

PREPARACE BUNĚK SLINNÝCH ŽLAZ – LARVA PAKOMÁRA

- ✓ **Larva pakomára:**
 - **Fixace:** Du Noyerova fixáž (96% alkohol a kyselina octová ledová, 3:1)
 - **Barvení:** ORCEIN – larvy v orceinu cca 20-40 min, potom do PBS
- ✓ Na očištěné podložní sklíčko pinzetou přeneseme larvu, přikápneme PBS. Larva nesmí vyschnout!
- ✓ Pracujeme pod preparačním mikroskopem.
- ✓ Odstraníme larvě hlavu.
- ✓ Vytlačíme obsah 2-3 tělních článků.
- ✓ Slinné žlázy – viz obrázek.
- ✓ Odstraníme zbytek těla z podložního skla.
- ✓ Slinné žlázy přiklopíme krycím sklíčkem a pozorujeme polyedrické buňky s polytenními chromozómy v jádře.
- ✓ Zakreslíme.

Běžný světelný mikroskop:

Pozorování objektů v procházejícím světle, světlo vstupuje rovnoběžně s optickou osou mikroskopu, kolmo na preparát.

- malá pracovní vzdálenost
- převrácený obraz
- objekty musí být tenké
- obraz plochý

Preparační mikroskop:

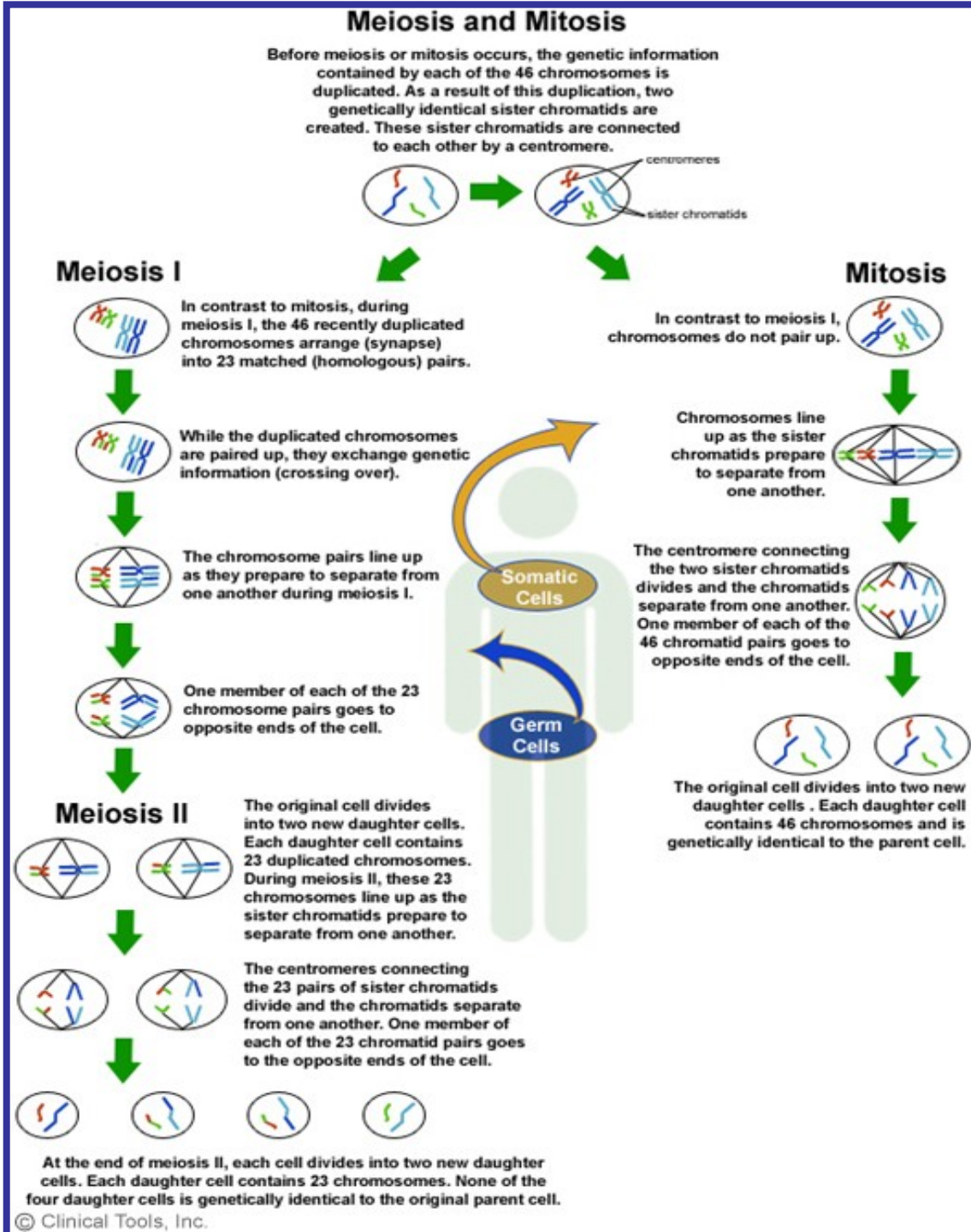
Pozorování objektů v dopadajícím světle, pozorování i velkých objektů, značná hloubka ostrosti – plastický a nepřevrácený obraz povrchu preparátu.

- 2 složené mikroskopy (2 okuláry a 2 objektivy), optické osy svírají ostrý úhel, 2 obrazy různých stran objektu – oko vnímá 1 stereoobraz
- Pod okuláry skleněné hranoly (Porrova prismata) – obracejí převrácený obraz vytvořený objektivy – v oku obraz obraz nepřevrácený
- Světelný zdroj – světlo dopadá pod různými úhly shora (lze osvětlit i zdola). Objekt pozorován v odraženém světle – zobrazení povrchu (reliéf)
- Objektivy s malým zvětšením – velká pracovní vzdálenost
- Světlý nebo tmavý kotouč – světlé nebo tmavé pole

MEIÓZA

- 2 buněčná dělení a pouze 1 replikace DNA
- I. redukční dělení (heterotypické)
Profáze: leptotene
zygotene
pachytene
diplotene
diakineze
- II. redukční dělení (homotypické)
mitóza haploidních buněk

FILM



ZÁRODEČNÝ EPITEL V SEMENOTVORNÝCH KANÁLCÍCH VARLETE

VARLE (TESTIS)

Funkce: produkce spermií, produkce hormonů

Mikroskopická stavba:

Tunica albuginea testis – tuhá pouzdro z kolagenního vaziva

Tunica vaginalis – naléhá na t. a. t. ze zevní strany, serózní obal

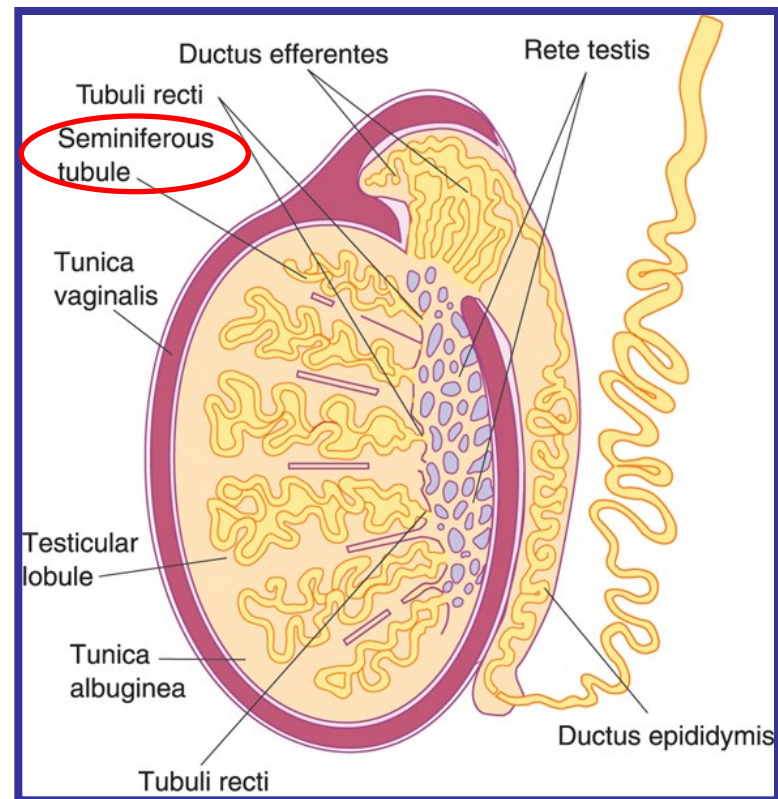
Tunica vasculosa – tenká vrstvička, řídké kolagenní vazivo, krevní cévy

Mediastrum testis – na zadním obvodu, zesiluje t. a. t.

