

## Preparační mikroskop (stereoskop, binokulár)

- objekt se pozoruje v odraženém světle
- lze dosáhnout zvětšení až 125x (u našich mikroskopů max 40x)
- použití v entomologii, parazitologii, botanice

## Postup preparace slinných žláz larvy pakomára

- 1) Larvy připravené k preparaci (fixované a barvené orceinem) umístíme na podložní sklíčko a přikápneme k nim 1-2 kapky orceinu, abychom zabránili příliš rychlému vyschnutí.
- 2) Nastavíme preparační mikroskop pro práci (úprava okulárů, zvětšení, úhel dopadajícího světla).
- 3) V zorném poli preparačního mikroskopu lokalizujeme hlavu larvy (hledáme oči, caudální část larvy má 2 kutikulární výběžky)
- 4) Jednou pinzetou uchopíme hlavu (bez mandibulárního výběžku) a druhou pinzetou uchopíme larvu v 1/3. Opatrně táhneme od sebe a snažíme se vytáhnout celou trávicí trubici. Oblast, kde jsou uloženy slinné žlázy je mezi 1 – 3 článkem.
- 5) Hledáme světlejší (až mléčně zbarvenou) oválnou strukturu, která je u pakomára přítomna ve dvou kopiích.
- 6) Slinnou žlázu oddělíme od okolní tkáně a vše ostatní z podložního sklíčka odstraníme.
- 7) Přikápneme kapku orceinu a zakryjeme krycím sklem.

## Meioza

Meióza (meiotické dělení, redukční dělení) je buněčné dělení, během kterého dochází k produkci buněk se zredukovaným počtem chromosomů ( $2n \rightarrow n$ ), což je základní proces umožňující pohlavní rozmnožování. Tyto buňky (gamety) mohou po určité době buďto splynout s další vhodnou gametou a vytvořit nového jedince složeného opět z dvojité sady chromosomů (viz spermie a vajíčko u savců), nebo mohou dělením vytvořit mnohobuněčný organismus (např. gametofyt u výtrusných rostlin). Meióza sestává ze dvou odlišně koncipovaných dělení buněk, takže jejím výsledkem jsou 4 buňky odlišné od rodiče (narozdíl od 2 s rodičem shodných buněk, které vznikají při mitóze).

### HETEROTYPICKÉ DĚLENÍ (1. ZRACÍ DĚLENÍ, 1. MEIOTICKÉ DĚLENÍ, REDUKČNÍ DĚLENÍ)

#### Profáze I

Profáze Meiózy I je oproti profázi Meiózy II mnohem komplikovanější a dělí se na 5 podfází.

##### Leptotene

Dochází ke spiralizaci vláken DNA a diferenciaci chromosomů.

##### Zygotene

Homologní chromosomy (tytéž chromosomy – 1 od otce, 1 od matky) se stěhují k sobě a za pomoci speciální bílkoviny se spojují v pár, tzv. *bivalent*.

##### Pachytene

Chromosomy dokončují spiralizaci a bivalenty jsou pozorovatelné jakožto tzv. tetrády - čtyřchromatidový komplex. Nesesterské chromatidy se přitom proplétají, dochází k tzv. *crossing-overu*.

##### Diplotene

Uvolňují se bílkovinné vazby mezi homologními chromosomy a dochází k jejich postupnému oddalování.

##### Diakineze

Dochází k přeuspořádání a rozchodu homologních chromosomů.

#### Metafáze I

Prolíná se s diakinezí, dochází k napojení vláken dělicího vřeténka na centromery chromosomů, vlákna z různých pólů se napojují na centromery jiných homologních chromosomů.

#### Anafáze I

K opačným pólům dělicího vřeténka se rozcházejí dvouchromatidové chromosomy z bivalentů.

## Telofáze I

U protilehlých pólů buňky se sekupují haploidní sady chromosomů. Následuje zaškrcení a rozdělení buňky.

## HOMEOTYPICKÉ DĚLENÍ (2. ZRACÍ DĚLENÍ, 2. MEIOTICKÉ DĚLENÍ, EKVAČNÍ DĚLENÍ)

Homeotypické dělení je v podstatě shodné s mitózou, jen k němu dochází za zredukované sady chromosomů (v buňce je 1 chromosom z dané sady – buď otcovský nebo mateřský). Dělí se na profázi II, metafázi II, anafázi II a telofázi II, konkrétní průběh je stejný jako u mitózy.

