Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Histopatologické metody při studiu vývoje samičích pohlavních orgánů

Bakalářská práce

Vypracovala: Dědová Kristýna
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ivan Gelbič, CSc.
14.5.2008

Abstrakt

Presented thesis is based on comparison and usability of histological methods for the study of body structure, especially inner female genital organs. The study was carried out in mosquitoes *Culex pipiens quinquefasciatus* Say.

Studied tissue was fixed in a fixation agent Bouin, modified Dubosque-Brasil, for the period of minimum 6-8 hours or in Carnoy fixation for the priod of 5 and 10 minutes. Bouin proved as a more convenient fixation liquid because the tissue can be stored in it for non-limited period of time with no over fixation of the tissue. This can happen in case of the use of Carnoy fixation. In Carnoy fixation it is necessary to determine the period of tissue soaking because the used fixation agent penetrates particular tissues for a different period of time and degradation of material by over fixation threatens, which results in disintegration of tissues and the material is non-usable for histological studies. Fixed tissue was after that cast in paraplast. From the material fixed by alcoholic Bouin, modification Dusque-Brasil, the blocks cast in resin were made for the preparation of half-thin sections.

Histological sections from paraplast blocks were made at automatic microtone Leica and half-thin sections from resin blocks at ultra microtone Reichert.

Section preparations were coloured either by Meyer and Harris haematoxylins or by the mixture of colours according to Mallory colouring method. For general biological preparations Mallory colouring method is the most convenient; it distinguishes the structures of studied tissue better. Half-thin sections can be coloured by toluidine blue, which is simultaneously a histochemical reaction, proving the presence of carbohydrates. This method is convenient for watching particular fine structures. Its disadvantage is the complexity at the preparation of serial sections necessary for the study of particular phases of insect genital organs development. Half-thin sections have also a significant advantage, namely at processing of materials containing chitin structures-nor chipping nor laceration of studied tissue occurs, as it is in paraffin sections.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Histopatologické metody při studiu vývoje samičích 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 podobě 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

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu práce Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, duševní podporu a hlavně za nekonečnou trpělivost v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Barboře Kozelkové, která mi byla vždy ochotna nápomoci. Můj dík také patří mé rodině a kamarádce. Díky těmto, pro mě důležitým, lidem vznikla tato práce.

Obsah:

ÚVOD

1. SOUČASNÝ STAV

1.1. Komár písklavý (*Culex pipiens pipiens*)

1.1.1. Rozlišení samce od samice (pohlavní dimorfismus)

1.1.2. Potrava

1.1.3. Rozmnožování a vývoj

1.1.3.1. Vývojová stadia

1.2. Nemoci přenášené komáry

1.2.1. Arbovirové infekce

1.2.1.1. Encefalitida japonská, západní a východní koňská, kalifornská, aj.

1.2.1.2. Žlutá zimnice

1.2.1.3. Dengue

1.2.2. Malárie

1.2.3. Západonilská horečka

1.3. Histologická technika

1.3.1. Odběr vzorků (materiálu)

1.3.2. Fixace

1.3.3. Zalévání tkáňových bločků

1.3.4. Krájení tkáňových bločků

1.3.4.1. Zpracovávání tkáňových řezů

1.3.5. Barvení histologických objektů

1.3.5.1. Příprava řezů k barvení

1.3.5.2. Základní barvící metody

1.3.5.3. Impregnační metody

1.3.6. Uzavírání (montování) obarvených řezů

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Metodika chovu

3.2. Zpracovávání materiálu

3.2.1. Odběr modelového materiálu
3.2.2. Fixace
3.2.3. Zalévání tkáňových bločků
3.2.4. Krájení tkáňových bločků
3.2.4.1. Paraplastové (parafínové) bločky
3.2.4.2. Pryskyřičné bločky
3.2.5. Barvení histologických preparátů
3.2.6. Uzavírání (montování) obarvených řezů
3.3. Zpracovávání výsledků
4. VÝSLEDKY
5. DISKUZE
6. ZÁVĚR
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY
8. KLÍČOVÁ SLOVA
9. PŘÍLOHY

ÚVOD

V posledních letech dochází k výrazným změnám v přírodě, které se přisuzují neustále se zvyšující teplotě. Příroda jako celek je neustále v pohybu. Něco zaniká a něco nové se objevuje. Tuto dynamiku svou, často neuváženou, činností narušuje člověk. Mohutný a často neřízený rozvoj průmyslu a jeho závislost na nadměrném využívání fosilních paliv vede k narušení křehké rovnováhy. Vysoký obsah skleníkových plynů a prachových částeček v atmosféře urychluje nárůst teploty a to vede k významným změnám i v biodiversitě organismů včetně krev sajícího hmyzu. Začínají se u nás objevovat nové druhy doposud známé pouze v subtropech či tropech např. komáři rodu *Anopheles*. Tento jev může být doprovázen i výskytem nových, dříve neznámých onemocnění. V nedávné době byl diagnostikován ve Vídni výskyt viru USUTU vázaného na černé ptáky – kosy, havrany.

1. SOUČASNÝ STAV

Krev sající bezobratlí se mohou díky své potravní preferenci podílet na přenosu řady onemocnění jejichž původci mohou být viry, bakterie, prvoci i červi. V našich podmínkách mezi vektory řadíme klíšťata a celou řadu hmyzích druhů živících se krví. Nejvíce druhů sajících krev je mezi dvoukřídlým hmyzem. Patří sem komáři, pakomárci, ovádi, mouchy tsetse, muchničky atd. Nejsledovanější skupinou jsou v poslední době komáři.

1.1. Komár písklavý (*Culex pipiens pipiens*)

Patří do čeledi komárovitých – Culicidae. Je jedním z nejhojnějších komárů u nás a řadí se do tzv. komplexu *Culex pipiens* s.l. Můžeme se s ním setkat od dubna - května do září - října v blízkosti vod, v lidských obydlích, stájích apod. Saje krev převážně ptáků a díky této potravní preferenci je označován jako ornitofilní. V poslední době se jeho potravní preference mění a stále častěji saje krev na savcích **(Reichholf-Riehm, 1997)**. Samičky tohoto druhu kladou vajíčka přímo na vodní hladiny, proto se jeho larvy často vyskytují v obrovském množství všude ve stojatých vodách (zahradní nádrže, barely) **(Kramář, 1958; Becker et al., 2003)**.

1.1.1. Rozlišení samce od samice (pohlavní dimorfismus)

Samce od samice rozeznáme podle vzhledu tykadel a bodce. Samci mají hustě a dlouze ochlupená tykadla citlivá na zvuk, kterým se orientují v rojích a rozpoznávají samice vlastního druhu. Jejich bodce jsou krátké, a tudíž uzpůsobené k sání nektaru. Samice mají naopak řídce a krátce ochlupená tykadla. U krev sajících samic jsou bodce dlouhé a ostré, proto slouží současně k nabodnutí kůže i sání krve. Hostiteli jsou především teplokrevní obratlovci, přičemž některé druhy dávají přednost určitým hostitelům, které vyhledávají zejména čichem **(Hůrka a Čepická, 1980)**. Komár v letu vydává hvízdavý tón, způsobený chvěním křídel a také hlasivek, které jsou napjaté v hrudních průduších **(Kramář, 1958)**.

Hlava samce (vlevo) a samice (vpravo) komárů rodu *Culex* (Obrázky převzaty z: **http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm**).

1.1.2. Potrava

Všichni dospělí komáři se primárně živí nektarem, ale samičky jsou navíc schopny hematofágie (sání krve). Nepotřebují ji ke svému přežití, ale jako zdroj bílkovin pro vývoj vajíček. Výjimku tvoří komáři rodu *Toxorhynchites*, kteří krev nesají. K tomuto rodu patří i největší známé druhy komárů, jejichž larvy požírají larvy jiných druhů komárů **(Kramář, 1958)**.

1.1.3. Rozmnožování a vývoj

K námluvám a k páření dochází nejčastěji při rojení. Rozdíly v rojovém chování různých druhů záměnu partnerů prakticky vylučují **(Kramář, 1958)**.

Samečci ve velkých rojích podle sluchu vyhledávají samičky svého druhu. Ke kopulaci dochází v letu. Po kopulaci musí samičky najít vhodného hostitele a usát mu kapku krve, aby ve svém těle spustily složitý proces zrání vajíček. Bez potřebných živin obsažených v krvi by se rozmnožování zastavilo **(Olejníček a Gelbič, 2000)**.

K nakladení vajíček využívají různé druhy stojatých vod, jako jsou rybníky (*Anopheles maculipennis*) umělé bazény a barely (*Culex pipiens, Culiseta annulata*), periodicky zaplavované plochy (většina druhů rodu *Aedes*), dutiny ve stromech (*Aedes geniculatus* a *pulchritarsis*, *Anopheles plumbeus*), často jim stačí i velmi malé množství vody (*Culex pipiens molestus*). Zimu přečkávají oplozené samičky (*Culex pipiens*,

Anopheles maculipennis, *Culiseta annulata*), vajíčka (většina druhů rodu *Aedes*), méně často larvy (*Anopheles claviger*) **(Clements, 2000; Becker et al., 2003)**.

1.1.3.1. Vývojová stadia

Komár patří k hmyzu s proměnou dokonalou (vajíčko, 4 larvální stádia, kukla a dospělý komár - imago). Proměna je závislá na celé řadě faktorů, k nimž patří teplota, vlhkost i kvalita prostředí. Tento proces popsal již řecký filozof Aristoteles **(Hůrka a Čepická, 1980)**.