Septula testis – tenké vazivové přepážky, vybíhají z t. a. do varlete, rozdělení varlete na 200 -300 lalůčků = *lobuli testis*

V lalůčcích stočené semenotvorné kanálky – *tubuli seminiferi contorti*, v každém lalůčku 1 – 4 kanálky – vystlány **ZÁRODEČNÝM EPITELEM**

Intersticium varlete – řídké kolagenní vazivo – fibrocyty, migrující buněčné elementy..., endokrinní intersticiální *Leydigovy buňky* – produkce testosteronu



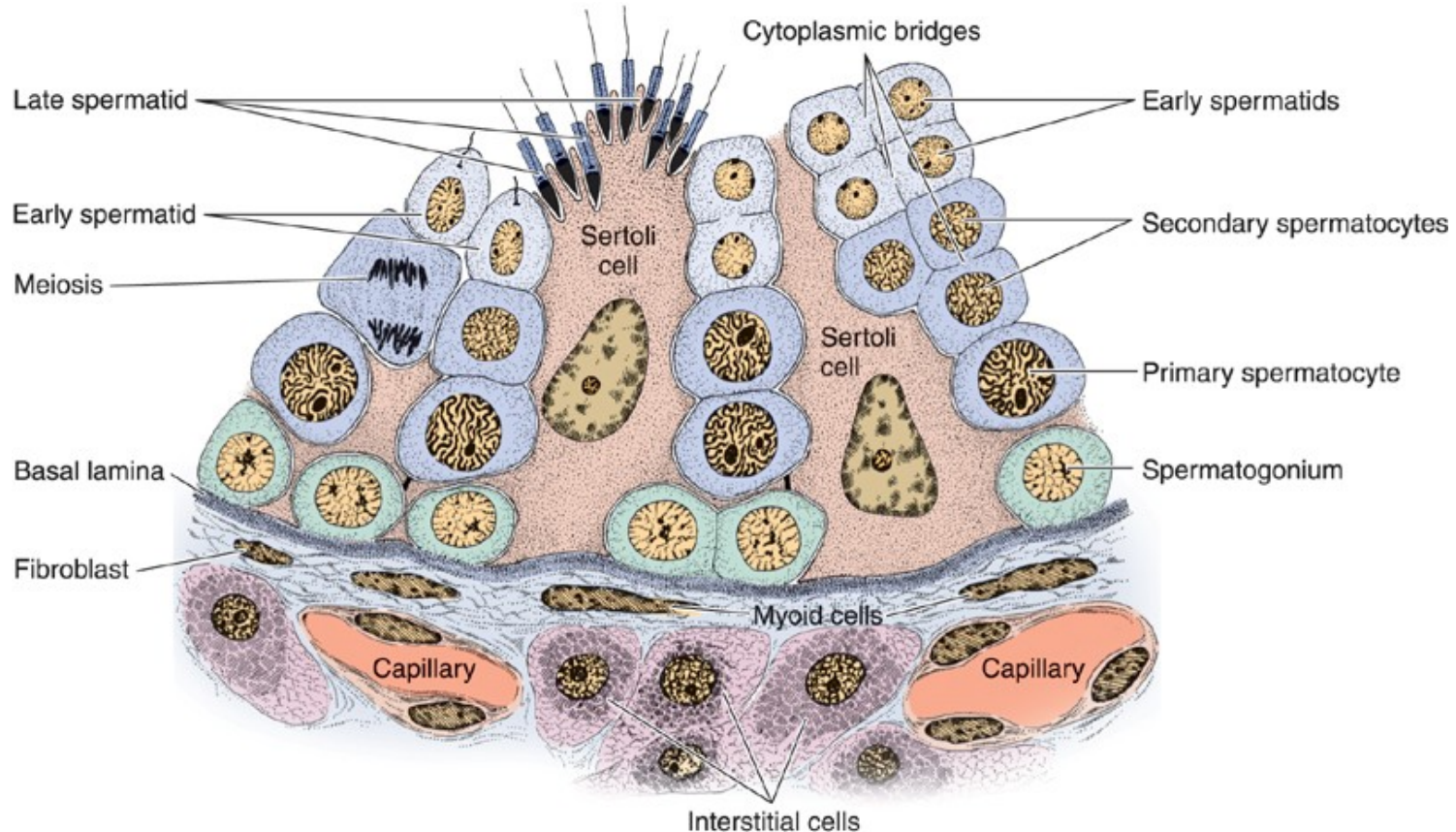
SEMENOTVORNÉ KANÁLKY

Šířka – 0,2 mm, délka 50 – 80 cm, mnohonásobně stočené

Stavba: - **zevní vazivová pochva** (kolagenní a elastické fibrily, fibroblasty)

- **bazální membrána**

- **zárodečný epitel** – vícevrstevný, **spermatogenní buňky**, podpůrné buňky = **Sertoliho buňky** (velké buněčné elementy, nasedají na BM, zasahují až k povrchu epitelu, velké nepravidelné jádro, v apikální části cytoplasma obklopuje hlavně spermatidy – dozrávání, přeměna na spermie)

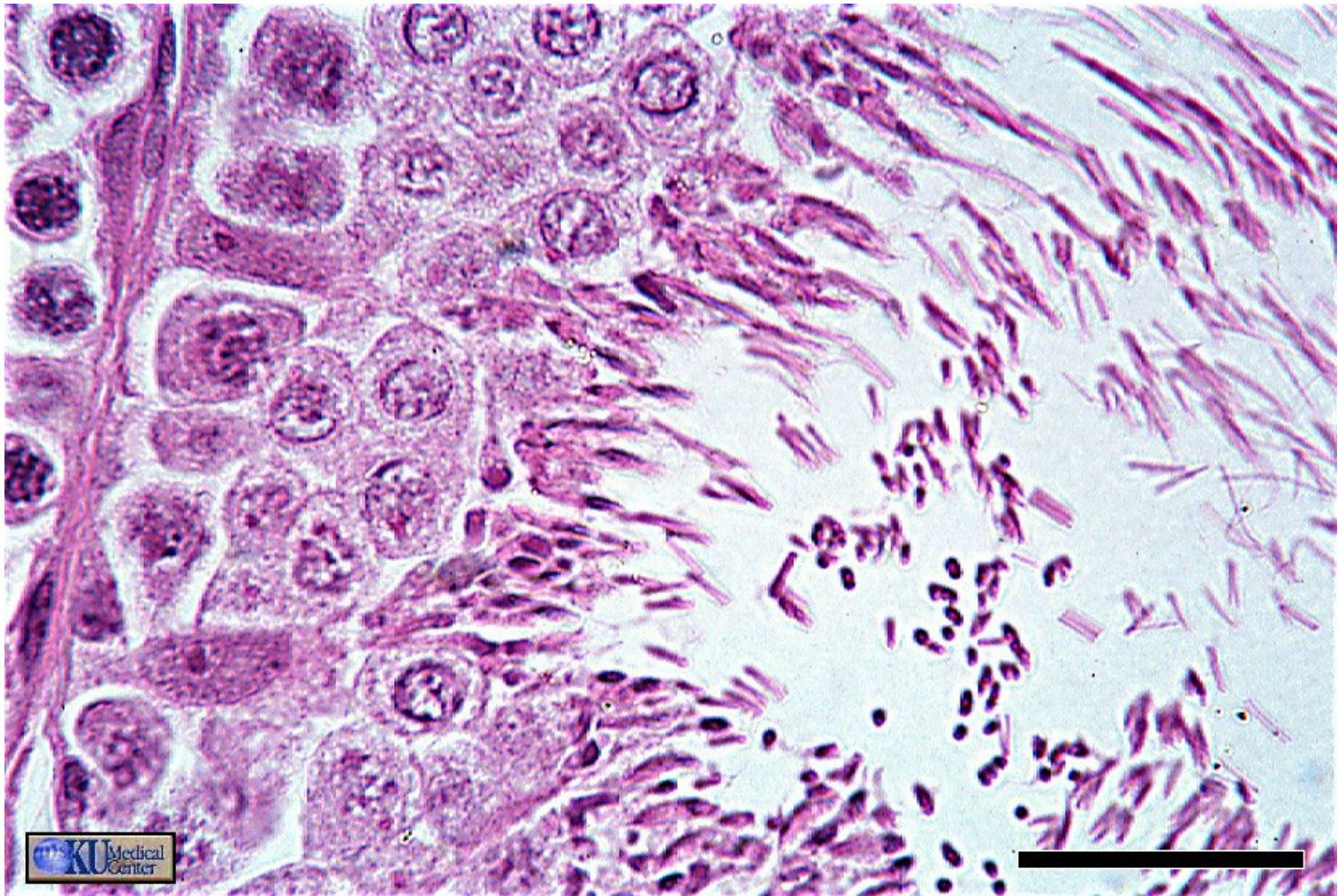


Seminiferous Tubules (rat)



Seminiferous Tubule (rat)





Seminiferous Tubule (rat)

Two Sertoli cells (elongated cells with oval nuclei and prominent nucleoli) are attached to the basement membrane and stretch into the lumen of the tubule. A pachytene spermatocyte (blue) lies lower in the seminiferous epithelium than the round spermatids (red). Elongating spermatids at the apex are about to be released into the lumen as some already have.

