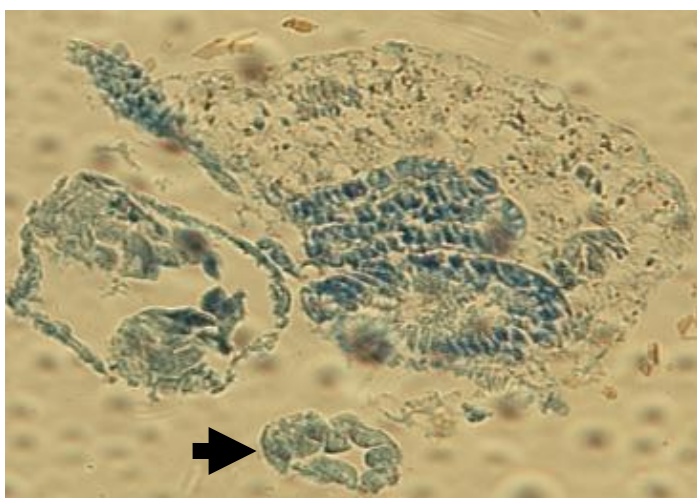
Barvením paraldehydfuchsinem světle zelenou oranží G bylo dosaženo znázornění pouze předstojné žlázy myši (Obrázek 8). Tkáň komára *Culex pipiens s. l.* se při této

histochemické metodě smrštila a žádná buněčná struktura nebyla patrná (Obrázek 7). Myší tkáň se touto metodou zbarvila do odstínů červené. Kolagenní vazivo, která se barví v odstínech zelené, se nepodařilo prokázat. Metoda ale umožnila zobrazit elastická vlákna ve stěně močového měchýře (Obrázek 9). Elastická vlákna se zobrazila i při barvení dle Malloryho (Obrázek 10). Přesto že se buňky myší předstojné žlázy mírně smrštily stále jsou v nich patrná jádra. Díky zobrazení jader v černé barvě, lze rozeznat jednovrstvé uspořádání cylindrických buněk předstojné žlázy myši. Sekreční granula nabyly touto metodou zbarvena.

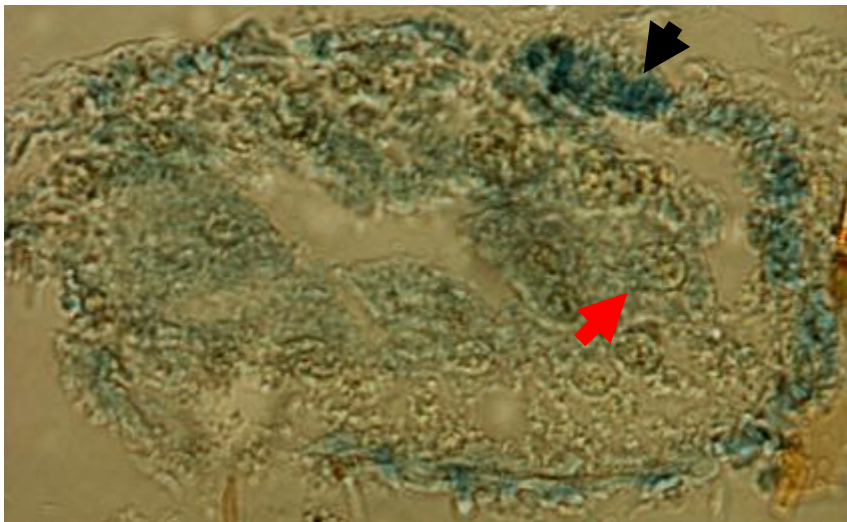
Obrázek 1: Schéma tubulózní žlázy (červeně žláznatý epitel, zeleně epitel vývodných cest, modře povrchový epitel)