Samičky rodu *Culex* kladou na hladině stojatých vod **vajíčka**, která lepí do útvaru připomínajícího malý člun. Ten může obsahovat kolem 100 vajíček. Pro vývoj těchto vajíček je optimální teplota vody asi 20°C. **Apodní** (beznohé) **larvy** brzy po zrození začínají přijímat potravu. Pohybují se mrskavým pohybem a na předposledním zadečkovém článku mají dlouhou dýchací trubičku (dýchací sifo), s jejíž pomocí se zavěšují k hladině, aby tak mohli dýchat vzdušný kyslík. Když jsou vyrušeny, snaží se ukrýt na dně, ale za chvíli se musí opět vrátit k hladině. Optimální teplota pro ně je 20 - 28 °C. Vývoj larev je rozdělen do 4 larválních stádiích - instarů. Potřeba svlékání vyplývá z toho, že kutikula hmyzu je tvořena chitinem, který je na rozdíl od elastické kůže pevný a proto, aby larva vytvořila co nejvíce zásob pro tvorbu vajíček, se musí zbavit staré kutikuly a nahradit ji novou. V tomto okamžiku se vytváří nový prostor pro tvorbu co největšího tukového tělesa. Dostatečně velká larva se larvo-kuklovou transformací mění v kuklu. **Kukla** nepřijímá potravu a pohybuje se rychlým kotoulovitým pohybem. V kukle se vytváří imaginální struktury. Po jejich dokončení se líhne dospělec nebo-li **imago**. U imaga po několika minutách až hodinách dochází ke zpevnění pokožky, napínají se křídla a tělo nabývá definitivního tvaru a zbarvení **(Clements, 2000 ; Hůrka a Čepická, 1980)**.

Samička komára rodu *Culex pipiens*, kladoucí vajíčka na vodní hladinu do typického útvaru připomínajícího malý člunek, který může obsahovat až 100 vajíček.

Detailní pohled na člunek vajíček, jež plave na hladině stojaté vody.

Čerstvě vylíhlá larva I. instaru z vajíčka.

Larvy jsou přichycené k vodní hladině pomocí dýchacího sifa, které je u larev III. a IV. instaru dosti sklerotisované a pigmentované; u mladších stádií bývá pigmentace jen částečná.

Kukly komára *Culex pipiens* jsou lehčí než larvy, protože prostor mezi kutikulou hlavohrudi kukly a tělním pokryvem vyvíjejícího se imaga je vyplněn vzduchem. Jejich zbarvení závisí na jejich stáří. Mladé kukly jsou zbarveny světle a starší kukly mají kutikulu tmavší.

Čerstvě se líhnoucí dospělí jedinec, u něhož dojde po několika minutách až hodinách ke zpevnění pokožky, napnutí křídel a tělo získá definitivní tvar a zbarvení (jako u následujících 2 obrázků).

Samička (vlevo) a sameček (vpravo) komára rodu *Culex*

(Obrázky převzaty z: **http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm** a text: **Kramář, 1958**).

1.2. Nemoci přenášené komáry

Samičky prostřednictvím hematofágie (sání krve) přenášejí do těla zvířete či člověka choroboplodné zárodky **(Clements, 2000)**. Samička po nabodnutí kůže vstřikuje do ranky slinu obsahující antikoagulancia. U infikovaných samiček slina obsahuje navíc patogenní agens – původce choroby. Některé druhy komárů vyskytujících se i v Česku, mohou pasivně přenášet lymeskou borreliózu. Pasivní přenos znamená, že původce nemoci nežije v těle komára, pouze byl přenesen s čerstvou krví, která komárovi ulpěla na sosáku a na těle **(Bartůněk et al., 2006)**.

1.2.1. Arbovirové infekce (arboviry = ARthropod-BOrne viruses)

Mezi tyto infekce patří RNA viry (např. Togaviridae a Flaviviridae, Bunyaviridae a Reoviridae). Jsou přenášeny krev sajícími artropody (např. komáry, klíšťaty, písečnými blechami, mouchami apod.), které tyto viry neničí. Po bodnutí infikovaným přenašečem se virus množí několik dnů v kapilárním endotelu a lymfatickém systému **(Lobovská, 2001)**.

Onemocnění způsobená arboviry mají dvoufázový, bifázický průběh, tzn. že charakteristické příznaky infekce nastupují za 4-10 dnů. Tyto infekce se nepřenášejí z člověka na člověka přímým kontaktem, ale prostřednictvím použitých jehel, manipulací s krví nemocného apod. Člověk se může také nakazit chorobou např. v endemických oblastech jejich výskytu, které navštíví bez předchozí vakcinace (např. žlutá zimnice) **(Lobovská, 2001)**.

V tabulkách **(Tab.1-3)**, uvedených v „Příloze“, jsou vypsány arboviry přenášené komáry.

1.2.1.1. Encefalitida japonská, západní a východní koňská, kalifornská, aj.

Encefalitida je přenášena infikovanými komáry různých druhů, kteří zůstávají infekční po celý život.

Japonská encefalitida se vyskytuje v mnoha oblastech Asie, od Indie přes Koreu, Indonésii, Čínu až po Japonsko. Přírodní ohniska jsou ve venkovských oblastech,

vázána na chov prasat. Západní a východní koňské encefalitidy se vyskytují v USA a Kanadě a některých oblastech střední a Jižní Ameriky **(Göpfertová et al., 2002)**.

1.2.1.2. Žlutá zimnice

Patří mezi arbovirové infekce. Vyskytuje se ve dvou formách - džunglové (lesní) a městské. U džunglové formy je zdrojem nákazy opice nebo jiný obratlovec. Jejím přenašečem v Jižní a střední Americe je komár *Haemagogus* a v Africe *Aedes africanus*. U městské formy je zdrojem člověk a přenašečem komár *Aedes aegypti* **(Göpfertová et. al., 2002; Lobovská, 2001)**.

1.2.1.3. Dengue

Je přenášena komárem rodu *Aedes*, hl. *Aedes aegypti*. Zdrojem onemocnění je člověk, případně některé druhy opic (hl. v Africe). Nejvyšší výskyt je v karibské oblasti a jihovýchodní Asii, Indii a Pacifiku **(Göpfertová et al., 2002; Lobovská, 2001)**.

1.2.2. Malárie

Původci tohoto onemocnění jsou prvoci rodu *Plasmodium*. Je přenášena komárem rodu *Anopheles* a zdrojem onemocnění je člověk. Vyskytuje se především v tropických oblastech Afriky, Asie (Čína, Indie, Indonésie, Pákistán), Střední a Jižní Ameriky **(Göpfertová et al., 2002)**.

1.2.3. Západonilská horečka

Původcem je flavivirus. Přenašeči jsou komáři rodu *Culex* (např. *Culex pipiens*) a zdrojem ptáci **(Drebot et. al., 2003; Wood et al., 1979)**.

1.3. Histologická technika

Zabývá se zpracováním tkání a orgánů lidského nebo jiného živočišného původu s cílem získat histologické preparáty, které je možné studovat ve světelném mikroskopu.

Skládá se z řady na sebe navazujících postupů: odběr materiálu, fixace, zalévání, krájení, barvení a uzavírání obarvených řezů **(Dvořák et. al., 1985; Knoz a Opravilová, 1992)**.

1.3.1. Odběr vzorků (materiálu)

Vyšetřovaný materiál musí být odebrán v co nejkratším čase, aby nedocházelo k následné destrukci tkáně autolytickými procesy a pro zachování ultrastruktury buněk. Z těchto uvedených důvodů je třeba odebranou tkáň ihned přenést do fixačního roztoku. Vzorek by měl být reprezentativní, tzn. měl by reprezentovat vyšetřovaný orgán či patologické změny dané tkáně. A měl by být takových rozměrů (např. pro světelnou mikroskopii cca 10 x 10 x 3 mm nebo o málo větší - 1 cm^3), aby použité fixační činidlo penetrovalo (pronikalo) správnou rychlostí do tkáně **(Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Materiál můžeme získat dvojím způsobem: buď čerstvý při operaci živého organismu (BIOPSIE), nebo při pitvě z orgánů získaných i několik hodin po smrti (NEKROPSIE). Takto připravené tkáňové kousky okamžitě vkládáme do některé z fixačních tekutin (pro tkáně vyšetřované po usmrcení), popř. fyziologického roztoku (pro tkáně vyšetřované za živa) podle toho jak budeme tkáň dále vyšetřovat **(Čech a Horký, 2005; Dvořák et. al., 1985)**.

Označení materiálu musí být v průběhu celého histologického zpracování přesné a správné, abychom předešli případné záměně **(Knoz a Opravilová, 1992)**.

1.3.2. Fixace

Je procesem, při kterém dochází k rychlému usmrcení živé hmoty fixačními prostředky. Použitím fixačních prostředků předejdeme probíhajícím samovolným změnám, např. rozpadu tkáně – autolýze. Podstatou fixace je změna fyzikálně chemických vlastností proteinů. Tato změna se týká výrazného snížení rozpustnosti proteinů a ztrátě jejich biologických vlastností, např. enzymatického působení. Při fixaci dochází vždy ke změnám struktury (vysrážení buněčných bílkovin, smrštění tkáně, vzniku artefaktů) oproti struktuře, kterou má tkáň za živa. Aby tyto změny byly

co nejmenší, musí být fixační prostředek co nejkvalitnější **(Junqueira et. al., 1997; Čech a Horký, 2005)**.

Fixační prostředky máme fyzikální a chemické. Fyzikální jsou málo používané. Uplatňují se hlavně v bakteriologii, kde živou hmotu fixujeme suchým teplem. Chemické prostředky se nejčastěji používají v histologii, kde se stále více uplatňuje fixace vysoušením na nízké teploty. Jedná se většinou o roztoky anorganických a organických sloučenin. Výběr tekutiny závisí na dalším zpracovávání odebraného materiálu (zda půjde o přehledné preparáty, o studie cytologické nebo o práce histochemické) **(Tab. 4 viz: Přílohy)**. Ne všechna fixativa jsou stejně vhodná pro určitý druh barvení. Některá špatně pronikají do tkáně, jiná fixují dobře jádra, nebo naopak cytoplasmu, proto používáme směsi 2 nebo více sloučenin, jejichž vlastnosti se navzájem doplňují. Kvalitní fixační tekutina musí rychle pronikat do tkání a nesmí narušovat jejich strukturu a porušovat jejich barvitelnost **(Dvořák et. al., 1985; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Do požadavků pro správný výsledek fixace zahrnujeme: fixování ještě živé tkáně, množství fixační tekutiny, které má být 50x více než činí objem bločku (bloček má být menší než 1 cm^3) a používání fixačních přípravků s vysokou penetrací **(Dvořák et. al., 1985)**.

