

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jan Pankrác

**Raný embryonální vývoj a morfogeneze vybraných orgánových
soustav redií a cercárií motolice *Fascioloides magna*.**

Early embryonal development and morphogenesis of selected organ
systems of the rediae and cercariae of *Fascioloides magna*.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 8. 2014

.....

Poděkování:

Děkuji Martinu Kašnému a Petru Horákovi za obrovskou ochotu při zajišťování všeho nezbytného pro vznik této práce, Janě za odborné a praktické rady, Vaškovi, Vládovi, Romče a všem ostatním z naší laborky za přátelské prostředí a rodičům a Verče za trpělivost a psychickou podporu v krizových situacích.

OBSAH:

1. Úvod.....	1
2. Hlavní cíle diplomové práce	2
3. Literární přehled	3
3.1. Zařazení a životní cyklus motolice <i>Fascioloides magna</i>	3
3.2. Vývoj motolice <i>F. magna</i> v meziphostitelském plži	5
3.3. Rozmnožování motolic v prvním meziphostiteli.....	7
3.3.1. Reprodukce sporocyst a redií motolic	9
3.3.2. Vývoj zárodku dceřiných sporocyst, redií a cercárií motolic	11
3.4 Vznik a vývoj tělních soustav zástupců skupiny Platyhelminthes.....	12
3.4.1. Svalová soustava.....	12
3.4.2. Nervová soustava.....	15
3.4.3. Vylučovací soustava.....	18
4. Metodika	22
4.1. Získávání materiálu.....	22
4.1.1. Životní stádia <i>Fascioloides magna</i>	22
4.1.2. <i>Macrostomum</i> sp.....	24
4.1.3. <i>Macrostomum lignano</i>	24
4.2. Fyziologické roztoky a pufrý	27
4.2.1. Fyziologický roztok pufrovaný fosforečnany (PBS).....	27
4.2.2. Fyziologický roztok podle složení hemolymfy plže <i>Galba truncatula</i>	28
4.3. Fixace tkání.....	29
4.3.1. Histochemie (fixace).....	29
4.3.1. Imunohistochemie a značení faloidinem konjugovaným s fluorescein izokyanátem (FITC) (fixace)	30
4.4. Histochemie	31
4.4.1. Příprava JB-4 tkáňových bločků.....	31
4.4.2. Příprava tkáňových řezů	32
4.4.3. Barvení a montování tkáňových řezů	33
4.5. Imunohistochemie.....	37
4.5.1. Permeabilizace tkání <i>Fascioloides magna</i> , <i>Macrostomum</i> sp. a <i>Macrostomum lignano</i>	37
4.5.2. Obecná metodika imunohistochemického značení.....	39
4.5.3. Metody značení prolifерujících buněk redií <i>F. magna</i>	41
4.5.4. Metody značení tělních struktur redií a cercárií <i>F. magna</i>	45
4.6. Ostatní metody	47
4.6.1. Značení aktinových vláken tělních struktur redií a cercárií <i>F. magna</i>	47
4.6.2. Tvorba tlustých tkáňových řezů pro konfokální mikroskopii.....	48
4.6.3. Zpracování dat o morfogenezi tělních soustav	51
4.6.4. Disociace tkání redií a zárodků redií a cercárií motolice <i>F. magna</i>	51
4.7. Získávání a zpracování obrazového materiálu.....	53
4.7.1. Získávání obrazového materiálu	53
4.7.2. Zpracování obrazového materiálu	53
5. Výsledky	54
5.1. Vývoj reprodukčně aktivních stádií <i>F. magna</i> v plži <i>P. columella</i>	54
5.1.1. Sporocysta.....	54
5.1.2. Redie první generace	55
5.1.3. Redie druhé generace.....	55
5.2. Vznik zárodků redií a cercárií <i>F. magna</i>	57