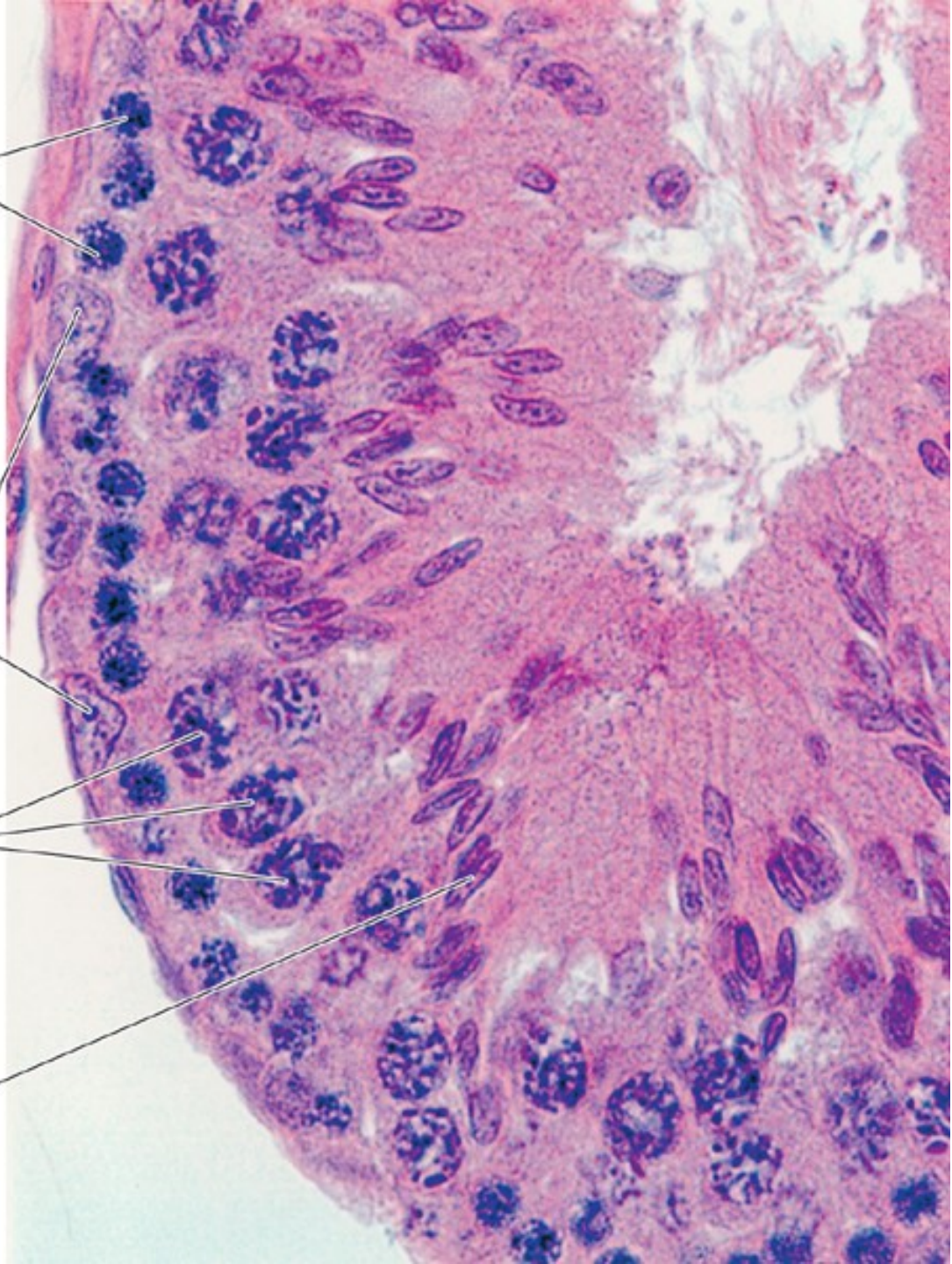
Bar=30 microns

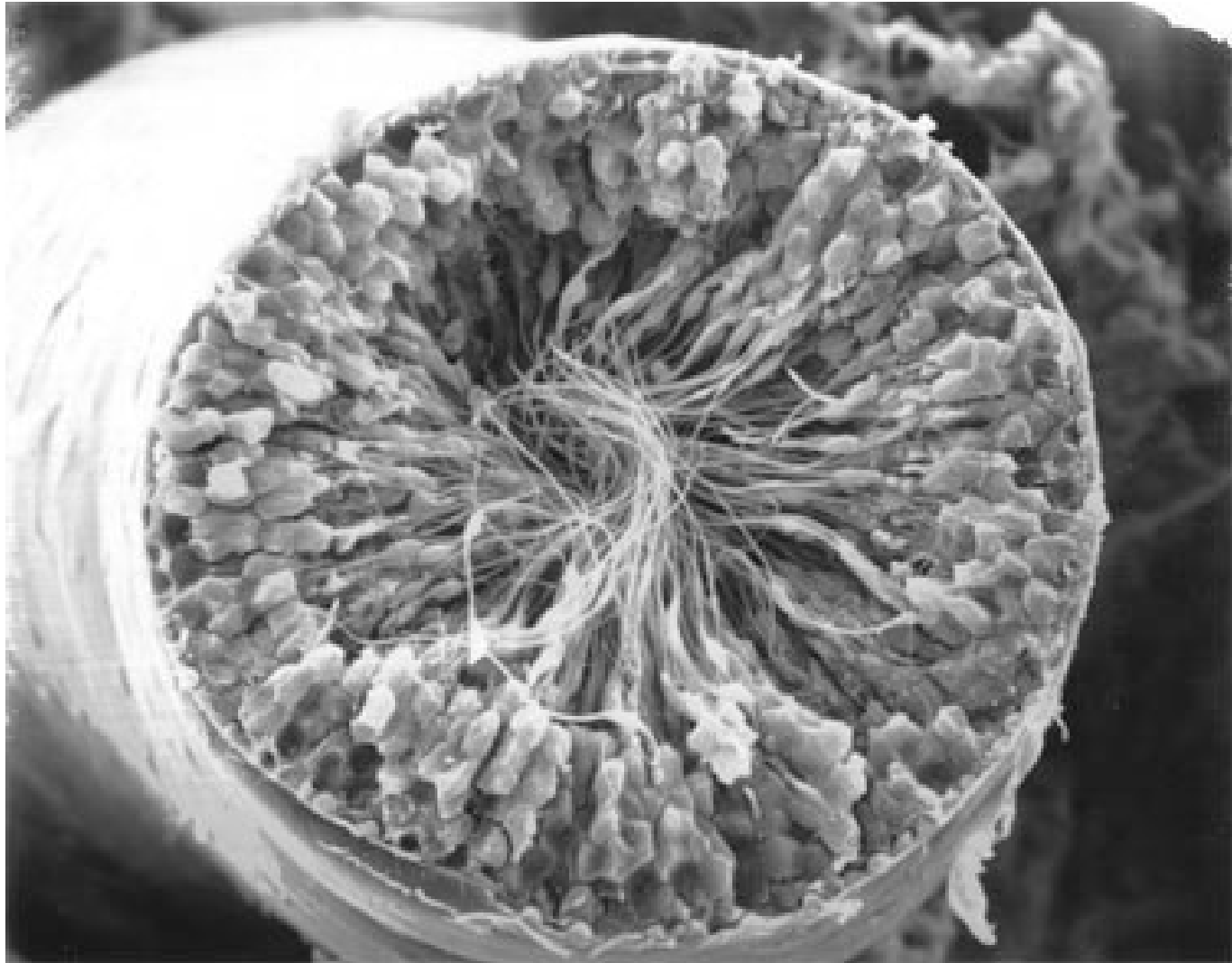
Spermatogonia

Sertoli cells

Spermatocytes

Spermatids





Embryonální období: nediferencované kmenové buňky = gonocyty se diferencují na semenotvorné buňky = spermatogenní, intenzivní proliferace

Po pubertě: začíná plynulá spermatogeneze, během BC se postupně diferencují 3 typy spermatogonií.

- **Spermatogonie A – tmavá**, dočasně neproliferující, rezervní funkce
- Spermatogonie A – světlá, pokračuje v proliferaci, opakovaně BC, udržuje se konstantní populace těchto buněk v zárodečném epitelu
- **Spermatogonie B** – zahajuje diferenciaci, vyčlení se z BC a zahajuje **SPERMATOGENEZI**.

Spermatogonie:

- malé, okrouhlé buňky, uložené u BM
- jediný typ buněk, který se vyskytuje i před pubertou
- okrouhlé jádro se skvrnitě uspořádaným heterochromatinem
- před dělením diploidní ($2n$) počet chromozómů - 46, $2N$ – diploidní množství DNA

SPERMATOGENEZE

Vývoj od nediferencované spermatogonie po zralou spermii (cca 64 dní),
závislost na testosteronu

A. SPERMATOCYTOGENEZE

Rozmnožování buněk mitoticky a meioticky

1. Perioda rozmnožování

Ve stádiu spermatogonie, intenzivní mitotické dělení, přes 2 typy spermatogonií A, spermatogonie B – zahajují vlastní proces spermatogeneze

2. Perioda růstu

Spermatogonie B – dlouhá S-fáze BC, diferenciaci na:

Primární spermatocyt:

- největší buňky zárodečného epitelu, blíž lumen
- diploidní sada chromozómů 46, množství DNA 4N
- velké okrouhlé jádro s tmavými proužky heterochromatinu (smotaná nit)
- pozorujeme je v profázi 1. meiózy (až 22 dní)

3. První zrací dělení (meiotické)

Profáze I:

Leptotene – diferenciacce chromozómů

Zygotene – chromozómy tvoří homologní páry, bivalenty

Pachytene – chromozómy se zkracují a ztlušťují, tetrády (4chromatidové útvary), vznik chiazmat, „crossing-over“

Diplotene – oddalování chromozómů

Diakineze – rozchod homologních chromozómů, terminalizace chiazmat

Metafáze I: chromozomové páry se připojují na vlákna vřeténka

Anafáze I: ch. páry putují k pólům, chromatidy v každém chromozómu zůstávají spojené

Telofáze I: haploidní sady ch. se oddělují a buňka se rozdělí na 2 sekundární spermatocyty (22 + X, 22 + Y)

Sekundární spermatocyt:

- Produkt 1. meiotického dělení
- Leží ještě blíže k luminu, na řezech vzácně, po vzniku hned zahajuje 2. meiotické dělení
- Asi poloviční než primární spermatocyt
- Haploidní 23, DNA 2N