Doba fixace závisí především na velikosti bločku (čím větší bloček, tím delší doba fixace), druhu tkáně, druhu a koncentraci fixační tekutiny (koncentrace nesmí být ani vysoké - vysrážení bílkovin ve velkých hrudkách a ani nízké - nedokonalá fixace) a na teplotě (většinou se fixuje při pokojové teplotě). S vyšší teplotou se urychlí fixace i autolytické pochody a také se zvýší smršťování preparátu. Nižší teplota (0-4°C) vyhovuje více, protože autolytické pochody jsou zpomaleny **(Jírovec, 1953; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Po skončení fixace vypíráme tkáň ve vodě nebo v alkoholu (podle použité fixační tekutiny), např. u Bouinovy tekutiny 80% alkoholem. Praním bločků odstraňujeme případné sraženiny vzniklé při fixaci a hlavně vyplavujeme z tkáně fixační roztok. K promývání ve vodě slouží promývací nádobky a promývání v alkoholu se děje jeho častou výměnou **(Čech a Horký, 2005; Jírovec, 1953)**.

1.3.3. Zalévání tkáňových bločků

Fixované a vyprané bločky můžeme zpracovat 2 způsoby: buď zmrazením na zmrazovacím mikrotomu a přímo z nich krájíme tenké řezy, nebo zaléváním do pevných a dobře krájitelných hmot (želatina, parafin, celoidin, celodal) a až poté zhotovujeme řezy na mikrotomu **(Dvořák et. al., 1985; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Tkáně zaléváme především proto, že i fixované jsou příliš měkké, takže mikrotomovému noži uhýbají, nebo mohou být jejich složky příliš volně spojené a řez by se po ukrojení rozpadl **(Knoz a Opravilová, 1992)**.

Zalévací média mohou být rozpustná ve vodě (např. želatina, celodal, polyethylenglykol), kdy se tkáňový bloček po vyprání ve vodě rovnou přenáší do roztoku těchto médií. Nebo ve vodě nerozpustná (např. parafín, celoidin), kdy se tkáň nejprve zbaví vody a až poté se zalévá. Zalévat můžeme do parafínu (postup: odvodnění tkáně; prosycení tkáně médiem, které rozpouští parafín a mísí se s alkoholem; prosycení tkáně alkoholem; vlastní zalití) nebo do vosků rozpustných ve vodě. Při zalévání do vosků se řezy nemusí odvodňovat, ale velmi obtížně se napínají na podložní sklíčko **(Čech a Horký, 2005)**.

1.3.4. Krájení tkáňových bločků

Buď se krájí přímo po zmrazení, nebo až po zalití do některých ze zalévacích médií. Pomocí mikrotomů se z tkáňových bločků zhotovují histologické řezy, tlusté několik nm až několik desítek μm. Podle účelu a konstrukce se mikrotomy rozdělují na 3 typy: mikrotomy sáňkové (používající se ke krájení řezů parafinových, celoidinových a celodalových), rotační (pro zhotovení sériových řezů z parafínových bločků) a zmrazovací (kryomikrotomy). Kryomikrotomy se používají pro rychlé stanovení histologické diagnózy, pro krájení tkání, které nesnášejí zalití do parafínu ani celoidinu (např. při průkazu lipidů), a při metodách používaných v histochemii. Základní součásti těchto mikrotomů jsou podobné (podstavec, nůž, zařízení na upevnění bločku a zařízení na posun bločku proti noži, nebo nože proti bločku) **(Dvořák et. al., 1985; Jírovec, 1953; Knoz a Opravilová, 1992)**.

1.3.4.1. Zpracovávání tkáňových řezů (Tab. 5 viz: Přílohy)

Parafínové řezy pořízené na rotačním a sáňkovém mikrotomu napínáme na podložní skla, jež jsou opatřena jemným nátěrem směsi glycerinu s bílkem (příp. s želatinou). Na takto připravená skla přeneseme parafínový řez a podkápneme jej destilovanou vodou.

Podložní sklo položíme na ploténku vyhřátou na 40-45°C. K úplnému přichycení řezů dochází až v termostatu (asi za 24 hod. při 38-40°C), kde se voda zcela odpaří a bílek koaguluje **(Jírovec, 1953)**.

Řezy pořízené na zmrazovacím mikrotomu přeneseme do destilované vody nebo do fyziologického roztoku podle toho, zda byla tkáň fixována či ne. Kryostatové řezy můžeme přenášet přímo na podložní skla, což má význam v histochemii, protože se minimalizuje možnost difúze látek v řezu **(Knoz a Opravilová, 1992; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Podložní skla označíme před uložením diamantovým nožem vhodně zvolenou značkou, aby nebyla zaměnitelná **(Dvořák et. al., 1985; Jírovec, 1953)**.

1.3.5. Barvení histologických objektů

Většina histologických barvících metod je založena na poznání, že různé buněčné a tkáňové elementy na sebe váží různá barviva **(Knoz a Opravilová, 1992; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Druhy barvení rozlišujeme z praktického hlediska na vitální barvení a barvení fixovaných tkání (nejčastější). U vitálního barvení se používají vitální barviva kyselá (např. trypanová modř, lithiový karmín) nebo zásaditá (např. methylenová modř – barví nervová vlákna). Rozeznáváme barvení přísně vitální (vpravení roztoku do živého těla) a supravitální (barvení právě vyříznutých kousků tkáně ponořením do roztoku barviva nebo nástřik cév právě usmrceného zvířete). Při supravitálním barvení je třeba respektovat časový faktor (nefixovaná tkáň podléhá autolýze). U barvení fixovaných tkání mají kyselá barviva afinitu ke složkám cytoplasmy a bazická jsou barviva jaderná **(Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Většina barviv používaných v histologii zbarví příslušnou strukturu týmž barevným tónem, který má barvivo samo (ORTOCHROMAZIE), nebo se tkáňové složky zbarví jiným barevným odstínem, než jaké má základní barvivo (METACHROMAZIE). Např. roztokem toluidinové modři (modré barvivo) se hlen zbarví červenofialově **(Dvořák et. al., 1985)**.

1.3.5.1. Příprava řezů k barvení

Zmrazené řezy (kryořezy) a celoidinové řezy je možné (po opláchnutí vodou) barvit přímo. Parafínové řezy se nejprve musí odparafínovat použitím 2 lázní xylenu, sestupnou řadou alkoholů (100 a 96%) a destilovanou vodou. Po vyprání řezů ve vodě přistupujeme k vlastnímu barvení histologických preparátů v kyvetách **(Jírovec, 1953)**.

1.3.5.2. Základní barvící metody

Přehledná barvení **(Tab. 6 viz: Přílohy)** poskytují pozorovateli celkový obraz preparátu. Při barvení hematoxylinem a eosinem se jádra a chrupavky zbarví modře (hematoxylin), cytoplasmy lehce růžově, svalové tkáně červeně a vaziva růžově (eosin). Barvení "Azan" zbarví jádra do karmínově červené, erytrocyty oranžově, kolagenní vazivo do jasně modré a svalovinu červeně. Při barvení Weigert van Giesonem je svalstvo žluté (kyselina pikrová), kolagenní vazivo třešňově červené (fuchsin) a jádra temně modrá **(Čech a Horký, 2005; Knoz a Opravilová, 1992; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

Speciální barvení mají barevně vyzdvihnout určité buněčné či tkáňové složky **(Tab. 6 viz: Přílohy)**. Nejužívanějšími metodami pro znázornění kolagenního vaziva jsou Masonovy trichromy. Podle barevného tónu, jímž se vybarví kolagen, rozlišujeme trichrom žlutý, trichrom modrý a trichrom zelený. Elastická vlákna barvíme orceinem, diferencujeme kyselým alkoholem až vyniknou svým červenohnědým zbarvením a jádra dobarvujeme hematoxylinem. Kromě této metody se používá i barvení elastických vláken aldehydovým fuchsinem (fialově) nebo resorcinolovým fuchsinem (modročerně). Znázornění retikulárních vláken se provádí impregnací dusičnanem stříbrným i histochemickou reakcí PAS na polysacharidy. Mezi jaderná barvení patří:

barvení podle Heidenhaina (barvení hematoxylinem, jímž se kromě jaderného chromatinu zbarví černě i mitochondrie a sekreční granula buněk), barvení jádrovou červení (ortochromatické barvení) a barvení galocyaninem. Tyto metody již tvoří přechod k metodám histochemickým, rovněž i Feulgenova jaderná reakce spočívá v histochemickém průkazu DNA **(Dvořák et. al., 1985)**.

Metody znázornění buněčných organel nemají v období elektronové mikroskopie větší význam **(Knoz a Opravilová, 1992; Jírovec, 1953)**.

1.3.5.3. Impregnační metody

Impregnace spočívá v prosycení tkáně roztokem soli kovu (nejčastěji se používají soli stříbra, zlata a osmia) a v následující redukci kovu na strukturách, které k nim mají afinitu **(Tab. 6 viz: Přílohy)**. Nejvyšší afinitu k solím kovů mají retikulární vlákna, nervová vlákna, gliové elementy a někdy i další struktury jako např. buněčná jádra, kolagenní vlákna apod. **(Čech a Horký, 2005)**

Těchto metod existuje velké množství a jejich podstata je stejná. Například Gomoriho metoda ke znázornění retikulárních vláken, Bielschowského metoda impregnace neurofibril **(Dvořák et. al., 1985; Maňáková a Seichertová, 2002)**.