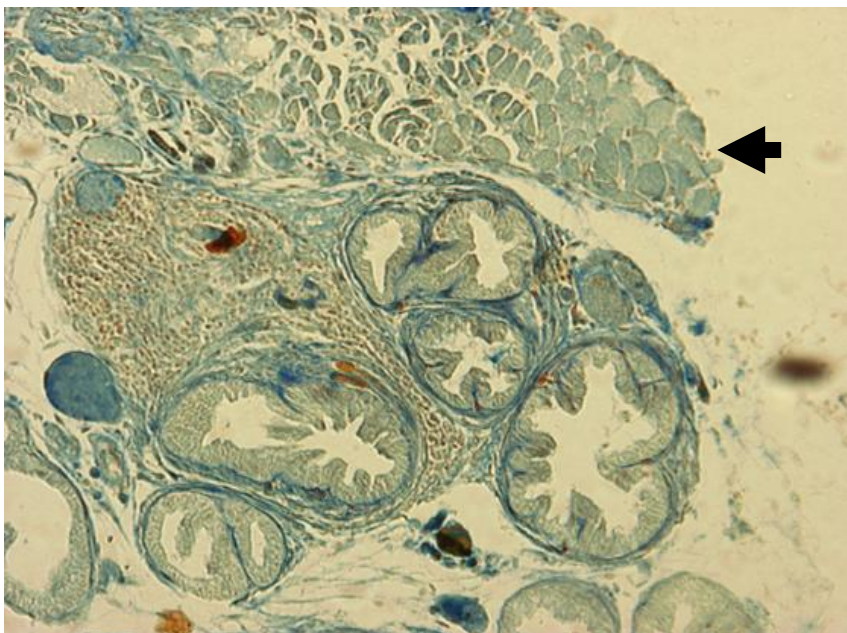
Obrázek 2: Samčí pohlavní orgány komára *Culex pipiens* s. l. (fixace – Bouin; parafín; Malloryho barvení; šipka ukazuje samčí přídatnou pohlavní žlázu)



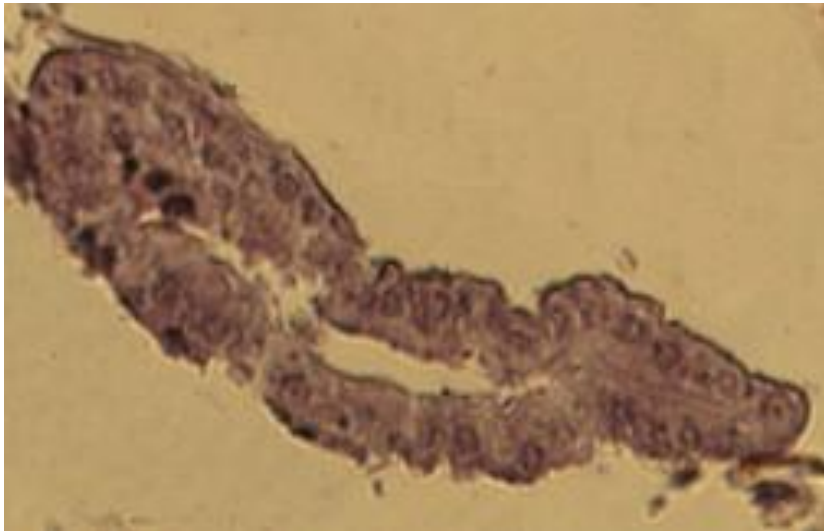
Obrázek 3: Samčí přídatná pohlavní žláza komára *Culex pipiens* s. l. (černá šipka ukazuje na vrstvu kolagenního vaziva obepínající přídatnou žlázu, červená šipka ukazuje jádro)



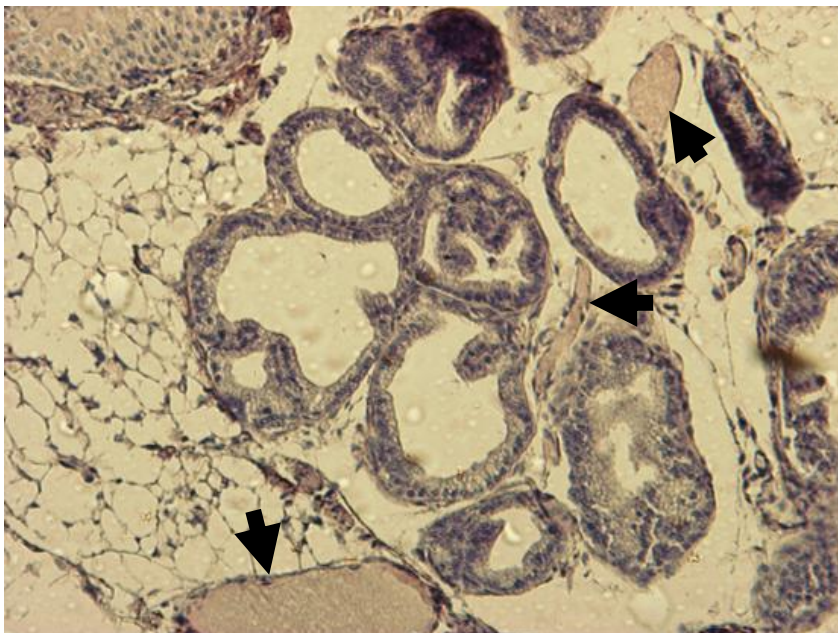
Obrázek 4: Předstojná žláza myši (fixace – Bouin; parafín; Malloryho barvení; černá šipka ukazuje snopečky hladké svaloviny)