4. Druhé zrací dělení

Navazuje bezprostředně na předchozí, probíhá podobně jako mitóza

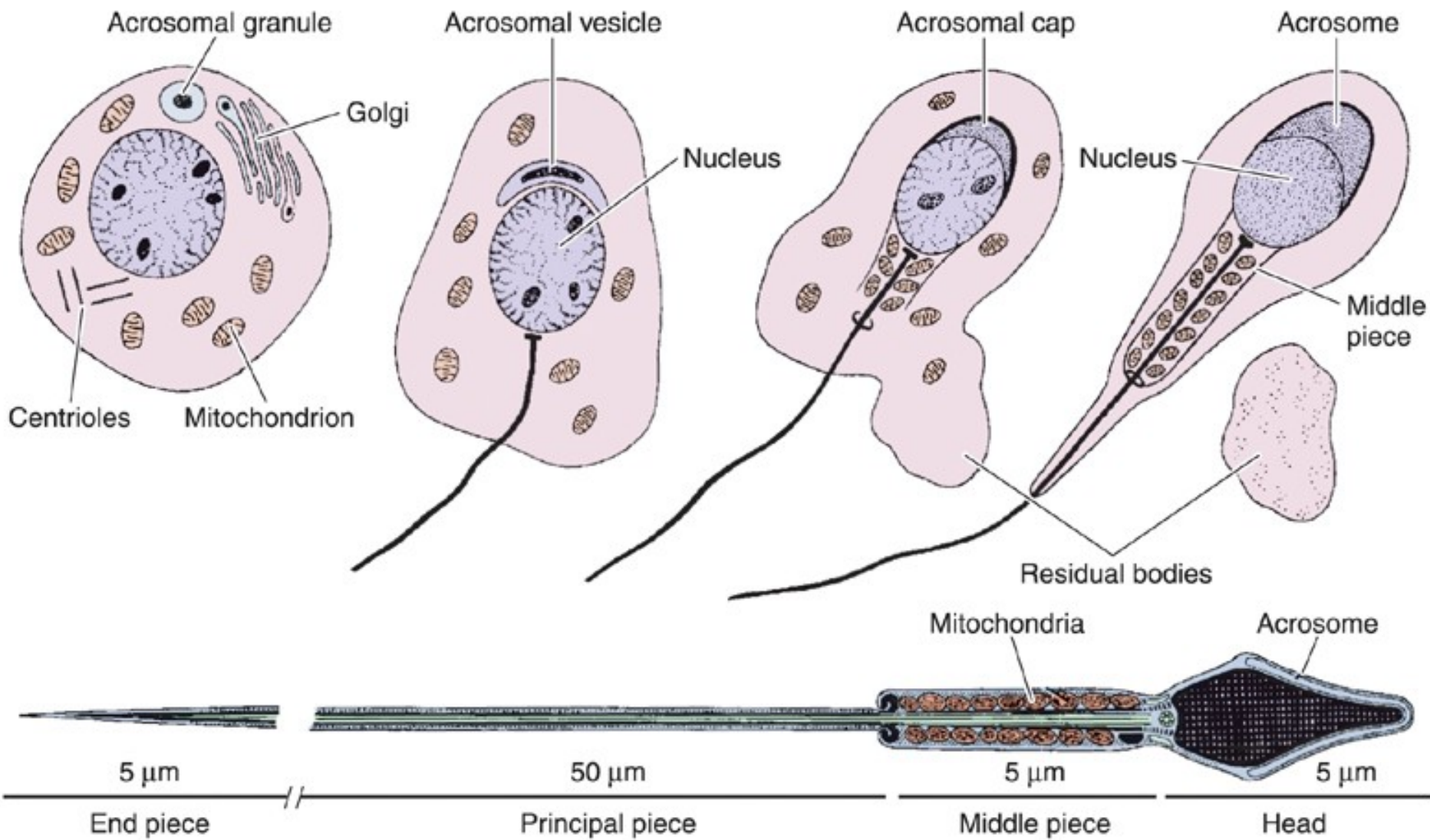
Výsledek: **4 spermatidy**

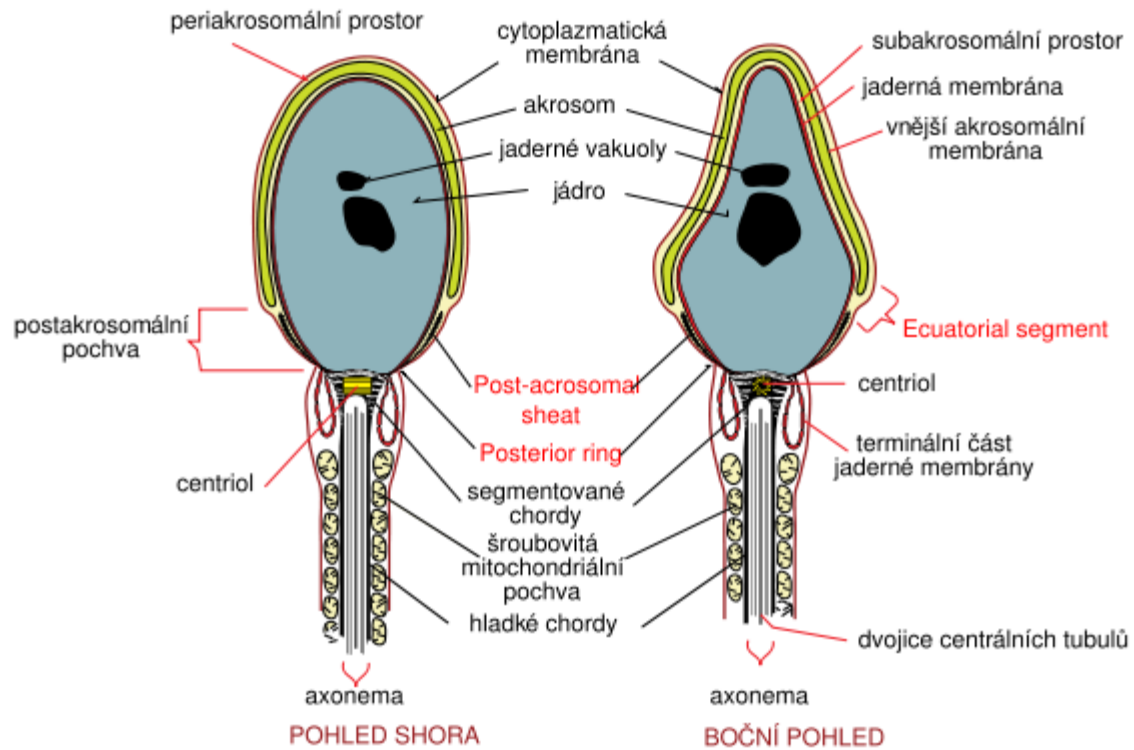
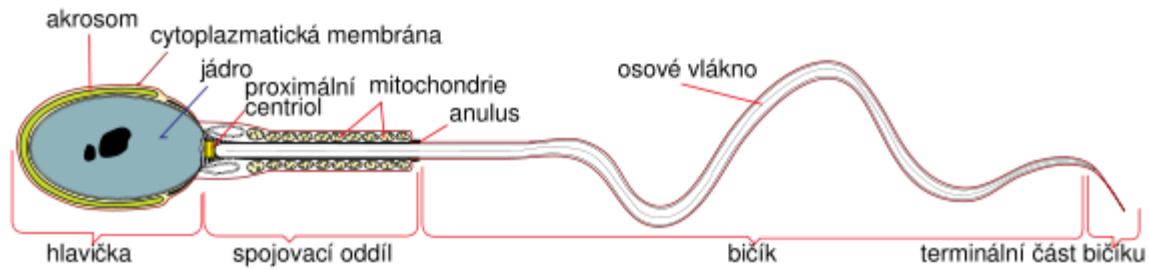
- haploidní počet chromozómů (22+X, 22+Y, 22+X, 22+Y)
- DNA – N
- uloženy kolem luminu
- malé buňky, tmavá jádra, hodně heterochromatinu