1.3.6. Uzavírání (montování) obarvených řezů

Máme-li preparát dobře obarvený či naimpregnovaný, uzavíráme (montujeme) jej mezi podložní a krycí sklo. Můžeme k tomu použít medií rozpustných ve vodě, medií nemísících se s vodou i medií rozpustných v xylenu. Nejčastěji se používá kanadský balzám, který se nemísí s vodou. Pokud řez nesmí přijít do styku s organickými tukovými rozpouštědly, používají se k montování media mísící se s vodou (glycerinová želatina, sirup z arabské gumy = Apáthyho sirup, nebo glycerin). Uzavíráme-li řez do glycerolu, musíme krycí sklo orámovat voskem, tmelem z kalafuny apod. **(Dvořák et. al., 1985; Jírovec, 1953; Maňáková a Seichertová, 2002)**

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cíle předložené práce:

- zpracovat literární rešerši o současném stavu
- vyzkoušet histopatologické metody
- posoudit jejich vhodnost pro studium vývoje samičích pohlavních orgánů a využívání obrazové analýzy

Hypotézy:

- využití histopatologických metod a obrazové analýzy při studiu hmyzí reprodukce

3. MATERIÁL A METODIKA

Předložená práce byla zaměřena na studium různých histologických metod využitelných při studiu vývoje, rozmnožování a případného přenosu patogenních agens u komárů komplexu *Culex pipiens*. Ke studiu byl využíván druh *Culex pipiens quinquefasciatus* Say.

3.1.Metodika chovu

Komáři druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* Say byli chováni ve standardních podmínkách – teplota 25±1°C, relativní vlhkosti 75±10% a fotoperiodě 16 L : 8 D. Dospělci byli chováni v plexikových boxech **(Olejníček, 1993)**, kam byla vložena kostka cukru a miska s vodou. Samicím byla předkládána 1x týdně myš, aby se nasály krve. Samice kladly vajíčka v jednotlivých snůškách do vody. Embryonální vývoj trval 48 hod. Vylíhlým larvičkám I. instaru byl do vody vkládán PANGAMIN (lyofylizované pivovarské kvasnice). Larvální vývoj je rozdělen do 4 larválních stádií (instarů). Larvy posledního instaru se po 7-8 dnech kuklí. Po 48 hodinách se z kukel líhnou dospělci. Jako první se líhnou samci. Tento druh je tedy typickým představitelem proterandního hmyzu.

3.2. Zpracovávání materiálu

Ze základního chovu komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* byly odebírány kukly. Po přeměně kukel v dospělce byly samice izolovány a samci vráceni zpět k chovu.

3.2.1. Odběr modelového materiálu

U samic znehybněných nízkou teplotou byly pod mikroskopem firmy Olympus odděleny pohlavní orgány nebo celé zadečky za použití histologických nůžek a pinzet.

3.2.2. Fixace

Oddělené tkáně byly ihned přendány do fixační tekutiny Carnoy nebo Bouin,

modifdikace Dubosque-Brasil, jejichž přípravu a délku fixace uvádějí následující tabulky **(Tab. 7, 8 a 9)**.

Tab. 7: Příprava fixační tekutiny Bouin, modifdikace Dubosque-Brasil (upraveno podle: **Wolf, 1954**)

Použitá látka	**množství**
kyselina pikrová	1 g
80% alkohol	150 ml
kyselina octová	15 ml
40% formol	60 ml

Tab. 8: Příprava fixační tekutiny Carnoy (upraveno podle: **Jírovec, 1953**).

Použitá látka	**Množství v ml**
96% alkohol	6
chloroform	3
koncentrovaná kyselina octová	1

Tab. 9:

Fixační tekutina	**Doba fixace**
Bouin, modifikace Dubosque-Brasil	1-24 hodin
Carnoy	5 a 10 minut

3.2.3. Zalévání tkáňových bločků

Po uplynutí nezbytně nutné doby pro dostatečné prosycení fixačními činidly byla nafixovaná tkáň odvodněna a následně zalita do paraplastových (parafínových) **(Tab. 10)** a pryskyřičných bločků **(Tab. 11)**. Pro zalévání do paraplastových bločků se použila tkáň nafixovaná v Carnoyho i Bouinově fixáži a pro pryskyřičné řezy tkáň prosycená Bouinem. Tkáň se zalévala do zalévacích formiček, které se v případě pryskyřičných bločků daly na 24 hodin do termostatu a paraplastové bločky se po stejnou dobu (24 hodin) nechaly volně ztuhnout v kelímku se studenou vodou.

Tab. 10: Postup při odvodňování a zalití do paraplastových (parafínových) bločků (upraveno podle: **Jírovec, 1953; Wolf,1954**).

Použitá látka	**Časový údaj**
70% alkohol (3x)	po 8 hodinách
96% alkohol (3x)	po 8 hodinách
alkohol: methylbenzoat	1 hodina
methylbenzoat I. II. III.	po 6 hodinách
benzol I. II.	**maximálně 10 minut**
benzol-parafin	1 hodina při 45°C
parafin I. II. III. IV.	po 4-6 hodinách

Tab. 11: Příprava pryskyřičných bločků (ústní sdělení: **Gelbič, 2008**)

Použitá látka	**Časový údaj**
70% etanol	do odstraní zbytků kyseliny pikrové
80% etanol	15 min
90% etanol	15 min
96% etanol	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

3.2.4. Krájení tkáňových bločků

Po uplynulých 24 hodinách se ztuhlé bločky vyndaly ze zalévacích formiček a upravil se jejich tvar pro snadné krájení na mikrotomech.

3.2.4.1. Paraplastové (parafínové) bločky

Parafinové řezy pořízené na rotačním mikrotomu Leica byly napnuty na předem označená podložní sklíčka, opatřená jemným nátěrem směsi glycerinu a bílku. Na takto

připravená sklíčka byly přeneseny parafínové řezy a podkápnuty destilovanou vodou, aby došlo k jejich napnutí. Poté byla položena na topnou ploténku vyhřátou na 40°C.

3.2.4.2. Pryskyřičné bločky

Jednotlivé pryskyřičné řezy pořízené na ultramikrotomu Reichert byly pomocí jemných štětečků přenášeny do kapky vody na podložní sklíčka. Po zaschnutí byly řezy barveny toluidinovou modří.

3.2.5. Barvení histologických preparátů

Odparafínované řezy **(Tab. 12)** byly barveny Malloryho metodou **(Tab. 13)** nebo Mayerovým **(Tab. 14)** či Harrisovým hematoxylinem **(Tab. 15)**. V průběhu barvení byly histologické preparáty pozorovány pod mikroskopem, aby se zachytil okamžik správně obarvené modelové tkáně.

Tab.12: Postup při odparafínování (upraveno podle: **Jírovec, 1953; Wolf, 1954**)

Použitá látka	**Časový údaj (minuty)**
2x xylol	po 10
3x 96% alkohol	po 5
2x 70% alkohol	po 5
destilovaná voda	5

Tab. 13: Postup při barvení Malloryho směsí (upraveno podle: **Dědová, 2008**)

Použitá látka	**Časový údaj**
Ponceau (kyselý fuchsin)	3 ½ minuty
destilovaná voda	propláchnout
1 % kyselina fosfomolybdenová	5 minut
destilovaná voda	propláchnout
směs Mallory	9 minut
destilovaná voda	2x propláchnout
3x 96% alkohol	vždy ponořit a hned vyndat
xylen	propláchnout

Tab. 14: Postup při barvení Mayerovým hematoxylinem (upraveno podle: **Dědová, 2008**)

Použitá látka	**Časový údaj (minuty)**
eosin (asi 1%)	2
destilovaná voda	propláchnout
Mayerův hematoxylin	15
vodovodní voda	propláchnout
2x 70% alkohol	4
2x 96% alkohol	4
2x xylen	4

Tab. 15: Postup při barvení Harrisovým hematoxylinem (upraveno podle: **Dědová, 2008**)

Použitá látka	**Časový údaj (minuty)**
eosin	1 ½
destilovaná voda	propláchnout
Harrisův hematoxylin	2
tekoucí vodovodní voda (malý proud)	5
2x 70% alkohol	3
2x 96% alkohol	3
2x xylen	3

3.2.6. Uzavírání (montování) obarvených řezů

Obarvené histologické preparáty se zamontovaly do permontu (umělé pryskyřice).

3.4. Zpracovávání výsledků

Následovalo mikroskopické prohlížení a zpracovávání dokumentace za použití digitální kamery DP 50 firmy Olympus připevněné na mikroskop BX 51 též firmy Olympus **(Obr. 8)**.