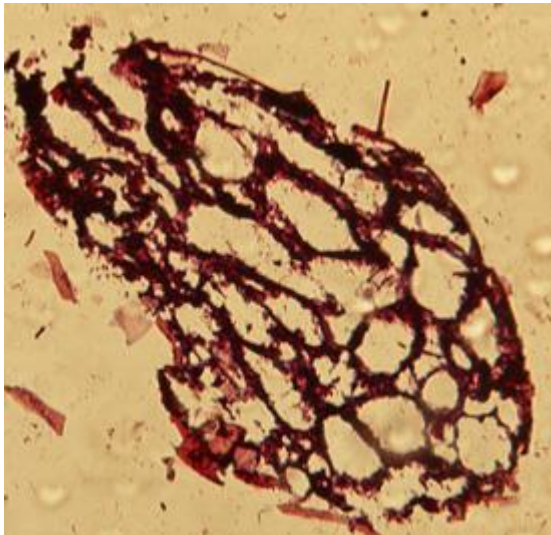
Obrázek 5: Samčí přídatná pohlavní žláza (fixace – Bouin; parafin; Barvení hematoxilyln eozin)



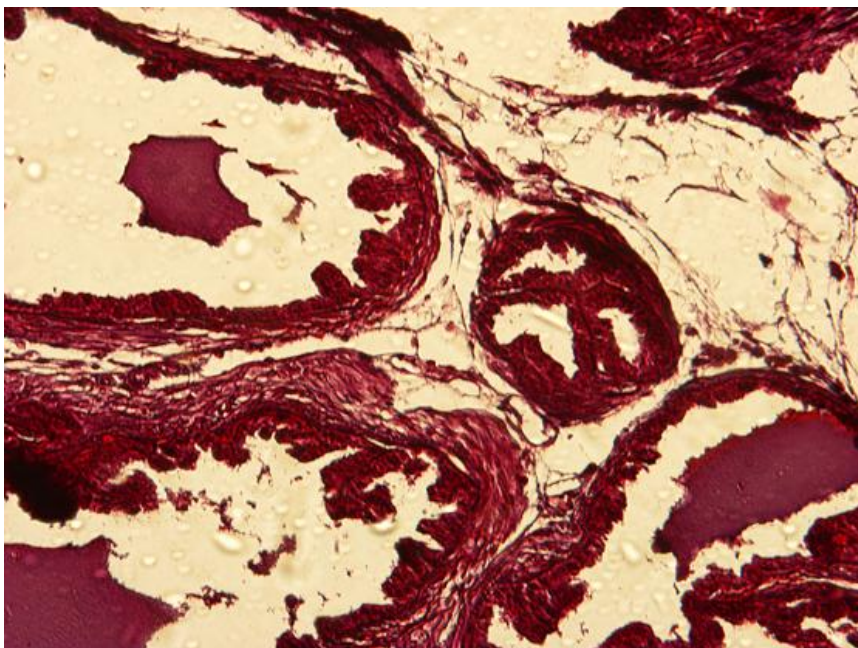
Obrázek 6: Předstojná žláza myši (fixace – Bouin; parafin; Barvení hematoxilyln eozin; černé šipky ukazují na snopečky hladké svaloviny)