5.2.1. Morfologická charakteristika kmenových a „zárodečných“ buněk <i>F. magna</i> ...	57
5.2.2. Zárodečné masy v rediích <i>F. magna</i>	59
5.2.3. Raná embryogeneze redií druhé generace a cercárií <i>F. magna</i>	59
5.2.4. Zánik reprodukčních schopností redií <i>F. magna</i>	60
5.2.5. Specifické značení proliferujících buněk.....	61
5.3. Morfogeneze tělních soustav	63
5.3.1. Svalová soustava.....	63
5.3.1.1. Svalová soustava redie druhé generace	64
5.3.1.2. Morfogeneze svalové soustavy redie druhé generace.....	66
5.3.1.3. Svalová soustava cercárie.....	70
5.3.1.4. Morfogeneze svalové soustavy cercárie	73
5.3.2. Nervová soustava.....	78
5.3.2.1. Nervová soustava redie druhé generace.....	78
5.3.2.2. Morfogeneze nervové soustavy redie druhé generace.....	79
5.3.2.3. Nervová soustava cercárie	81
5.3.2.4. Morfogeneze nervové soustavy cercárie	84
5.3.3. Vylučovací soustava.....	86
5.3.3.1. Vylučovací soustava redie druhé generace	86
5.3.3.2. Morfogeneze vylučovací soustavy redie druhé generace	87
5.3.3.3. Vylučovací soustava cercárie.....	89
5.3.3.4. Morfogeneze vylučovací soustavy cercárie.....	91
6. Diskuze	92
6.1. Rozmnožování motolice <i>F. magna</i> v mezihostitelském plži.....	92
6.2. Morfogeneze svalové soustavy redií druhé generace a cercárií <i>F. magna</i>	97
6.3. Morfogeneze nervové soustavy redií druhé generace a cercárií <i>F. magna</i>	99
6.4. Morfogeneze vylučovací soustavy redií druhé generace a cercárií <i>F. magna</i>	101
7. Závěr	105

Abstrakt

Fascioloides magna je ve střední Evropě nepůvodní, veterinárně významný druh dvouhostitelské motolice využívající jako své definitivní hostitele zástupce čeledi Cervidae (jelenovití). Náhodně mohou být infikováni i jiné druhy přežvýkavců, například ovce domácí, tur domácí či koza domácí. Podobně jako u mnoha dalších druhů motolic hraje i v životním cyklu motolice *F. magna* klíčovou roli vývoj v mezihostitelském plži (Lymnaeidae). V této části vývoje se životní stádia – sporocysty a redie rozmnožují a produkují stádia nazývaná cercárie. Ty jsou po encystaci ve vnějším prostředí infekční pro definitivního hostitele. Vývoj motolic v prvním mezihostiteli je předmětem výzkumu již od druhé poloviny 19. století, přičemž mnoho otázek souvisejících s touto problematikou zůstává stále nezodpovězených. K odhalení některých skutečností mechanismu rozmnožování motolice *F. magna* v mezihostiteli a ontogenetického vývoje redií a cercárií prezentovaném na příkladech vybraných tělních soustav – svalové, nervové a vylučovací, by měla přispět i tato práce.

Klíčová slova: vývoj, rozmnožování, motolice, plž, redie, cercárie, miracidium, *Fascioloides magna*, zárodečná buňka, kmenová buňka, svalová soustava, nervová soustava, vylučovací soustava, aktin, tubulin, serotonin

Abstract

Fascioloides magna (giant liver fluke) is a digenetic trematode with two-host life cycle and high veterinary importance. Typical definitive host is a deer (Cervidae), but many other species from different families can be accidentally infected, for example sheep, goat or cattle. Very important role in the life cycle of *F. magna* has the first host – fresh water snail of the family Lymnaeidae. Three different life stages of *F. magna*, two of them with ability of reproduction – sporocysts and rediae develop in the body of snail. The third stage – cercaria is produced by rediae. Cercariae are able to escape from the snail, encyst and become infective for the definitive host. Since the second half of the 19th century many researchers studied the development of particular stages in the first intermediate host, but many characteristics of this process are still not fully understood. This thesis should reveal some of unanswered questions concerning to the reproduction and ontogenetic development of trematodes, which is presented on the examples of three organ systems – muscles, nerves and excretory system of rediae and cercariae of *F. magna*.

Key words: development, reproduction, trematode, snail, redia, cercaria, miracidium, *Fascioloides magna*, germinal cell, stem cell, muscle system, nervous system, excretory system, actin, tubulin, serotonin

1. Úvod

Fascioloides magna (motolice obrovská) je veterinárně významná dvouhostitelská motolice řazená společně s blízce příbuznou motolicí *Fasciola hepatica* do čeledi Fasciolidae. Definitivním hostitelem této motolice jsou zástupci velkých savců, typicky čeledi Cervidae (jelenovití). Mezihostitele představují sladkovodní plži (Lymnaeidae) v Evropě zastoupení jediným druhem *Galba truncatula* (Erhardová-Kotrlá, 1971).

Vývoj motolice *F. magna* v mezihostiteli je doprovázen rozmnožováním životních stádií nazývaných sporocysty a redie. Výsledkem je vznik larválního stádia cercárie, které aktivně opouští tělo plže, vyhledává pevný povrch a vytváří odolnou formu – metacerkárii, která je v případě požití infekční pro definitivního hostitele (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971).