4. VÝSLEDKY

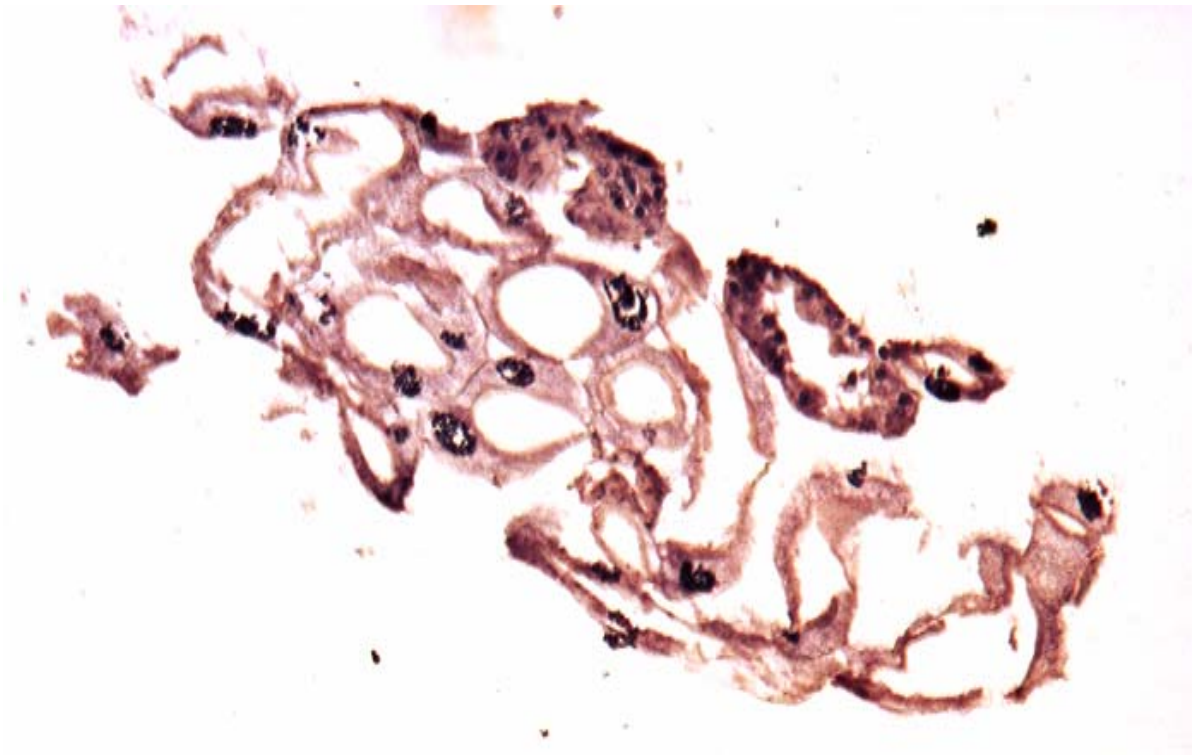
Předmětem sledování této bakalářské práce je vhodnost používaných fixačních a barvících metod na modelovém objektu, kterým jsou samice komára *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Pro toto hodnocení byly odděleny reprodukční systémy samic a celé zadečky.

Studovaná tkáň byla fixována buď fixáží Carnoy **(Obr. 1,2)**, nebo v alkoholovém Bouinu, modifikace Dubosque-Brasil **(Obr. 3 - 7)**. Fixace v Carnoy probíhala velice rychle. Z důvodů lepšího pronikání fixáže do tkáně probíhalo fixování v chladu při teplotě kolem 6°C. Při pokojové teplotě fixační činidlo proniká studovanou tkání velice rychle a je nutné přesné stanovení doby fixace. Většinou došlo k přefixování a tkáň se nedala dobře histologicky zpracovat. Tkáň se drobila a při krájení na mikrotomu vypadávaly velké kusy tkáně. Fixování tkáně Bouinem, modifikací Dubosque-Brasil, probíhala při pokojové teplotě.

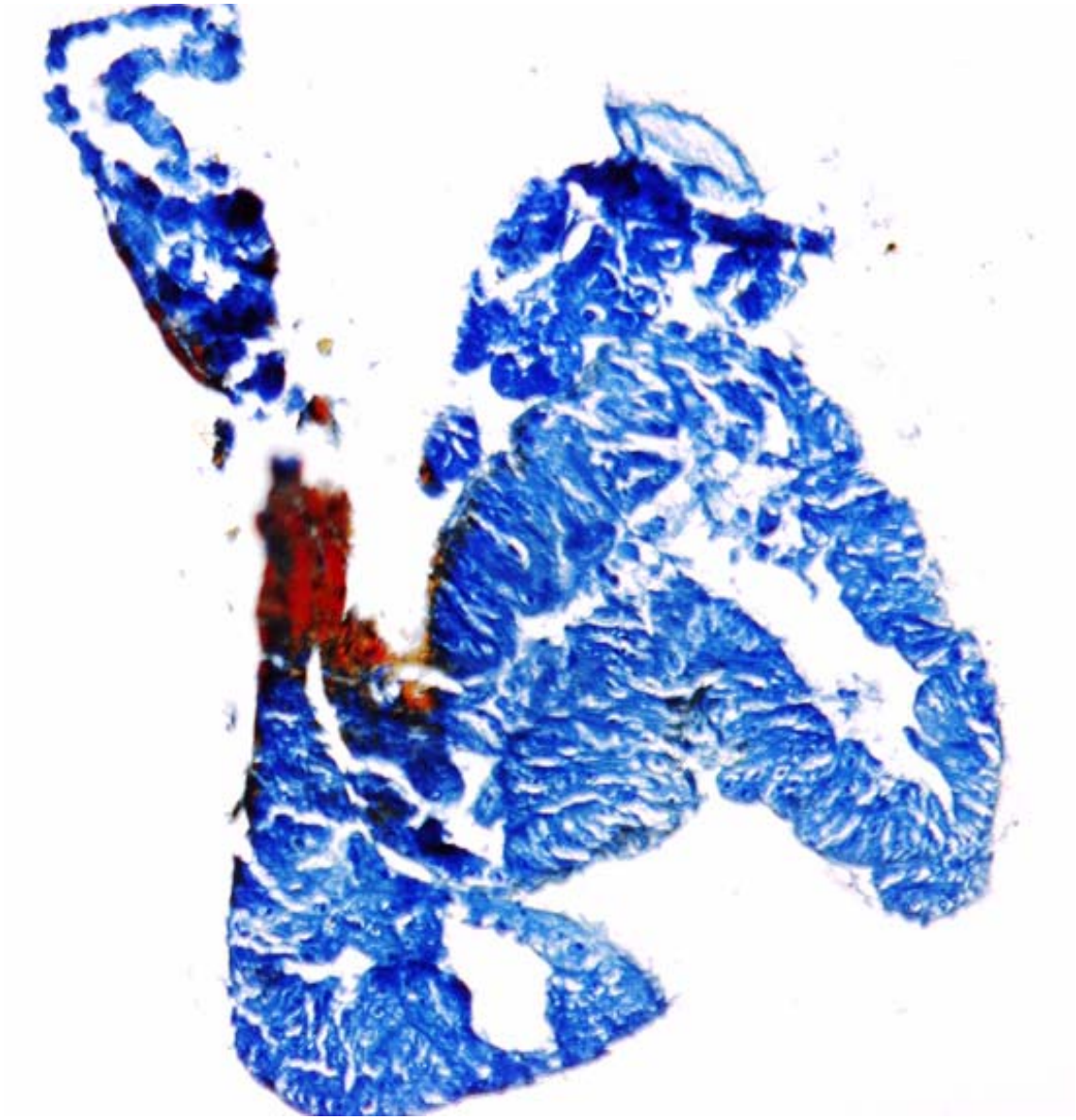
Po fixaci byla sledovaná tkáň převedena do parafinu nebo pryskyřice, aby bylo možné zhotovit histologické řezy, které se podrobovaly dalším procedurám. Parafinové řezy se musely nejprve zbavit parafinu a převést do vody. Poté následovalo barvení. Zkoušelo se barvení podle Malloryho **(Obr. 2,5,6)** nebo hematoxyliny Mayer **(Obr. 1,4)** či Harris **(Obr. 3)**. U těchto metod musela být upravena doba barvení pro používaný typ tkáně. Aby došlo ke správnému zbarvení histologických řezů, byla tkáň v průběhu barvení pozorována pod mikroskopem. Přesto se stalo, že tkáň byla přebarvená, nedobarvená nebo dokonce neobarvená. V případě přebarvení se tkáňové řezy diferencovaly v 2% roztoku kamence železitého (u hematoxylinů).

V průběhu barvení Mayerovým či Harrisovým hematoxylinem se jádra dobarvovala v 1% roztoku eosinu. Po obarvení hematoxyliny byla tkáň srovnatelná. Nabývala dvou odstínů fialové barvy, a to červenofialového (Mayerův hematoxylin) a fialového (Harrisův hematoxylin) s tmavě fialovými až černými jádry. Řezy barvené Malloryho barvící metodou měly více barev. Lépe se tak daly rozlišit jednotlivé struktury tkáně jako např. vazivo (modré), buněčná jádra (červená), jadérka (oranžová) a další části tkáně.