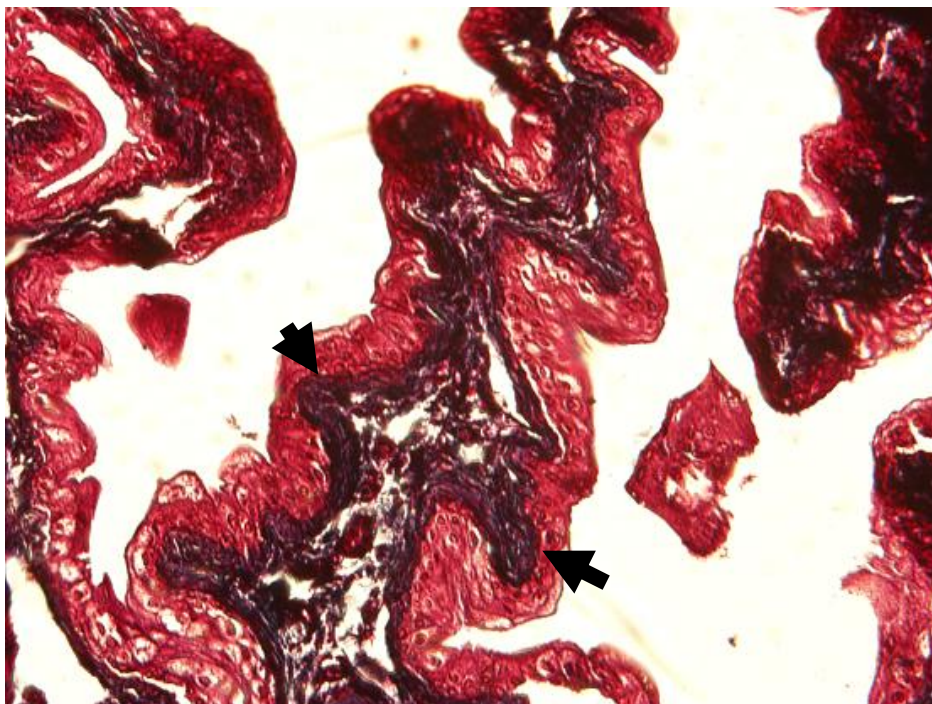
Obrázek 7: Samčí pohlavní orgány (fixace – Bouin; parafin; Barvení paraldehydfuchsin světle zelená oranž G)



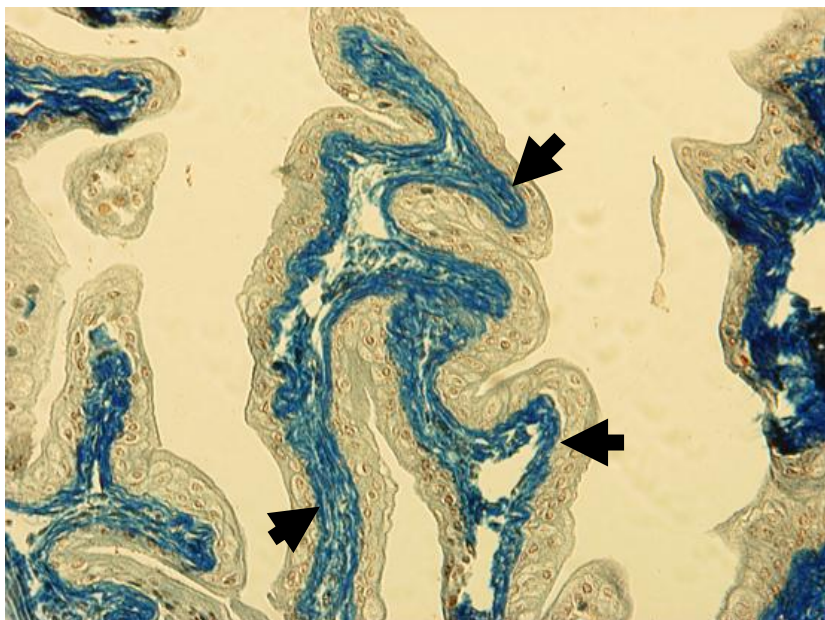
Obrázek 8: Předstojná žláza myši (fixace – Bouin; parafin; Barvení paraldehydfuchsin světle zelená oranž G)



Obrázek 9: Stěna močového měchyře ((fixace – Bouin; parafin; Barvení paraldehydfuchsin světle zelená oranž G, čipka ukazuje na vrstvu kolagenního vaziva)



Obrázek 10: Stěna močového měchyře (fixace – Bouin; parafin; Malloryho barvení; šipka ukazuje na vrstvu kolagenního vaziva)



5. Diskuze

Histologická a histochemická studie pohlavních orgánů komára *Culex pipiens s. l.* a prostaty myši ukázala na možnost využívání Malloryho barvicí techniky a barvení hematoxylin eozinem pro studium těchto tkání.

Histologické a histochemické metody umožní určení samčí přídatné pohlavní žlázy vůči okolní tkáni. Prostatické kanálky jsou vystlány jednoduchým válcovitým epitelem s zvrásněnou sliznicí. Prostatické kanálky jsou propojeny hladkou svalovinou s močovou trubicí (**Pinheiro P. F. et. al.**). Jak Malloryho barvicí technikou, tak hematoxylin eozinem jsem prokázal přítomnost hladké svaloviny v okolí předstojné žlázy myši. Histochemickým barvením paraldehydfuchsin světle zelená oranž G jsem však hladkou svalovinu neprokázal. Vhodnější metodou by mohl být Massonův zelený trichrom. Umožňuje znázornění svalových vláken v odstínech červené.