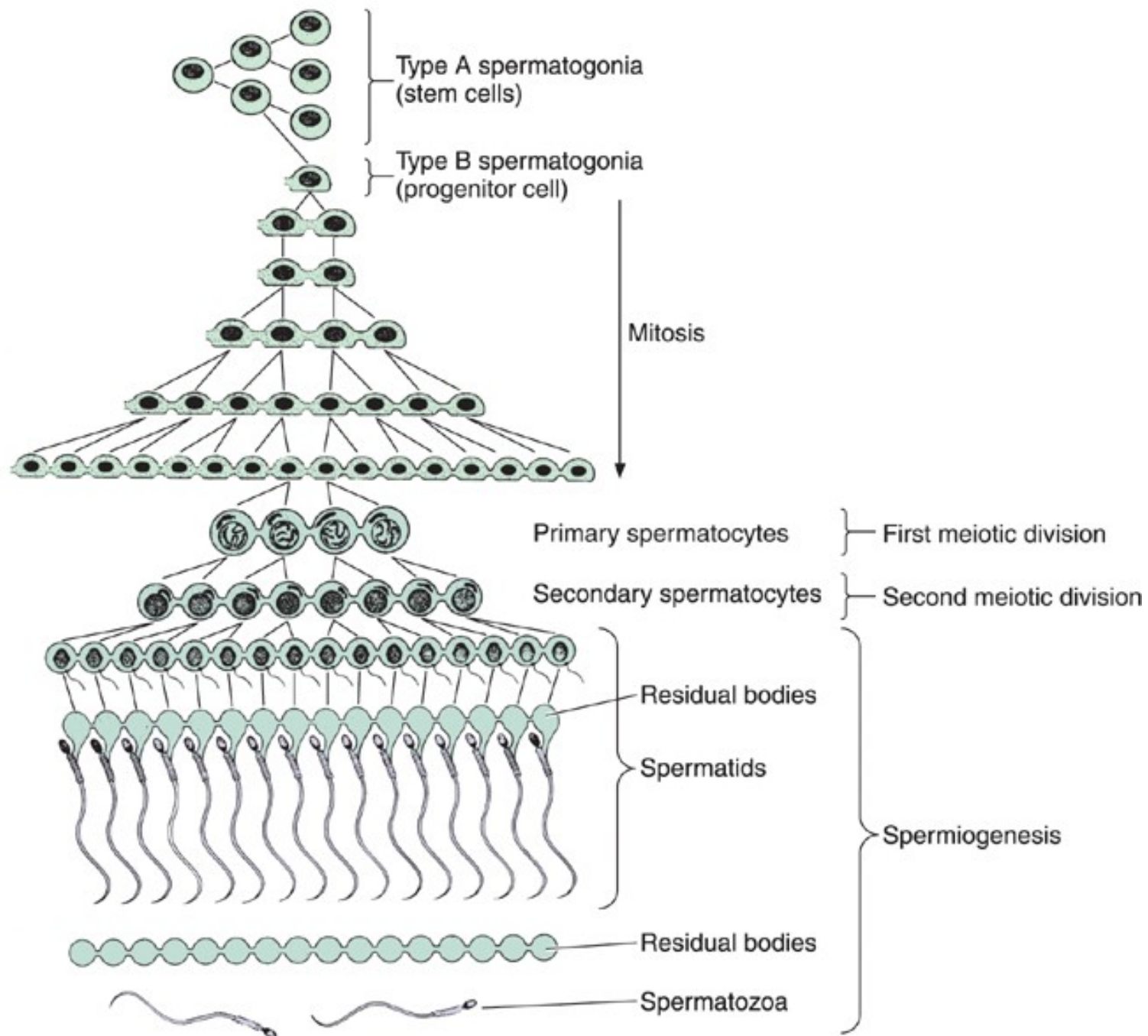
*Pozn. během procesu diferenciacce zárodečných buněk od spermatogonií až po spermatidy – tyto buněčné elementy spojeny **plazmatickými můstky**, samostatné až spermie*

B. SPERMATOHISTOGENEZE (SPERMIOGENEZE)

- Buňky se již nedělí
- Spermatidy se diferencují na **zralé spermie**
- Probíhá **v apikální části cytoplazmy Sertoliho buněk** (obklopuje tyto buněčné elementy, dodává výživu)
- Jader. chromatin silně kondenzuje, jádro se mění na **hlavičku** spermie
- Z Golgiho komplexu vzniká plochý váček – **akrosom** (přikládá se na apikální část jádra)
- **Centrioly** se stěhují do krčku, proximální centriol – k bázi hlavičky, distální tvoří bazální tělísko **axonemy** – osového vlákna
- Zralá spermie: hlavička, střední oddíl (krček, spojovací oddíl), bičík (hlavní část, terminální část)







OOGENEZE

VAJEČNÍK (ovarium)

„Zárodečný epitel“ – na povrchu vaječníku, jednovrstevný, plochý až kubický

Tunica albuginea – nepřesně ohraničená vrstva hustého kolagenního vaziva

Kůra vaječníku – řídké kolagenní vazivo, uloženy v něm ovariální folikuly a jejich deriváty v různém stádiu oogeneze

Dřeň vaječníku – husté kolagenní vazivo

Perioda rozmnožování:

Z primordiálních zárodečných buněk – *oogonie*; množení mitotickým dělením

Perioda růstu:

Vznik *primárních oocytů*, + folikulární buňky = primordiální folikuly

Primární oocyty – vstup do prvního zracího meiotického dělení

Po pubertě:

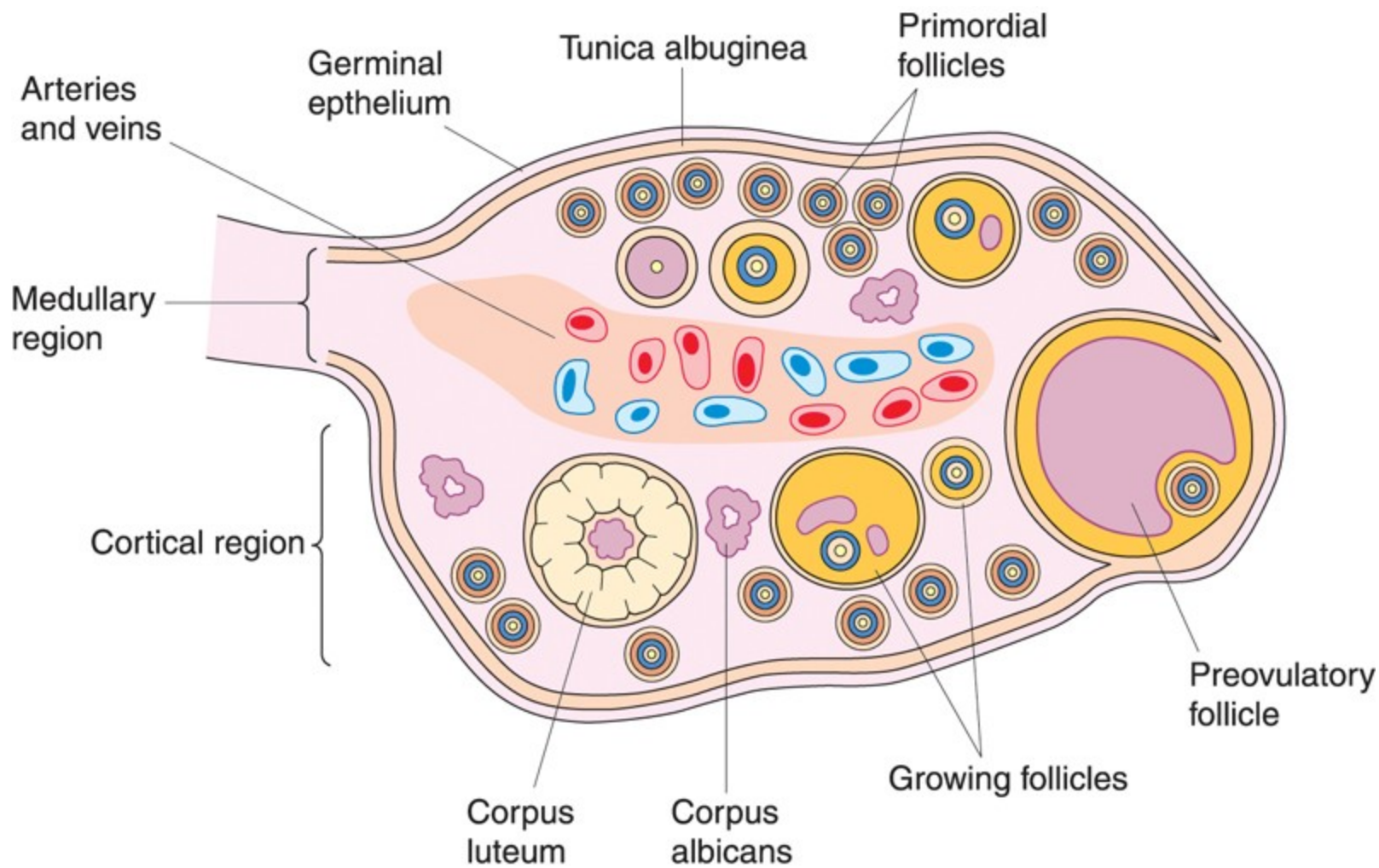
pokračování prvního zracího dělení, změna stavby folikulů

Ovulace:

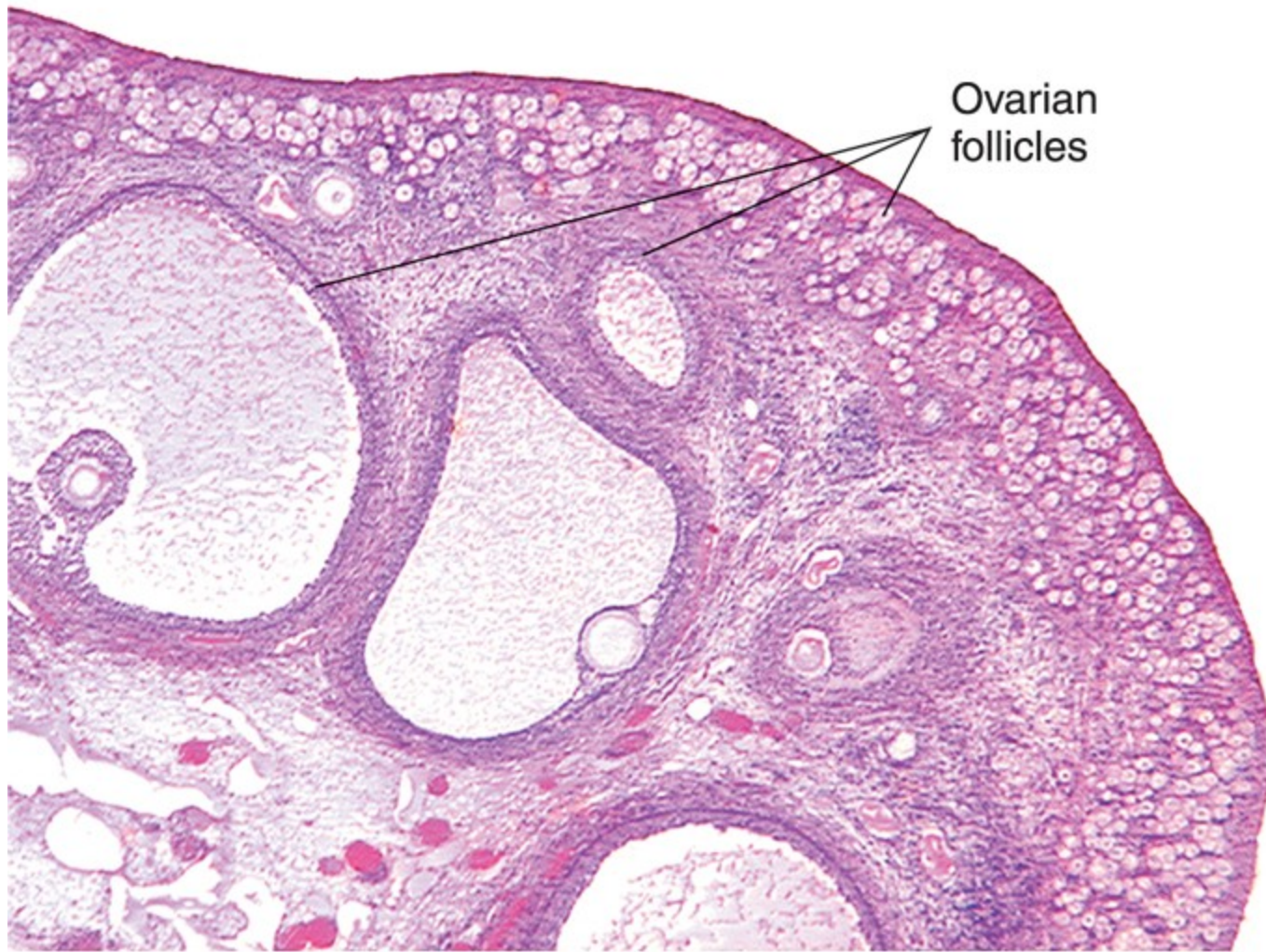
dokončení prvního zracího dělení, vznik jednoho *sekundárního oocytu*, druhá buňka – *pólocyt I. řádu* – malý, nefunkční

Druhé zrací dělení – zahájeno hned po ovulaci, dokončeno, dojde-li k oplození

Zralý oocyt + pólocyt II. řádu (může se ještě rozdělit)