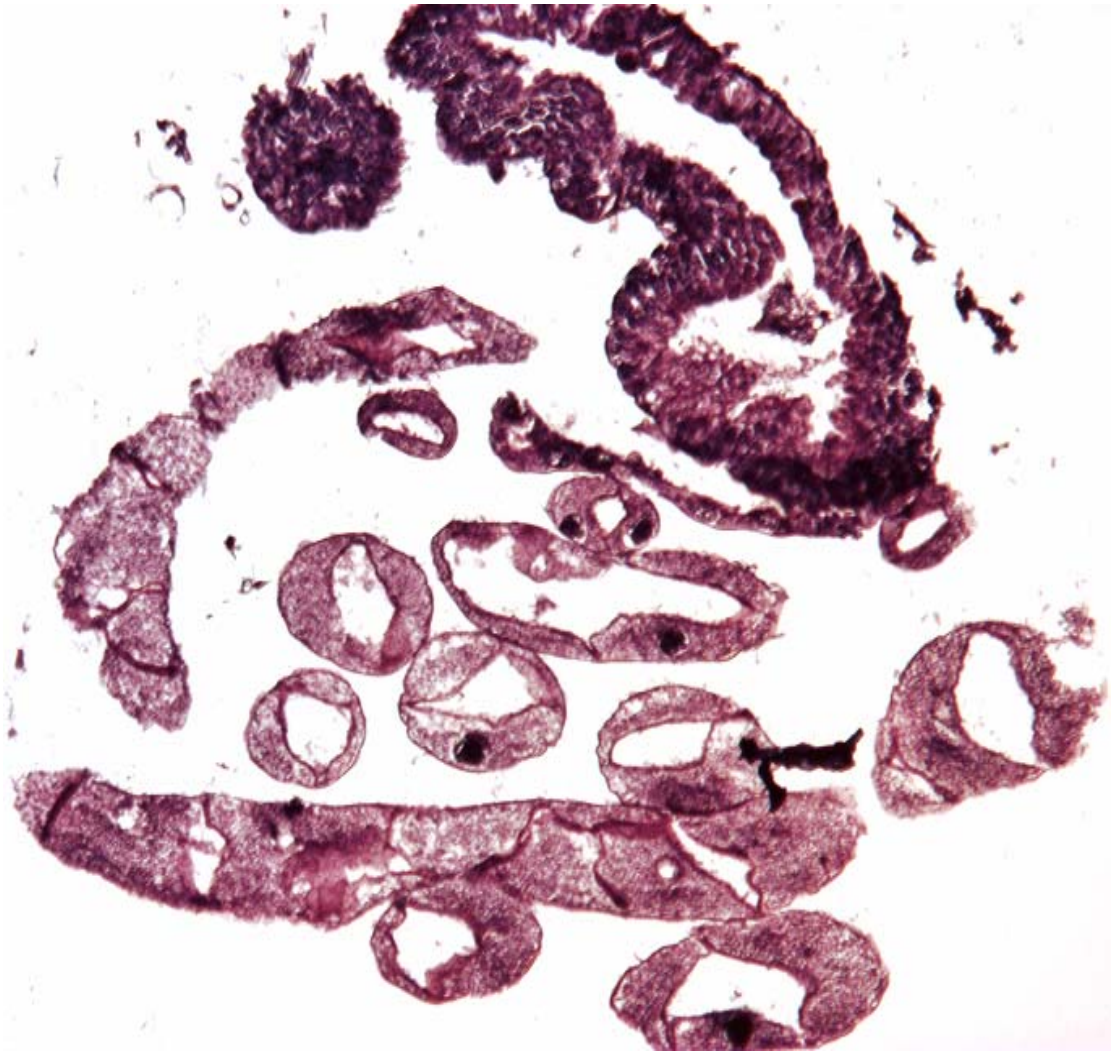
Polotenké řezy zhotovené z materiálu zalitého do pryskyřice se barvily pouze toluidinovou modří. Tkáň byla vybarvena modře a byly dobře zřetelné jednotlivé struktury **(Obr. 7)**. Nevýhodou této metody je, že se, v případě potřeby, těžko připravují sériové řezy, které jsou potřebné pro zachycení jednotlivých fází vývoje samičích pohlavních orgánů. Pro sériové řezy je vhodnější používání parafinových řezů.



Obr.1: Řez samičím reprodukčním orgánem fixovaným v Carnoyho fixáži po dobu 10 minut a obarveným Mayerovým hematoxylinem **(Zdroj: vlastní výzkum)**.

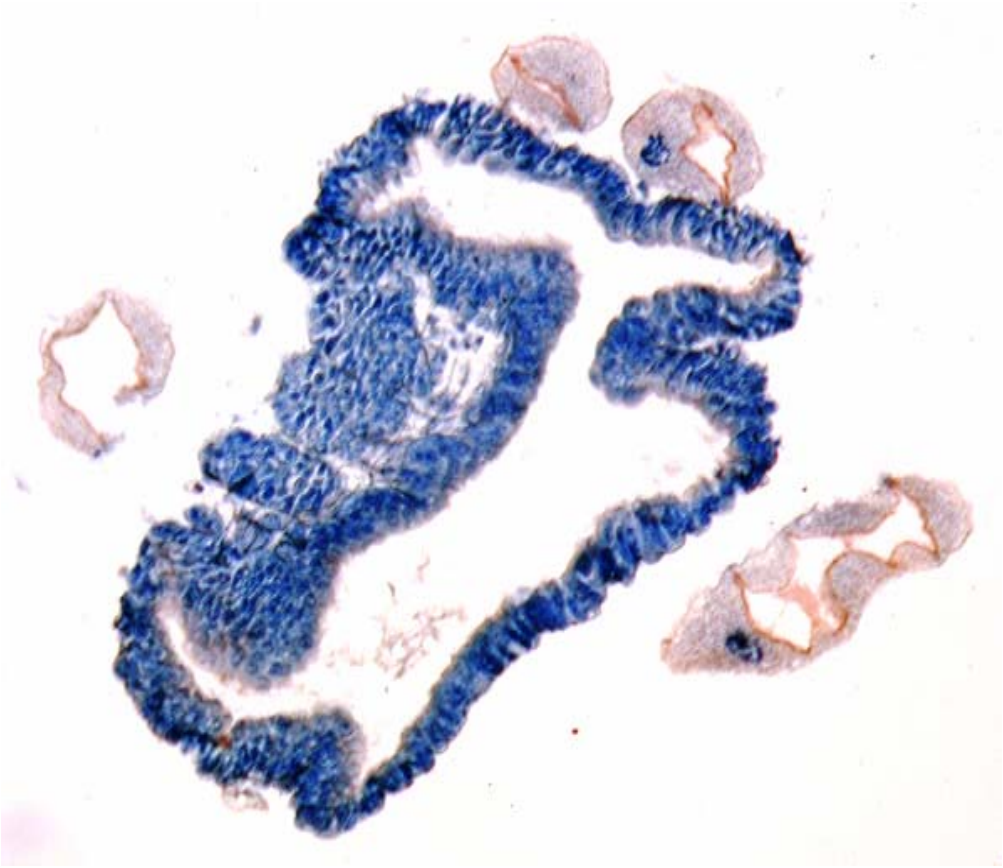


Obr. 2: Řez samičím reprodukčním orgánem fixovaným v Carnoyho fixáži po dobu 10 minut a obarveným Malloryho barvící metodou. Díky přefixování došlo k potrhání tkáně **(Zdroj: vlastní výzkum)**.

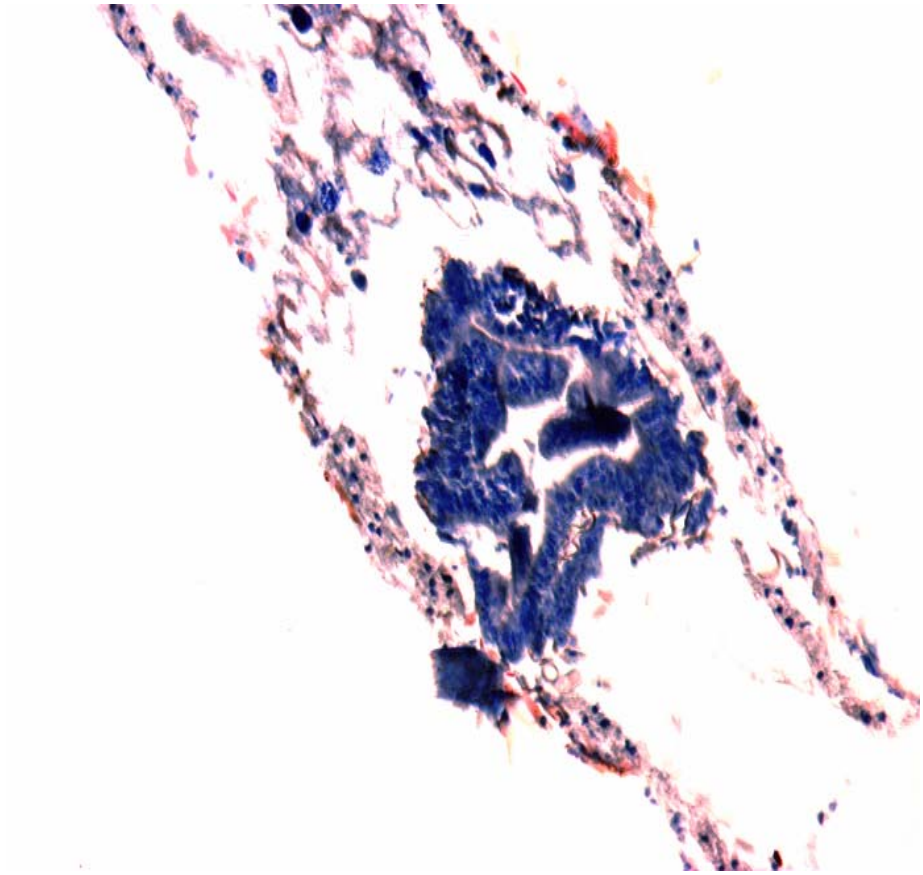


Obr. 3: Řez samičím reprodukčním orgánem fixovaným v Bouinu, modifikaci Dubosque-Brasil a obarveným Harrisovým hematoxylinem **(Zdroj: vlastní výzkum)**.