Byl učiněn závěr, že barvitelnost prostatických kanálků je podobná jako u krys (**Hebel & Stromberg, 1976**), myši (**Greene, 1966**) a zlatých křečků (**Silva et al. 1995**). Existují však rozdíly v lokalizaci kanálků přídatné pohlavní žlázy vůči močové trubici (**Pinheiro P. et al.**). Díky histologickému barvení jsem odlišil jednotlivé žlázy a jejich vývody zejména díky tvaru a umístění buněk k bazální membráně. Umístění předstojné žlázy myši jsem pozoroval v okolí vyústění močové trubice z močového měchýře. Nenasedá přímo na močovou trubici jak je to u lidské prostaty, ale každá z dvojice žláz má jeden vývod vyúsťující do močové trubice. Přídatná pohlavní žláza samce komára *Culex pipiens s. l.* je lokalizovaná laterálně s distálním průběhem.

Dalším podstatným rozdílem mezi žlázami a jejich vývody je v návaznosti na kolagenní vazivo a hladkou svalovinu. Například *ductus deferens* je vystlán také jednou vrstvou cylindrických buněk. Na rozdíl od předstojné žlázy je *ductus deferens* obkroužen vrstvou hladké svaloviny (**Pinheiro P. F. et. al.**). Má studie prokázala, že buňky prostatické žlázy nasedají na bazální membránu za kterou následuje vrstva kolagenního vaziva snadno rozlišitelné při použití Malloryho techniky. Barvením H&E jsem snadno rozlišil vrstvy svalových vláken, které jsou v případě prostatické žlázy v jejím stromatu.

Müller 2008, použil mimo jiné Malloryho trichromu pro znázornění endokutikuly složené převážně z kolagenního vaziva. Jeho studie byla prováděna na *Pachnoda marginata* a *Melanophila acuminata* patřící do třídy *Insecta*, kam se systematicky řadí i komár *Culex pipiens s. l.* Došel k závěru že nemelanizovaná exokutikula se barví v žlutém nebo oranžovém odstínu, mesokutikula se barví červeně a endokutikula se obarví modře. Mé výsledky barvením dle Malloryho jasně ukazují na tmavě modré zbarvení kolagenních vláken.

Abul – Nasr, 1950 použil Malloryho barvicí techniku ke studii pohlavních orgánů samce a samice tří různých zástupců podtřídy *Nematocera*. Touto technikou prokázali původ sekundárních i primárních reprodukčních orgánů. S autorem se shoduje na použití této techniky pro studium pohlavních orgánů komára *Culex pipiens s. l.*

Obdobná metoda jako Malloryho barvení je Masonův modrý trichrom. Tuto metodu použil (**Dikgolz, 2005**) při studiu houbové infekce larev komára *Aedes aegypti*. V kombinaci s 10 % formaldehyd-fosfátovým pufrem zjistil dobrý kontrast a zřetelné odlišení hostitelské tkáně. Mezi těmito metodami jsem nenašel rozdíl ani v použití barviv ani v barvitelnosti tkání. Obě metody mají shodné výsledky barvení, jsou tedy obě vhodné pro studie tkání komára *Culex pipiens s. l.*

Metoda dle Malloryho se při studii přídatné pohlavní žlázy samce komára *Culex pipiens s. l.* osvědčila jako nejlepší. Zobrazuje nejlépe ze všech použitých technik strukturu tkáně. Barvení HE u myši prostatické tkáně výrazně obarvilo jádra tmavě modrou, v případě přídatné pohlavní žlázy samce komára *Culex pipiens s. l.* jsou jádra slabě rozlišitelná v podobném odstínu jako celková struktura tkáně.

Barvení hematoxylin-eozin je standardní histologická technika. **Hernández-Martínez et al. (2002)** použil tuto techniku pro obarvení sériových řezů samce komára. V histologických řezech obarvených hematoxylin-eozinem pozoroval hematocyty. Při mé studii jsem hematocyty nepozoroval.

Ve studii **Dong et. al.** byl objeven u myši homolog mediátoru odpovídajícího za velikost orgánů *Drosophily melanogaster*. Při porovnávání tkání myši a *Drosophily* byl

použit hematoxylin eozin. Díky histologické metodě byla zjištěno menší velikosti a hustšího uspořádání hepatocytů u transgeně upravené myši oproti kontrolní skupině. Tím se potvrdila funkce nově objeveného genu, který při špatné funkci může způsobit rakovinné bujení. Tato studie upozornila na použití *Drosophily melanogaster* jako možný modelový organismus při studiu vzniku rakoviny. Z výsledků mé studie je patrné, že komár *Culex pipiens s. l.* je vhodný modelový organismus pro další studie předstojné žlázy.