## Vývoj samičích gamet

Vaječný folikul se skládá z jedné vaječné buňky (oocyt) a folikulového epitelu. Příležitostně může folikul chovat dvě, u polytokních zvířat (majících více mláďat) i více oocytů. Oocyty mají velké euchromatinové jádro se zřetelným jadérkem. Folikulový epitel chrání oocyty a zprostředkuje příjem látek pro oocyty i výdej zplodin látkové výměny.

Vývoj folikulu se označuje jako folikulogeneze, vývoj oocytu jako oogeneze. Oba pochody spolu velmi úzce souvisejí a jsou řízeny FSH hormonem hypofýzy (folikuloliberinem).

### FOLIKULOGENEZE

Začíná **primordiálními folikuly**. Ty leží v povrchové vrstvě kůry vaječníku. Malý oocyt je obklopen jednovrstevným kubickým až plochým folikulovým epitelem. Jsou nejpočetnější, představují klidové stadium, nedotčené gonadotropiny a mohou takto přetrvávat po léta. Malý počet těchto folikulů se kontinuálně, ale v neznámém čase vyvíjí na:

#### **Primární folikuly.**

Podle čeho je prováděn výběr k dalšímu vývoji, není známo. Primární folikuly jsou charakterizovány jednovrstevným kubickým epitelem a mají průměr 30 – 100 μm. Jakmile se epitel mitozami změní ve dvojrstevný, utváří se:

#### **Sekundární folikuly.**

Epitelové buňky se dále dělí, a tvoří až deset vrstev, jsou drobné a polyedrické, celá vrstva se pak označuje jako stratum granulosum nebo granulóza. Mezi ní a povrchem oocytu postupně vzniká, převážně sekrecí granulóznicích buněk obal oocytu z amorfni hmoty, nazývaný *zona pellucida*. Tvoří jej převážně glykoproteinové substance.

Během vývoje folikulu od primárního k sekundárnímu, dochází samozřejmě k jeho zvětšení (průměr od 50 do 200 μm) a folikul se zanořuje hlouběji do kůry ovaria.

#### **Terciární folikuly**

Vyznačují se centrální dutinou, která je vyplněna tekutinou (*liquor folliculi*), obsahující řadu rozpuštěných látek (kyselinu hyaluronovou, steroidní hormony - estrogeny, progesteron, androgeny a proteolytické enzymy). Vaječná buňka leží na pahorku buněk granulózy, který vyčnívá do dutiny folikulu. Zralé terciární folikuly jsou označovány jako Graafovy folikuly a začínají se vyvíjet v období před pubertou. Tyto folikuly přijímají do dutiny během hodin až dnů velké množství tekutiny, takže zvětšují svůj objem, buňky granulózy se oplošťují, velké folikuly se vyklenují nad povrch vaječníku, jejich stěna je průsvitná a připravena k prasknutí, tj. k ovulaci.

### OOGENEZE

Pod tímto pojmem rozumíme rozmnožování a dozrávání vaječné buňky od prvopohlavní buňky – gonocyty k vejci, schopnému oplození; tento vývoj je samozřejmě úzce spjat s folikulogenezí.

**Rozmnožovací fáze** oogonií (u člověka až na 450 tisíc) končí kolem narození.

**Růstová fáze** následuje po narození do dospívání.

Oogonie se mění v **primární oocyty**, které nejprve rychle zvětšují svůj objem. Pak začíná první zrací dělení, které se zastaví v diktyotenním stadiu profáze. Vaječné buňky zůstávají v tomto stadiu až do stadia terciárního folikulu, tzn. že tento stav může trvat léta (u člověka až 40 let).