Ovarium ženy v reprodukčním věku



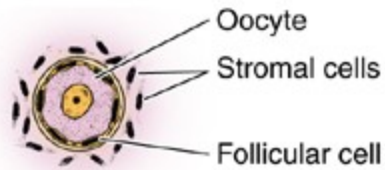
Ovarian
follicles

Medullary
region

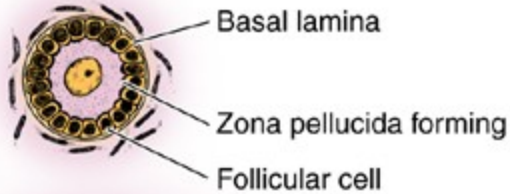
Cortical
region

Část ovaria, barveno H&E

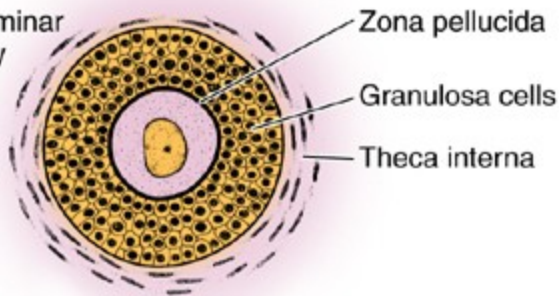
Primordial follicle



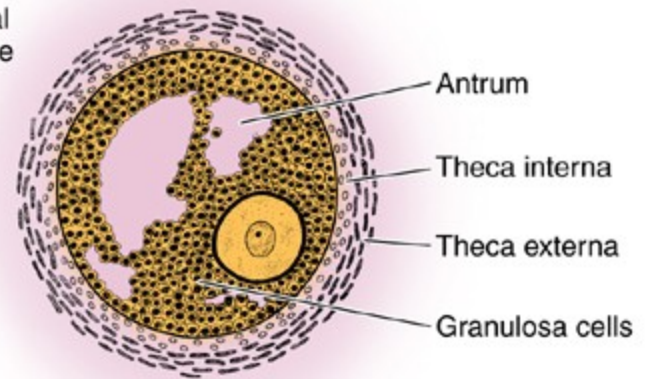
Unilaminar primary follicle



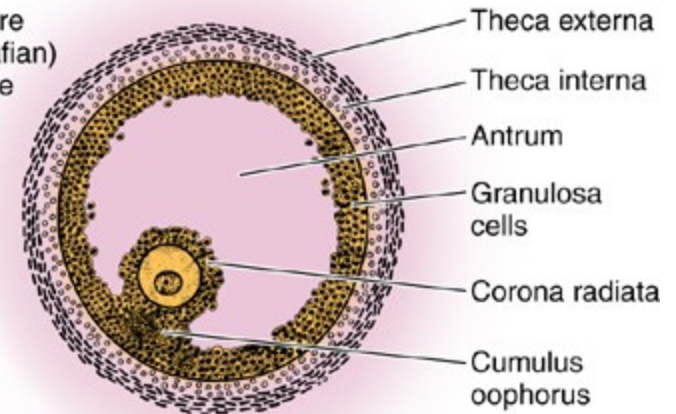
Multilaminar primary follicle



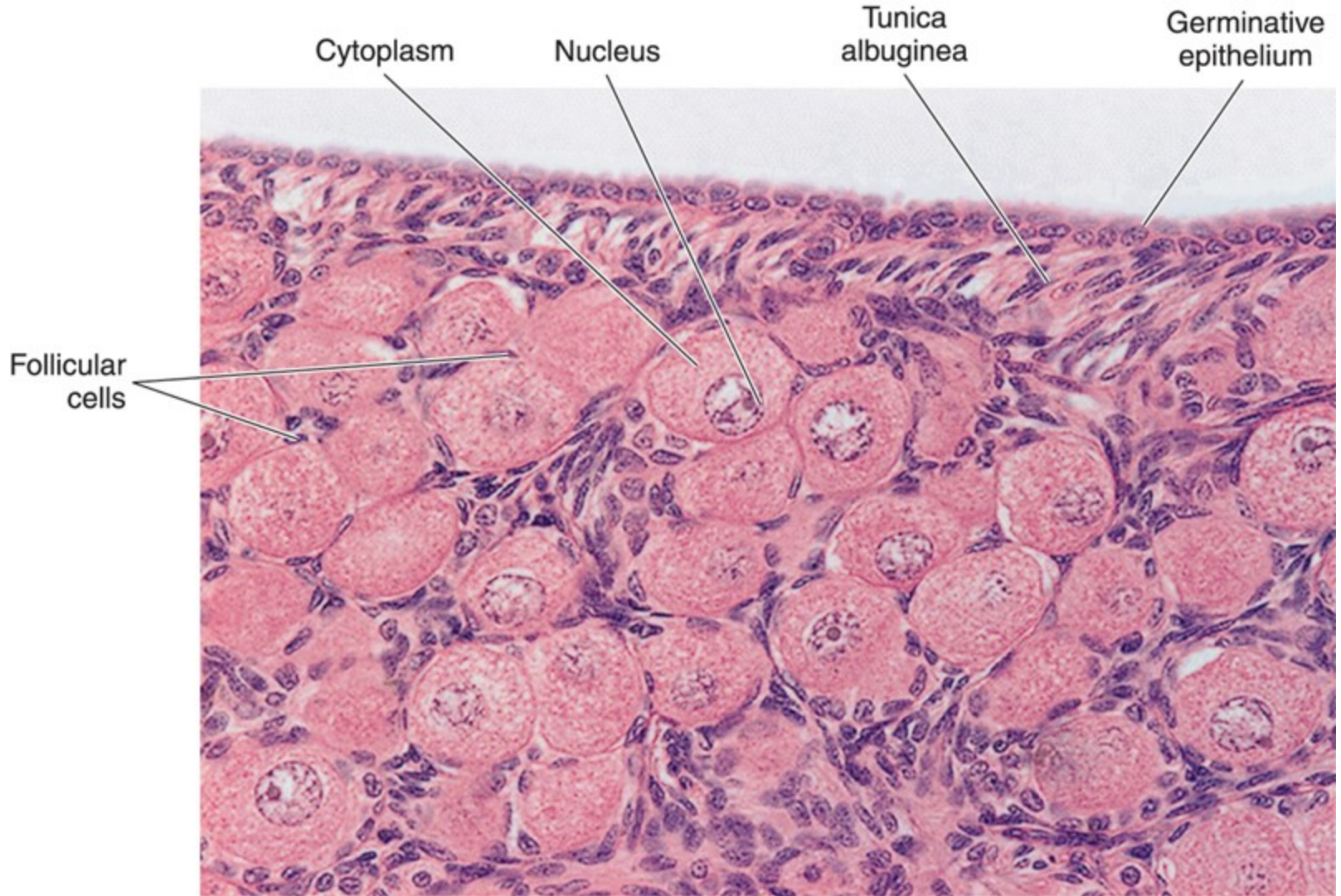
Antral follicle



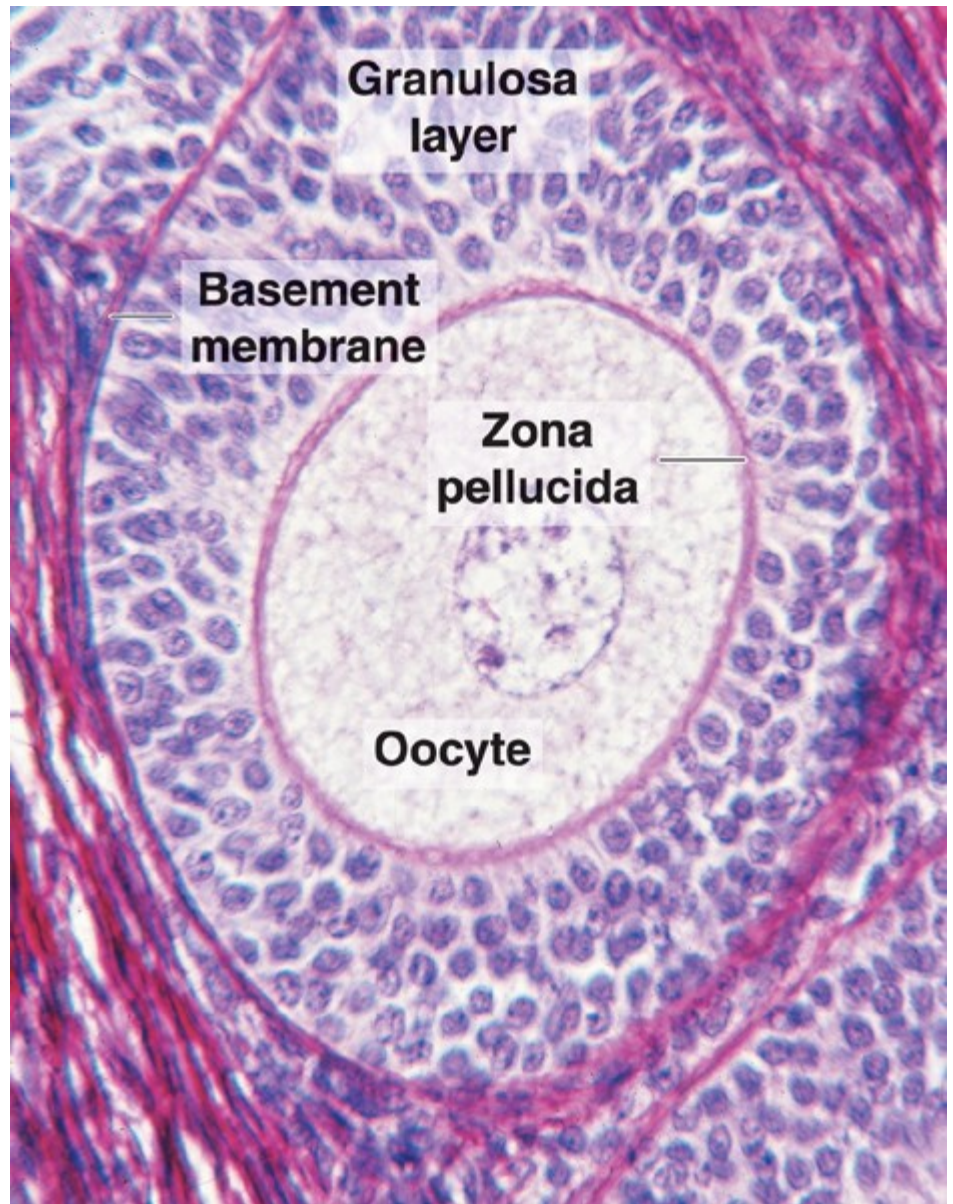
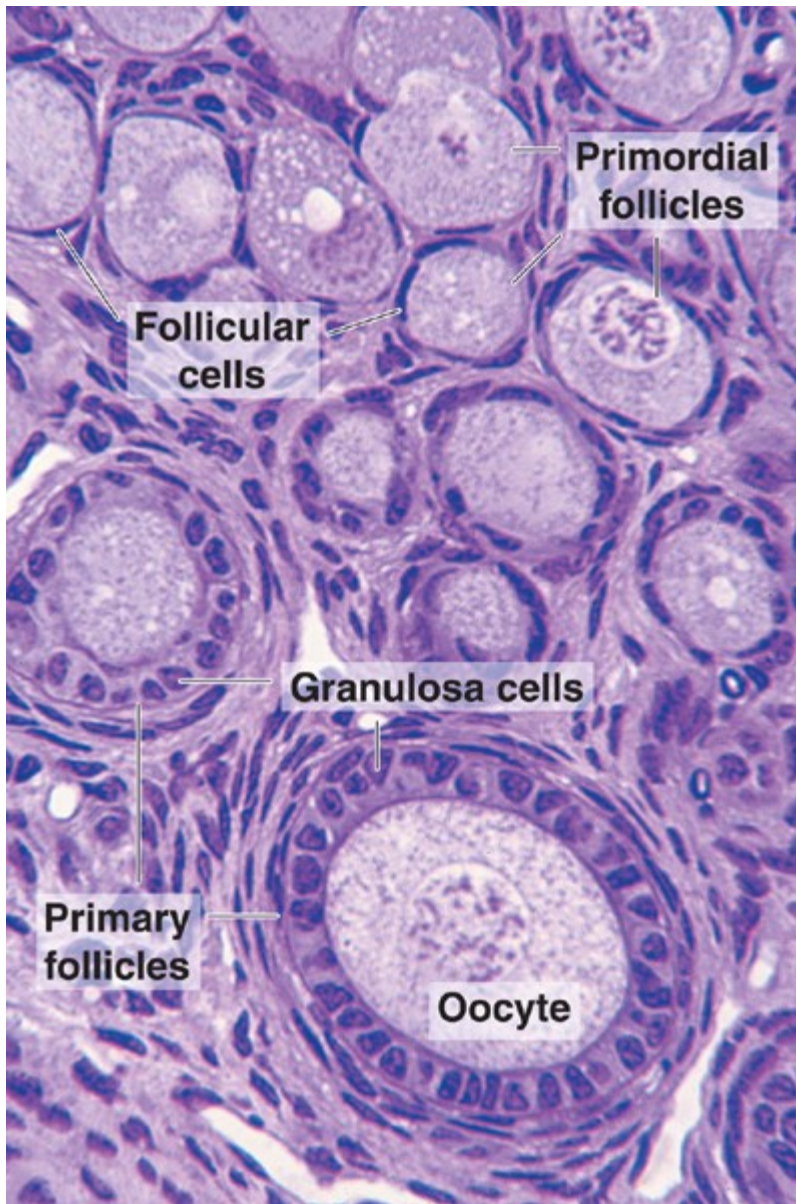
Mature (graafian) follicle