V mé studii jsem porovnával požití barvení hematoxylin eozin na přídatných pohlavních žlázách samce komára *Culex pipiens s. l.* a předstojné žlázy myši. Tato technika umožňuje rozlišit struktury jednotlivých žláz pohlavního systému samců komára *Culex pipiens s. l.* Pro dosažení optimálního obarvení tkáňových struktur se při postupu barvení používá diference, která je nutná pro odstranění přebytečného barviva.

Použití samců myši jako modelového organismu má tu výhodu, že histologické řezy jsou oproti tkáni samce komára *Culex pipiens s. l.* větší a při barvení lze pozorovat diferenciaci i pouhým okem. Diferenciaci řezů samce komára *Culex pipiens s. l.* je nutno kontrolovat pod mikroskopem, což může být problémem z důvodu poškození optické soustavy mikroskopu. Dále může mít za následek vyschnutí a tedy znehodnocení preparátů.

Ve studii samčích přídatných pohlavních žláz *Appis mallifera* provedenou **Landim 2005**, jsou popsány žlázy s vysokými štíhlými buňkami, v dospělosti se epitel žláz oploští na velmi ploché buňky. Okolo žlázy je svalová vrstva. Pro průkaz produktů žlázy byly histologické řezy barveny histochemickou technikou PAS. Sekrety mají výraznou pozitivitu, avšak buňky žlázy nejsou obarveny. V mé studii jsem žádnou změnu epitelu žláz nezaznamenal a potvrdil jsem přítomnost kolagenních vláken okolo žlázy. PAS reakce jako histochemickou metodu jsem neprováděl, právě z důvodu, že se nehodí k barvení přídatné pohlavní žlázy samců hmyzu.

Barvení paraldehydfuchsin světle zelená oranž G bylo provedeno dle postupu uvedeného v literatuře (**Vacek, 1995**). Použití této histochemické metody však nebylo dosud publikováno. Ojedinele se objevují zmínky o samostatném použití jednotlivých barvicích látek.

Jako další významné studie prováděné na komárech *Culex pipiens s. l.* za účelem využití jako modelového organismu na místo myši, by bylo vhodné provést imunohistochemické studie. Pro takové studie je ovšem nutné nalézt protilátky pro buňkám nebo kolagenním strukturám samčí přídatné pohlavní žlázy. Tyto protilátky by výrazně usnadnily využití hmyzu jako modelového organismu.

6. Závěr

Nejvhodnější barvicí technika pro znázornění samčí přídatné pohlavní žlázy u modelových organismů (komára *Culex pipiens s.l.* a myši) je barvení dle Malloryho. Malloryho barvení prokáže kolagenní struktury samčí přídatné pohlavní žlázy. Díky tomu lze přídatné pohlavní žlázy odlišit od varlat a jiných žláz pohlavního systému. Barvicí technika hematoxylin-eozin se zdá být také vhodná pro histologické studie, ale jistě obtíže představuje proces barvení. Díky minimální velikosti komářích tkání obtížné kontrolovat diferenciaci tkáně jednotlivými barvivy.

Výsledky mé studie ukazují na možné využití *Culex pipiens s.l.* jako modelového organismu pro studium prostaty. Tkáň komára *Culex pipiens s.l.* má shodné struktury přídatné pohlavní žlázy jako myšičí předstojná žláza. Výhody využití tohoto modelového organismu spatřuji ve snadnosti chovu. Dále je značnou výhodou velká rozmnožovací schopnost, která umožňuje použití velkého počtu nových jedinců za krátkou dobu.

Jednoznačné struktury tkáně komára *Culex pipiens s.l.* byly prokázány barvicími metodami dle Malloryho a hematoxylin-eozinem.