Mechanismus rozmnožování motolic v mezihostitelském plži je cílem zájmu parazitologů již od druhé poloviny 19. století, přesto se dosud nepodařilo vyřešit některé jeho základní aspekty. Současní autoři se neshodují, zda je možné považovat životní stádia reprodukcující se v plži – sporocysty a redie za nezávislou generaci dospělců s odlišnou stavbou těla, u kterých došlo k vymizení vzniku pohlavních buněk, nebo se jedná o larvální stádia podstupující komplikovaný proces přeměny v dospělé doprovázený nepohlavním rozmnožováním prostřednictvím vnitřního pučení (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Reuter a Kreshchenko, 2004). Proces rozmnožování sporocysty a redií motolic čeledi Fasciolidae je doposud ve srovnání s jinými čeleděmi motolic (např. Echinostomatidae či Bucephalidae) značně opomíjený.

Ke vzniku a vývoji zárodků redií a cercárií dochází v tělní dutině stádií přechodí generace (v případě cercárií se jedná o redie, v případě redií opět o redie nebo o sporocysty). Zakládání a vývoj tělních soustav redií a cercárií nebyl prostřednictvím moderních metod doposud podrobněji studován. Detailní znalost jejich morfogeneze by mohla posloužit k doplnění současných představ o přirozeném fylogenetickém systému motolic, případně o fylogenetickém vztahu parazitické skupiny Neodermata k volně žijícím zástupcům Platyhelminthes.

2. Hlavní cíle diplomové práce

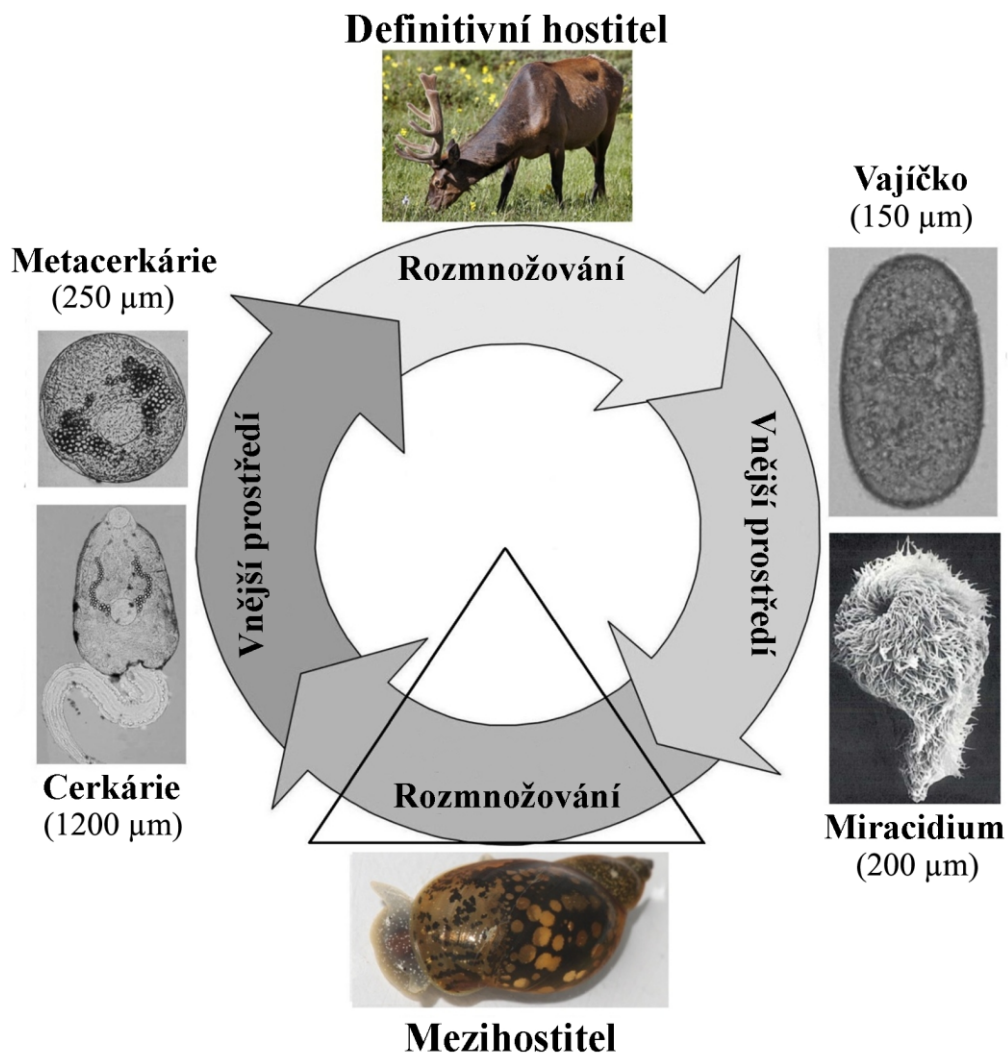
1. Charakterizovat mechanismus vzniku zárodků redií a cercárií motolice *Fascioloides magna*.
2. Popsat morfogenezi vybraných orgánových soustav redií a cercárií motolice *Fascioloides magna*.