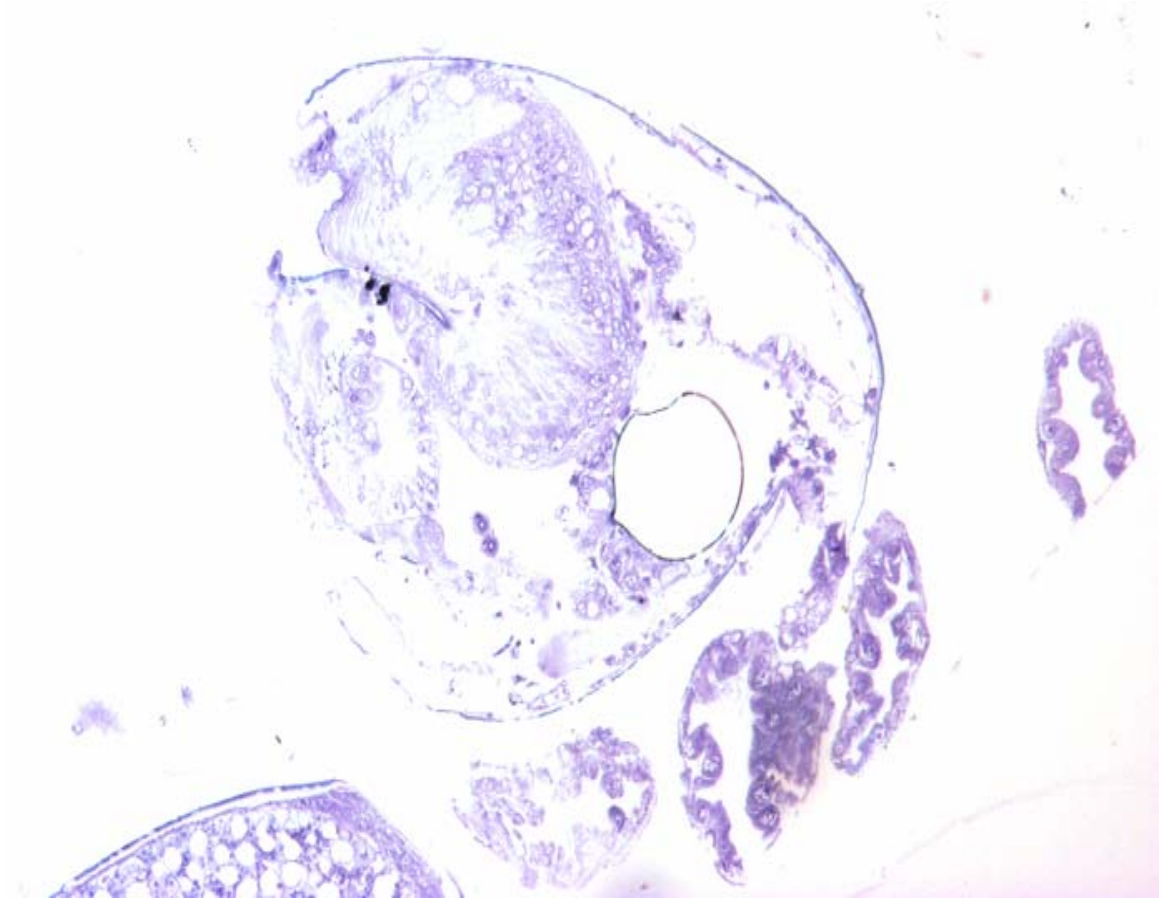
Obr. 4: Řez samičím reprodukčním orgánem fixovaným v Bouinu, modifikaci Dubosque-Brasil a obarveným Mayerovým hematoxylinem. Na tomto obrázku je patrné částečné obarvení jednotlivých struktur sledované tkáně **(Zdroj: vlastní výzkum)**.



Obr. 5: Řez samičím reprodukčním orgánem fixovaným v Bouinu, modifikaci Dubosque-Brasil a obarveným Malloryho barvící metodou **(Zdroj: vlastní výzkum)**.



Obr. 6: Část samičího zadečku fixovaného v Bouinu, modifikaci Dubosque-Brasil a obarveného Malloryho barvící metodou. Na tomto obrázku je patrné jak se po obarvení Malloryho metodou zbarví jednotlivé komponenty sledované tkáně různými barvami **(Zdroj: vlastní výzkum)**.



Obr. 7: Pryskyřičný polotenký řez samičím reprodukčním orgánem nafixovaným Bouinovou tekutinou a obarveným toluidinovou modří, zvýrazňující ultrastrukturu sledované tkáně **(Zdroj: vlastní výzkum)**.

5. DISKUZE

Předmětem předložené práce je srovnávání histologických metod a jejich vhodná použitelnost pro studium vývoje, rozmnožování a případného přenosu patogenních agens u komárů komplexu *Culex pipiens*. Tyto sledované histologické metody používaných fixáží a barviv byly zmodifikovány pro modelový objekt komára druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* Say.

Pro fixaci sledované tkáně byly používány chemické fixační tekutiny Bouin, modifikovaný Dubosque-Brasil, nebo Carnoy.

Bouin, modifikovaný Dubosque-Brasil, je jedna z nejčastěji používaných fixáží obsahujících kyselinu pikrovou **(Knoz a Opravilová, 1992)**. Má četné výhody, které zahrnují např. rychlé pronikání do tkáně, zachování barvitelnosti, dobrou fixaci jader i větších objektů (např. embrya, mořské živočichy) a vhodnost pro jakýkoliv histologický obraz **(Knoz a Opravilová, 1992)**. Její největší předností je, že se v ní může sledovaná tkáň uchovávat po neomezeně dlouhou dobu (od několika měsíců až po několik let) bez toho, že by došlo k znehodnocení tkáně. Přesto má tato fixační tekutina i své nevýhody. Nehodí se pro fixaci překrvených orgánů např. sleziny, protože hemolyzuje krev a tím dochází ke vzniku sraženin **(Knoz a Opravilová, 1992)**, a pro zalévání do celoidinu **(Jírovec, 1953)**. Její využití v imunohistochemii jako fixativa závisí na primární protilátce a typu antigenu **(Maňáková a Seichertová, 2002)**. Hodí se i pro fixaci při histochemickém průkazu sacharidů **(Čech a Horký, 2005; Dvořák et. al., 1985)**. Bouin jako fixační tekutina byl využíván i v jiných studiích prováděných na různých druzích komárů **(Hernández-Martínez et. al., 2002; Moncayo et.al., 2005; Pasteur et al., 2001; Scott et al., 2000)**.

Fixační tekutina Carnoy je fixační směs s chloroformem **(Knoz a Opravilová, 1992)**, kterou je nutné před vlastním užitím připravit vždy čerstvou. Nejčastěji se užívá u tkání obsahujících chitinové struktury. Při jejím používání se musí stanovit doba penetrace, jinak může snadno docházet k přefixování sledované tkáně, která se tak stává nepoužitelnou pro další zpracovávání. Při krájení přefixované tkáně docházelo k vylamování celých bločků, tkáň se drobila a trhala. Tato fixační tekutina byla použita i v jiných studiích **(Li et. al., 2003; Vazeille et. al., 2007)**.

Nafixované preparáty již zmíněnými fixačními tekutinami byly posléze obarveny modifikovanými barvícími metodami Mallory nebo hematoxyliny Mayer či Harris **(Jírovec, 1953; Wolf, 1954)**.

Mallory je barvící metoda skládající se z několika barviv a díky tomu poskytuje polychromatické obarvení řezových preparátů, na nichž jsou potom patrné jednotlivé komponenty barvené tkáně. Je to vhodná metoda pro studium vaziva, chitinu, řezových preparátů hmyzu a embryonálních preparátů **(Knoz a Opravilová, 1992)**. Její nevýhoda spočívá v diferenciaci obarvené tkáně, která se musí provádět velice citlivě, aby nedošlo k vyplavení anilinových barev .

Vyplavování barev hrozí především při používání hematoxylinů Harris a Mayer. V průběhu těchto dvou barvení dochází k vypírání zbytků kyseliny tekoucí vodou, aby se tak zabránilo negativnímu ovlivnění výsledku barvení. Obě metody jsou dobarvovány eosinem, popř. jinými barvivy jako např. kongočervení, Oranž G, nebo van Giesonem **(Jírovec, 1953; Knoz a Opravilová, 1992; Wolf, 1954)**. Po obarvení nabývá sledovaná tkáň srovnatelných barev. V případě Mayerova hematoxylinu červenofialového odstínu a u Harrisova hematoxylinu fialového odstínu. Tyto hematoxyliny byly využity i při jiných studiích **(Harrisův hematoxylin - Hernández-Martínez et. al., 2002; Li et. al., 2003; Mayerův hematoxylin – Vazeille et. al., 2007)**.

V předložené práci byl modelový objekt obarven i toluidinovou modří, která se používá v histochemických metodách pro průkaz sacharidů **(Čech a Horký, 2005; Dvořák et. al., 1985)**. Používají ji i v jiných studiích **(Gupta et. al., 2005; Hernández-Martínez et. al., 2002)**.

Závěrem lze říci, že pro sledování tkáně na daném modelovém objektu se ukázala jako nejvhodnější fixační tekutina Bouin,modifikovaný Dubosque-Brasil a z barvících metod Mallory.

6. ZÁVĚR

Z dospělých samic druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* bylo odděleno pohlavní ústrojí a celé zadečky. Tyto části byly následně histologicky zpracovávány podle již zmíněných fixačních a barvících metod a vyhodnocovány.

Na základě vyhodnocených výsledků se ukázalo, že nejvhodnější fixační tekutinou modelového objektu je Bouin, modifikovaný Dubosque-Brasil, jehož uplatnění v histologii je široké. Jednak je vhodný pro uchovávání tkání po delší dobu bez jejího poničení a kromě histologických metod je využíván i v histochemických a imunochemických metodách. A jako nejvhodnější barvící metodou, která má schopnost rozlišit více jednotlivých komponent modelové tkáně, je Malloryho směs.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BARTŮNĚK P., HULÍNSKÁ D., JANOVSKÁ D., CALDA P., HOZA J., PICHA D., HERCOGOVÁ J., VALESOVÁ M. Lymeská borelióza.3.doplněné a přepracované vydání.Praha:Grada Publishing, 2006.128s. ISBN 80-247-1543-0.

BECKER N., PETRIČ D., ZGOMBA M., BOASE C., DAHL CH., LANE J. and KAISER A. Mosquitoes and their control. Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Z., Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2003.498s.

CLEMENTS A.N. The Biology of Mosquitoes. Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction. CABI Publishing, Oxon. 2000.ISBN 0-85199-374-5.

COLLIER L. and OXFORD J. Human Virology.USA: Oxford University Press, 2006.328s. ISBN 0198566603.

ČECH S., HORKÝ D. Přehled obecné histologie.1.vydání. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2005.140s.ISBN 80-210-3854-3.

DREBOT M.A., LINDSAY R., BARKER I. K., BUCK P. A., FEARON M., HUNTER F., SOCKETT P. and ARTSOB H. West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective. The Canadian journal of Infectious diseases, 2003 Mar–Apr; 14(2): 105–114.