7. Seznam použité literatury

1. Pohlavní ústrojí muže, Fotografický interaktivní atlas břicha a pánve Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, <<http://www.upol.cz>>
2. DVOŘÁK, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., FEIT, J., LUKÁŠ, Z., ŠMARDOVÁ, J. Základy histopatologických vyšetřovacích metod, 2008, <<https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf> >
3. DUŠEK, P.: Zhoubné nádory prostaty, 2006, <http://www.linkos.cz/pacienti/prostata_clanek.php>
4. HERÁČEK, J., URBAN, M. a kol. Urologie pro studenty [online], [cit. 20.04.2009]. Androgeos, [2009]. Dostupný z: <<http://www.urologieprostudenty.cz>>. Verze 2.0 [2009], ISBN 978-80-254-1859-8.
5. HES, O., MICHAL, M., MUKENŠNÁBL, P., HORA, M., SMITKOVÁ, V., ZÁMEČNÍK, M. <<http://www.prostata.nadory.cz/index.html>>, 2008
6. 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.

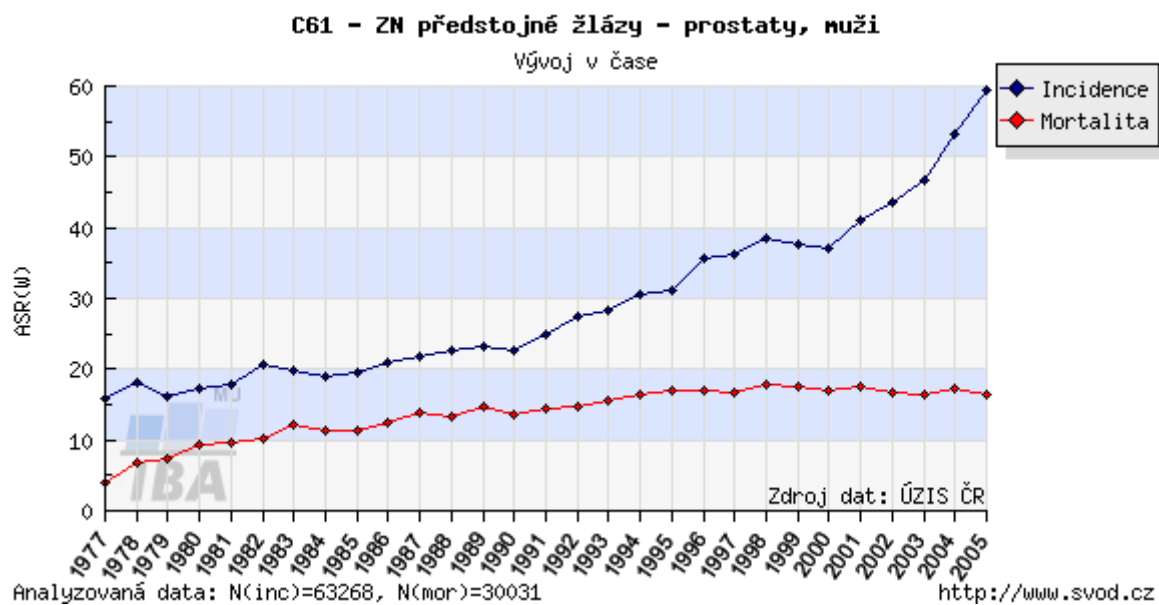
7. ANAFARTA, K., BEDŮK, Y., ULUOGLU, Ö., AYDOS, K., BALTAČI, S. The significance of histopathological changes of the normal tunica albuginea in Peyronie's disease. *International Urology and Nephrology*. 1994, vol. 26, no. 1, pp. 71 – 77, ISSN:1573-2584
8. BAJČIOVÁ, V. Nádory varlat u dětí, adolescentů a mladých dospělých. Rozdíly v biologii napříč věkovým spektrem. *Onkológia*. 2007, vol. 2, no. 6, pp. 380–384
9. BAIR, E. L., CHEN, M. L., MCDANIEL, K., SEKIGUCHI, K., CRESS, A. E., NAGLE, R. B., BOWDEN, G. T. Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease Cleaves Laminin-10 and Promotes Prostate Cancer Cell Migration. *Neoplasia*. 2005, vol. 7, no. 4, pp. 380 – 389
10. BELEJ, K. Prostatický syndrom – asymptomatická prostatitida. *Urolog. pro Praxi*. 2007, vol. 8, no. 6, pp. 281–284
11. BLEFARI, F., RISI, O., PINO, P. Secondary tumors of testis: two rare cases and review of the literature. *Urol Int*. 1992, vol. 48, no. 1, pp. 469 - 470.
12. CARRINGTON, S. D., ALEXANDER, R. A., GRIERSON, I. Elastic and related fibres in the normal cornea and limbus of the domestic cat. *J Anat*. 1984, vol. 139, no. 2, pp. 319 – 332.
13. CULLING C. F. A. Handbook of histopatological technique. 1. vydání. London, Butterworth & co., 1957 , 446 s.
14. ČÍHÁK, R., FRIM, M. Anatomie Díl 1. 2. vydání. Praha, Grada Publishing, 2001, 497 s., ISBN: 80-7169-970-5