3. Literární přehled

3.1. Zařazení a životní cyklus motolice *Fascioloides magna*

Fascioloides magna (motolice obrovská) je dvouhostitelská motolice taxonomicky řazená do čeledi Fasciolidae (Obr. 1.). Dospělci o délce 4–7 cm jsou lokalizováni v pseudocystách v parenchymu jater definitivního hostitele, typicky zástupce čeledi Cervidae (jelenovití) (Erhardová-Kotrlá, 1971). Zástupci jiných čeledí savců (často hospodářsky významných druhů) se mohou stát náhodnými hostiteli, například *Ovis aries* (ovce domácí), *Bos primigenius f. taurus* (tur domácí) nebo *Capra hircus* (koza domácí) (Swales, 1936; Foreyt a Leathers, 1980; Leontovyč a kol., 2014).

Mezihostitely *F. magna* jsou sladkovodní plži čeledi Lymnaeidae (plovatkovití) (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). V Severní Americe, původním areálu rozšíření tohoto parazita, bylo popsáno 6 druhů přirozených mezihostitelů (Tab. 1.). V nepůvodním prostředí Evropy se *F. magna* s větším úspěchem přizpůsobila dosud pouze jedinému druhu semiakvatického plže *Galba truncatula* (plovatka malá) (Erhardová-Kotrlá, 1971).



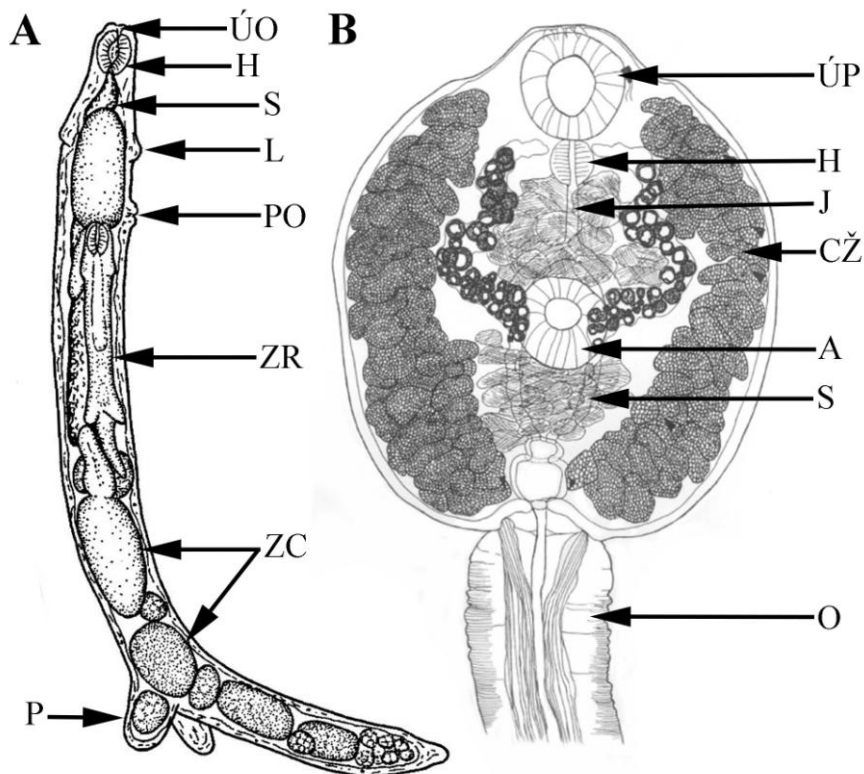
Obr. 1. Schéma dvouhostitelského životního cyklu motolice *Fascioloides magna* (J. Pankrác). Trojúhelník označuje vývoj motolice v mezihostitelském plži. Uvedené přibližné velikosti životních stádií vycházejí z prací Erhardová-Kotrlá (1971) a Swales (1935).

Tab. 1. Přirození mezihostitelští plži motolice *F. magna* v Severní Americe.