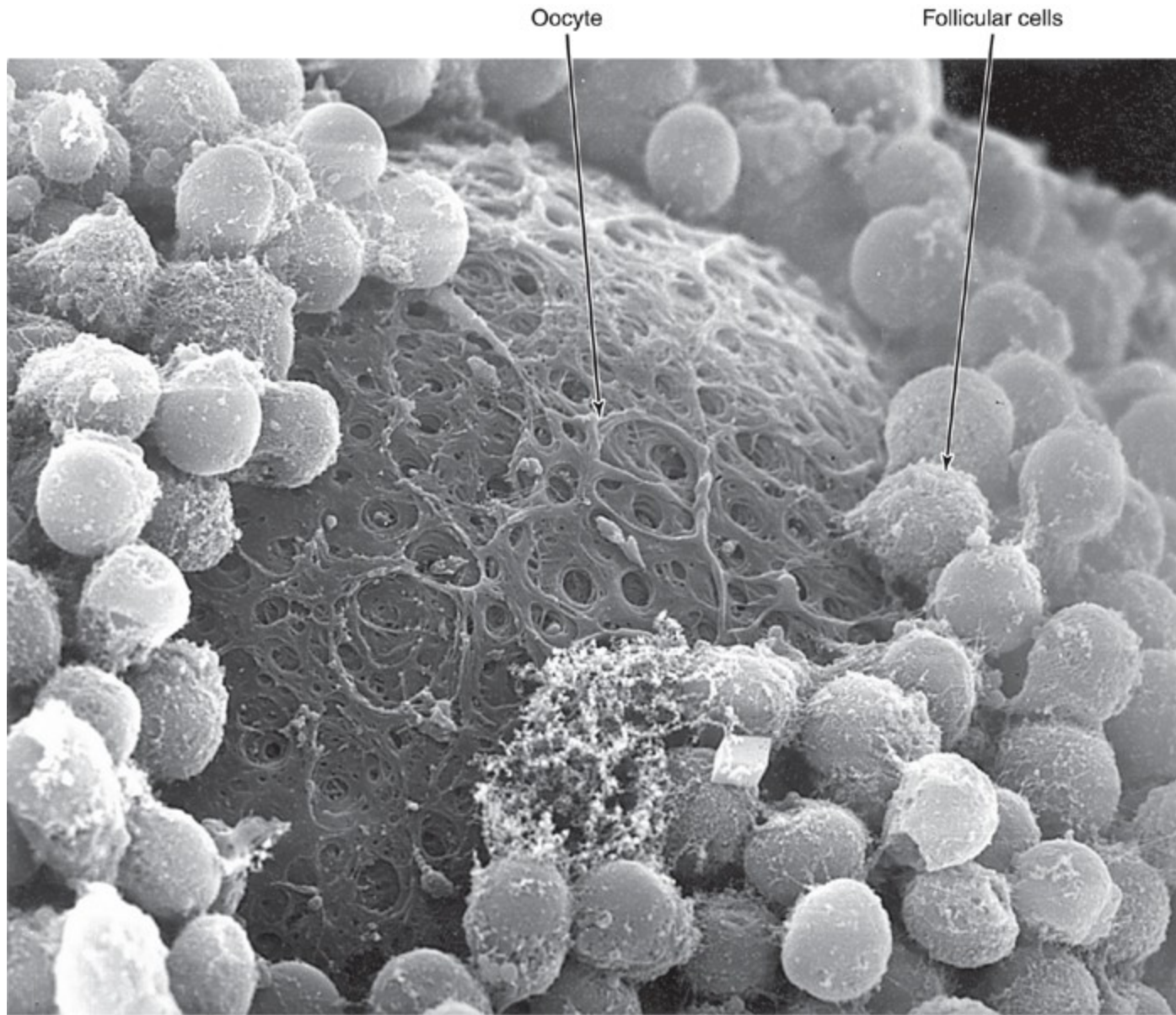
Typy ovariálních folikulů



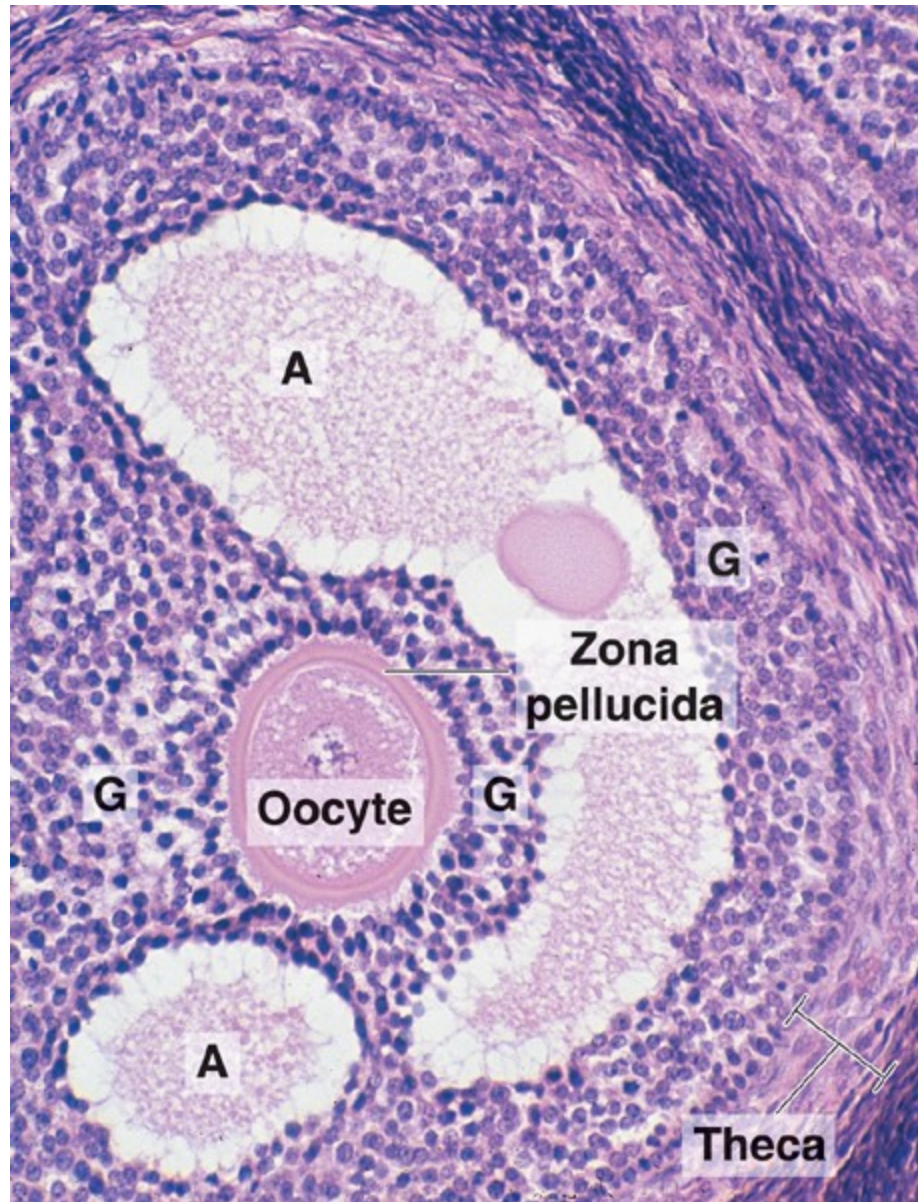
Kortikální oblast ovaria



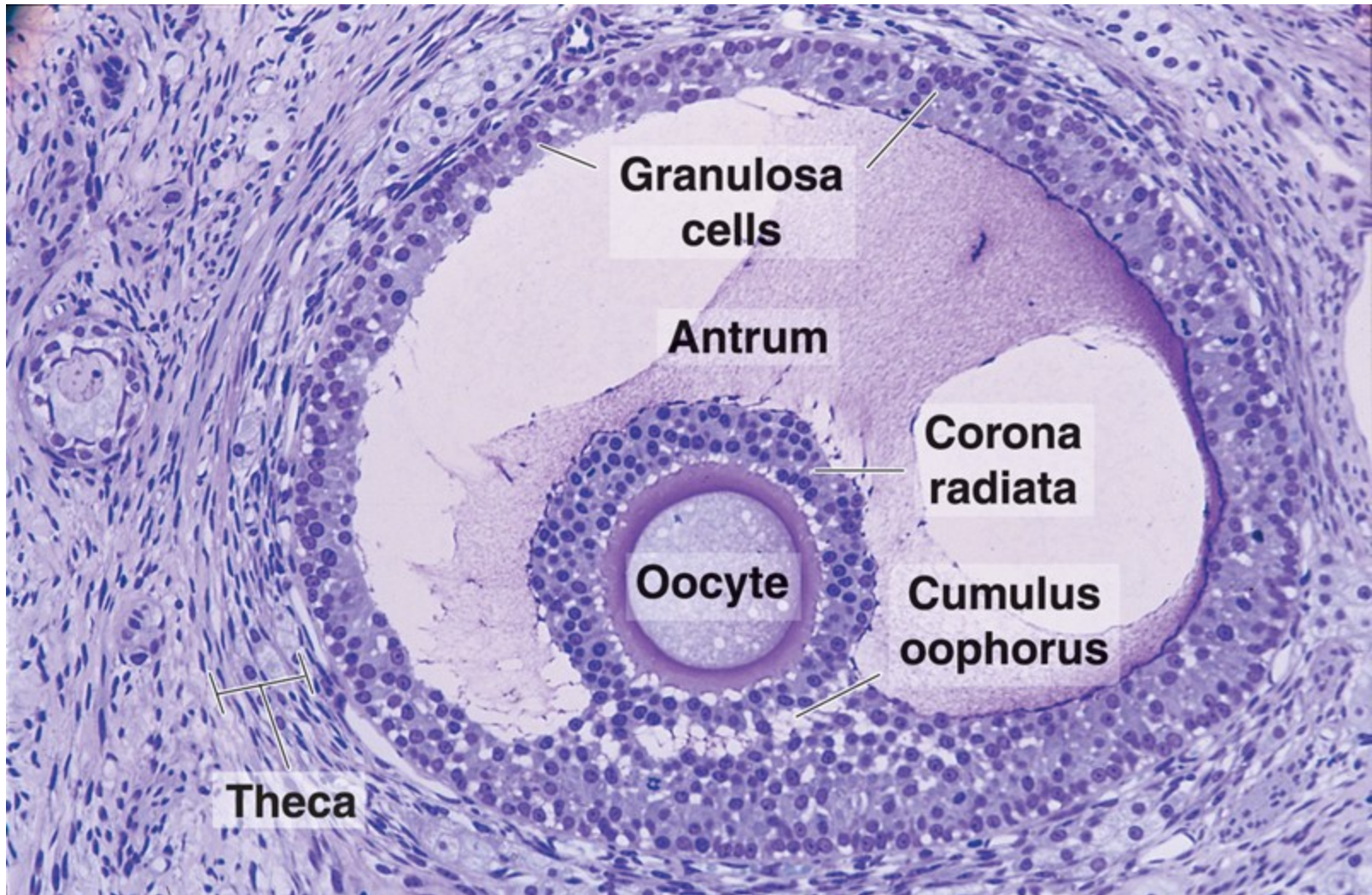
Preantrální folikuly



Oocyt s folikulárními buňkami, SEM



Antrální folikul



Antrální folikul

POZOROVÁNÍ EPITELIÁLNÍCH BUNĚK Z DUTINY ÚSTNÍ + BARROVO TĚLÍSKO

BARROVO TĚLÍSKO (sex chromatin):

Barvitelný útvar, který lze nalézt v interfázním jádře somatických buněk samic savců.

Jeden z dvou pohlavních chromozómů X je trvale ve stavu heterochromatinu, tzn. je trvale kondenzovaný, tzn. nepřepisuje se.

Dříve: k určování pohlavních odchylek.

Př. Klinefelterův syndrom AAXXY

Turnerův syndrom AAX..

- Sterilní špachtlí seškrábneme z vnitřní strany dutiny ústní malý kousek tkáně.
- Přeneseme na podložní sklíčko, popř. zředíme slinami.
- Přikápneme Lugolův roztok.
- Přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme s imerzí. Polyedrické buňky, barvitelný útvar na vnitřní straně jaderné membrány.