15. DONG, J. et. al. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell*. 2007, vol. 130, no. 6, pp. 1120 – 1133.
16. GREENE, E. L. Biology of the Laboratory Mouse. 2. vydání. New York: McGraw-Hill Co; 1966.
17. DIKGOLZ, V. E., TOLEDO, A. V., TOPA, P. E., LOPEZ LASTRA, C. C. Evaluation of histological techniques for the detection of fungal infections caused by *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. 2005, vol. 50, n. 2, pp. 125-127
18. Hebel, R., Stromberg, M. W. Anatomy of the Laboratory Rat. Baltimore: Williams & Wilkins Co; 1976.
19. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ S., LANZ H., RODRIGUEZ 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
20. HES, O., HORA, M., VELIČKINOVÁ, H., MICHAL, M. Teratom varlete: Současná klasifikace z pohledu WHO z roku 2004. *Urol List*. 2006, vol. 4, no. 3
21. JAROLÍM, L., Karcinom prostaty. 1. vydání. Praha, Triton, 2001, 42 s., ISBN 80-7254-132-3
22. KAWACIUK, I. Onemocnění prostaty - medicínský a psychosociální problém. *SANQUIS*. 2002, vol. 24, pp. 14

23. KIERNAN, J. A.: Histological and histochemical methods : theory and practice. Oxford, Pergamon Press, 1981, 344 s. ISBN 0-08-024936-1
24. KELLY, D. A. Expansion of the tunica albuginea during penile inflation in the nine-banded armadillo (*Dasyus novemcinctus*). *Journal of Experimental Biology*. 1999, vol. 202, no. 3, pp. 253 – 265, ISSN 1477-9145
25. KYCLOVÁ, J., ROTTEROVÁ, P., DVOŘÁK, K., LUKÁŠ, Z. Effect of fixation and autolysis on immunohistochemical detection of CD antigens, *SCRIPTA MEDICA*. 2004, vol. 77, no. 2, pp. 63 – 74
26. LANDIM, C. C., DALLACQUA, R. P. Morphology and protein patterns of honey bee drone accessory glands. 2005, *Genet. Mol. Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 473 – 481.
27. LIEPERT, H., HERBOLD, D., LIPPERT-BURMESTER, W. Anatomie: Text und Atlas, München, Elsevier, Urban und Fischer. 8. vydání. 2006, 462 s., ISBN: 3-437-26181-9.
28. MÜLLER, M., OLEK, M., GIERSIG, M., SCHMITZ, H. Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of *Pachnoda marginata* (Coleoptera, Scarabaeidae) and the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (Coleoptera, Buprestidae). *The Journal of Experimental Biology*, 2008, vol. 211, pp. 2576 – 2583
29. MULHALL, J. P., MARTIN, D. J., LUBRANO, T., MOSER, M., KWON E., WOJCIK, E., SHANKEY, T. V. Peyronie's disease fibroblasts demonstrate

- tumorigenicity in the severe combined immunodeficient (SCID) mouse model.
International Journal of Impotence Research. 2004, vol. 16, pp. 99 – 104
30. NOVÁK J. Nádory varlat. In: Dvořáček J et al. Urologie. Praha: ISV 1998: 1141-1176.
31. PALIČKA, L., DOMES, L. Karcinom žaludku metastazující do obalů varlete a nadvarlete. *Čes Urol*. 2005, vol. 9, no. 1
32. PINHEIRO P. F. F., ALMEINA C. C. D., SEGATELLI T. M., MARTINEZ M., PADOVANI C. R., MARTINEZ F. E. Structure of the pelvic and penile urethra – relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Anat*. 2003, vol. 202, no. 5, pp. 431 – 444.
33. SILVA, T. P., ORSI, A. M., GOES, E. R. C. Características morfológicas do ducto deferente do hamster dourado (*Mesocricetus auratus*, W). *Rev. Ciênc. Bioméd*. 1995, vol.16, pp. 37 – 45.
34. SRINIVASAN, M., SEDMAK, D., JEWELL, S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *American Journal of Pathology*. 2002, vol. 161, no. 6,
35. 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.
36. VÁGNER, T., Urologie pro Praxi. 2008, vol. 9, no. 1, pp. 31 – 32

Přílohy:



Převzato z: http://www.linkos.cz/pacienti/prostata_clanek.php