DVOŘÁK M., ČECH S., KONEČNÁ H., TRÁVNÍK P. Histologická a elektronově mikroskopická technika pro posluchače fakulty lékařské.1.vydání.Brno: Rektorát Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, 1985.64s.

GÖPFERTOVÁ D., PAZDIORA P., DÁŇOVÁ J.Epidemiologie infekčních nemocí. 1.vydání. Praha:Karolinum, 2002.230s. ISBN 80-246-0452-3.

GUPTA L., KUMAR S., HAN Y. S., PIMENTA P. F. P., and BARILLAS-MURY C. Midgut epithelial responses of different mosquito–*Plasmodium* combinations: The actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. Volume 102(11); March 15, 2005. 4010–4015.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ S., LANZ H., RODRGUEZ M. H., GONZÁLEZ-CERON L., and TSUTSUMI V. Cellular-Mediated Reactions to Foreign Organisms

Inoculated into the Hemocoel of Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae).Journal of Medical Entomology. Volume 39. Issue 1, 2002. 61-69.

HŮRKA K., ČEPICKÁ A.Rozmnožování a vývoj hmyzu.1.vydání.Praha: Státní pedagogické nakladatelství,1980.223s.

JÍROVEC O. Zoologická technika. 3.vydání.Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1953. 314s.

JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J., KELLEY R.O.[z anglického originálu přeložil Jelínek R.]Základy histologie.1.vydání. Jinočany : H & H, 1997.502s.ISBN 80-85787-37-7.

KNOZ J. a OPRAVILOVÁ V.Základy mikroskopické techniky. 1.vydání. Brno: Masarykova univerzita,1992.195s.ISBN 80-210-0473-8.

KRAMÁŘ J.Fauna ČSR. Svazek 13.Komáři bodaví:Culicinae (Řád: Dvoukřídlí – Diptera). Praha: Nakladatelství ČSAV, 1958.284s.

LI Y., HERNANDEZ-MARTINEZ S., UNNITHAN G. C., FEYEREISEN R., NORIEGA F. G. Activity of the corpora Allata of adult female Aedes aegypti: effects of mating and Frediny. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33, 2003.1307-1315.

LOBOVSKÁ A. Infekční nemoci.Praha:Karolinum, 2001.263s. ISBN 80-246-0116-8.

MAŇÁKOVÁ E., SEICHERTOVÁ A. Metody v histologii. Praha: Karolinum, 2002. 54s.ISBN 80-0230-X.

MONCAYO A. C., LERDTHUSNEE K., LEON R., ROBICH R. M., and ROMOSER W. S.Meconial Peritrophic Matrix Structure, Formation, and Meconial Degeneration in Mosquito Pupae/Pharate Adults: Histological and Ultrastructural Aspects. Journal of Medical Entomology.Volume 42. Issue 6,2005. pp. 939–944.

OLEJNÍČEK J. Plexiglas box system for mosquito rearing. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, 1993.18: 38-39.

OLEJNÍČEK J., GELBIČ I. Autogeny in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J. Vector Ecol.* 25, 2000.118-122.

PASTEUR N., NANCÉ E. and BONS N.TissueLocalization of Overproduced Esterases in the Mosquito Culex pipiens (Diptera : Culicidae). Journal of Medical Entomology. Volume 38, Issue 6, 2001. pp. 791–801.

REICHHOLF-RIEHM H. H. Hmyz a pavoukovci. Praha: Ikar, 1997, 287s.

SCOTT T. W., AMERASINGHE P. H., MORRISON A. C., LORENZ L. H., CLARK G. G., STRICKMAN D., KITTAYAPONG P., and EDMAN J. D.Longitudinal Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency. Journal of Medical Entomology. Volume 37, Issue 1, 2000. pp. 89–101.

VAZEILLE M., MOUTAILLER S., COUDRIER D., ROUSSEAUX C., KHUN H., HUERRE M., THIRIA J., DEHECQ J. S., FONTENILLE D., SCHUFFENECKER I., DESPRES P., and FAILLOUX A. B. Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. PLoS ONE. Volume 2(11), 2007. e1168.

WOLF J. Mikroskopická technika.2.vydání.Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954.656s.

WOOD D.M., DANG P.T., and ELLIS R.A. The insects and arachnids of Canada. Part 6: The mosquitoes of Canada. Diptera: Culicidae. Ottawa: Biosystematics Research Institute. Canadian Government Publishing Services, 1979. ISBN 0660104024.

Internetové zdroje:

http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm [online] [cit.2008-27-04] <http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm>

http://www.fbmi.cvut.cz/laboratories/ [online] [cit. 2008-27-04], Fakulta biomedicínského inženýrství v Praze <http://www.fbmi.cvut.cz/laboratories/>

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Histologie - histology

barvící metody - stain technology

Culex pipiens quiquefasciatus

samičí pohlavní orgány - female reproductive organs

9. PŘÍLOHY

Tab.1: Arboviry způsobující horečnaté průběhy s exantémy a artralgiemi (Collier, Oxford, 2006)

rod	virus	endemická oblast
Togaviridae	O nyong-nyong	Afrika (východní, západní)
	Chikungunya	Východní Afrika, Indie, jihovýchodní Asie
	Ross River	Austrálie, Oceánie
Flaviviridae	Dengue (4 typy)	všechny tropické zóny

Tab. 2: Arboviry způsobující neuroinfekce (Lobovská, 2001)

rod	virus	endemická oblast
Togaviridae	Východní, Západní a Venezuelské koňské encefalitidy	USA, Jižní Amerika
Flaviviridae	Japonské B a Murray Valley encefalitidy	Dálný Východ, Austrálie
	St. Lounské encefalitidy	Kanada, Argentina
Bunyaviridae	Kalifornské a La Crosse encefalitidy	USA

Tab. 3: Arboviry způsobující hemoragické horečky (Lobovská, 2001)

rod	virus	endemická oblast
Flaviviridae	Žluté zimnice	Afrika (trop.) a Jižní Amerika
	Dengue (4 typy) Chikungunya	Indie (trop.), jihovýchodní Asie
Bunyaviridae	Rift Valley	Afrika, Egypt

Tab. 4: Nejužívanější fixační tekutiny (Maňáková a Seichertová, 2002)

Pro světelnou mikroskopii	
Formaldehyd 4%	
Bouinova tekutina	k. pikrová + formol + k. octová + voda
Susa	chlorid rtuťnatý + chlorid sodný + k. octová + + k. trichloroctová + formol + voda
Zenkerova tekutina	chlorid rtuťnatý + dvojchroman draselný + síran sodný + + k. octová + voda
Carnoy	ethanol + chloroform + k. octová
Methacarn	methanol + chloroform + k. octová

Pro elektronovou mikroskopii	
Glutaraldehyd 1-4%	
Glutaraldehyd	+ postfixace oxidem osmičelým 1-2%
Glutaraldehyd + paraformaldehyd	
Glutaraldehyd + paraformaldehyd	+ postfixace oxidem osmičelým

Tab. 5: Zhotovení preparátu pro světelný mikroskop (Maňáková a Seichertová, 2002)

Parafinové řezy	Celoidinové řezy	Kryostatové řezy
Fixace	Fixace	Zmražení při -170°C
Vypírání	Vypírání	
Odvodnění řadou alkoholů	Odvodnění řadou alkoholů	
Prosycení rozpustidlem např. xylenem	Prosycení rozpustidlem např. alkohol-éterem	
Zalití do parafínu	Zalití do celloidinu	
Krájení	Krájení	Krájení v kryostatu
Nalepení řezů na podložní skla	Uchování řezů v 70% alkoholu	Nalepení řezů za sucha na podložní sklo
Odparafínování a zavodňování	Převedení řezů do 50% alkoholu	Někdy krátká fixace
Převedení do vody	Převedení do vody	
Barvení, histochemické a imunohistochemické reakce	Barvení	Zejména histochemické a Imunohistochemické reakce
Odvodnění a projasnění	Odvodnění a projasnění	Někdy odvodnění a projasnění
Montovací medium obvykle bezvodé	Montovací medium obvykle bezvodé	Montovací medium buď Bezvodé, nebo glycerin-želatina

Tab. 6: Výsledky barvících metod (Maňáková a Seichertová, 2002)

Barvení	**Barvivo**	**Jádro**	**Kolagen**	**Elastika**	**Svaly**	**Poznámka**
Hematoxylin-eosin	Hematoxylin-eosin	modré až černé	růžový		růžové	
Weigert – van Gieson	Weigertův hematoxylin Saturnová červeň Trinitrofenol	hnědé	červený		žluté	místo Saturnové červeni se používá také kyselý fuchsin, žluté – vše kromě kolagenu
AZAN	Azokarmín Anilinová modř Oranž G	červené	modrý		oranžově červené	červené - erytrocyty modrý – mucin
Modrý Masonův trichrom	Hematoxylin Kyselý fuchsin Anilinová modř	modré až černé	modrý		červené	červené – erytrocyty modrý - mucin
Žlutý Masonův trichrom	Hematoxylin Erytrosin Šafrán	modré až černé	žlutý		červené	červené – erytrocyty možno použít i kyselý fuchsin a Tuchecht gelb
Zelený Masonův trichrom	Hematoxylin Kyselý fuchsin Světlá zeleň	modré až černé	zelená		červené	červené - erytrocyty
Weigertův resorcin-fuchsin	Resorcin Fuchsin			fialová		
Impregnace Ag	$AgNO_3$		hnědý		šedočerné	retikulární vlákna – černá
Heidenhainův železitý Hematoxylin	Heidenhainův železitý hematoxylin	hnědé až černé			šedočerné	

Obr. 8: Mikroskop BX 51 firmy Olympus (pro prezentaci převzato z: **Fakulta biomedicínckého inženýrství v Praze**)