**Zrací fáze** začíná teprve před první ovulací

Dokončuje se první zrací dělení. Z nově vzniklých buněk jen jedna dostane veškerý žlutkový materiál a stane se z ní **sekundární oocyt**, druhá – bez žlutku se stává prvním pólovým tělískem, které je uloženo do perivitellinního prostoru. U člověka ovuluje sekundární oocyt a současně začíná druhé zrací dělení, které se zastaví v profázi druhého zracího dělení a až po vniknutí spermie je dělení dokončeno. Vznikne přitom haploidní oocyt se žlutkem a druhé pólové tělísko. První pólové tělísko se také většinou dělí, takže v perivitellinním prostoru jsou pak tři pólová tělíška.

### Vývoj samčích gamet

Zárodečné buňky jsou v několika vrstvách. Vzdálenější od lumen semenotvorných kanálků jsou diploidní spermatogonie. V další vrstvě blíže luminu jsou velké kulaté spermatocyty I. řádu s chromosomy v profázi prvního zracího dělení. V luminální třetině zárodečného epitelu jsou zřídka pozorovány spermatocyty II. řádu a to pro krátkou dobu své existence. Zato spermaticy představují nejhojnější skupinu buněk, vyskytují se současně v obou formách – s kulatým jádrem i s kondenzovaným podlouhlým. Celý děj od dělení kmenových spermatogonií v zárodečném epitelu po uvolnění z nich vzniklých spermatozoí (spermie) je označován jako spermatogeneze a trvá u člověka 74 dní, u hřebce, býka a berana cca 50 dní a u kance 34 dní.

Spermatogenezi můžeme rozdělit na tři části:

#### a) spermatocytogenezi

Rozmnožovací fáze spermatogonií, které mají diploidní počet chromosomů a dvojnásobné množství DNA v chromatinu. Probíhá opakovanými mitózami, 20 – 60 % spermatogonií opět zaniká, výsledkem jsou spermatocyty I. řádu. Potomstvo jedné spermatogonie je spojeno plazmatickými můstky.

#### b) meiózu

Fáze, v níž vznikají ve dvou zracích děleních z jednoho, podle obsahu DNA tetraploidního, spermatocyty I. řádu čtyři haploidní spermaticy.

Profáze prvního zracího dělení je zvláště dlouhá a podle stavu chromosomů ji můžeme rozdělit na stadia leptotenní, zygotenní, pachytenní, diplotenní a diakinezi. Výsledkem jsou spermatocyty II. řádu, které jsou podle počtu chromosomů haploidní, avšak mají dvojnásobný obsah DNA (2 sesterské chromatidy jednoho z rodičovských chromosomů).

Druhé zrací dělení může tedy následovat bez S – fáze, po velmi krátké době. Výsledkem jsou čtyři haploidní spermaticy.

#### c) spermiogenezi

Diferenční fáze, v níž se klony kulatých spermaticy vyvíjejí ve spermie. Nejnápadnější změny jsou: tvorba akrosomu, kondenzace a změna tvaru jádra, vytvoření bičíku a ztráta přebytečné cytoplazmy.

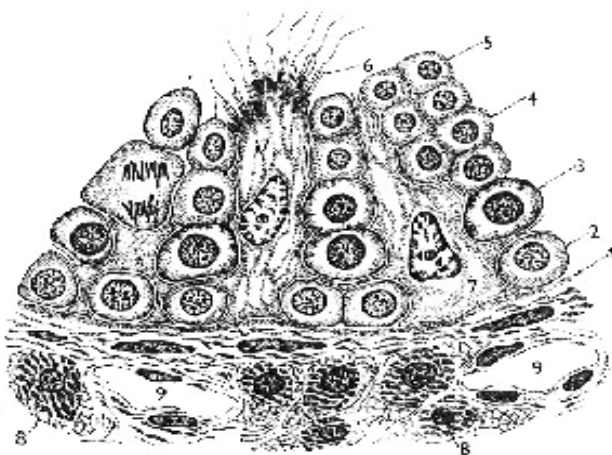


SCHÉMA STRUKTURY SEMENOTVORNÉHO STOČENÉHO KANÁLKU varlete a přilehlé vymezené vazivové tkáně:

- 1 – lamina basalis, 2 – spermatogonie,
- 3 – primární spermatocyty, 4 – sekundární spermatocyty, 5 – spermaticy,
- 6 – spermie, 7 – Sertoliho buňky,
- 8 – Leydigovy buňky,
- 9 – krevní kapiláry