Druh	Nález
<i>Fossaria bulimoides techella</i>	(Krull, 1933)
<i>Fossaria modicella</i>	(Krull, 1934)
<i>Pseudosuccinea columella</i>	(Krull, 1933)
<i>Fossaria parva</i>	(Swales, 1935)
<i>Stagnicola palustris nuttalliana</i>	(Swales, 1935)
<i>Stagnicola caperata</i>	(Griffiths, 1959)

3.2. Vývoj motolice *F. magna* v mezihostitelském plži

Vajíčka motolice *F. magna* opouští tělo definitivního hostitele společně s jeho trusem. V případě, že se dostanou do vodního prostředí, vyvíjí se v nich obrvené stádium nazývané miracidium. Po dokončení svého vývoje miracidium z vajíčka uniká otvorem vzniklým po odpadnutí víčka a aktivně vyhledává mezihostitelského plže. Průnik do jeho těla umožňuje sekrece histolytických enzymů penetračních žláz (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Coil, 1977, 1981). V průběhu penetrace miracidium odvrhne obrvené epiteliální buňky (ciliární destičky) a nahrazuje je bezjaderným syncytiem (tegumentem) vzniklým povrchovou expanzí cytoplazmy buněk přítomných na vnitřní straně tělní stěny¹ (subtegumentálních buněk) (Southgate, 1970; Wilson a kol., 1971; Coil, 1977, 1981). V souvislosti se změnou tělního povrchu dochází i ke změně v terminologii tohoto stádia, které se od té chvíle začíná označovat jako sporocysta.



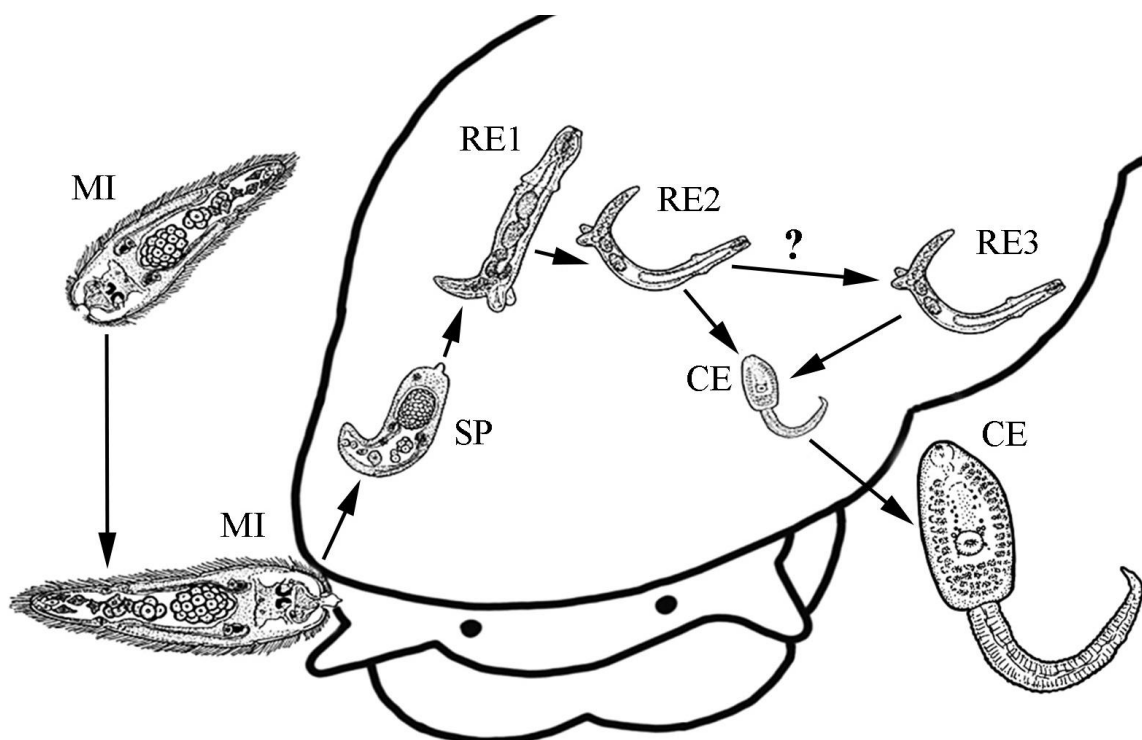
Obr. 2. Tělní stavba redie a cercárie motolic čeledi Fasciolidae (Dinnik a Dinnik, 1956; Faltýnková a kol., 2006; upravil J. Pankrác). **A** – redie motolice *Fasciola gigantica* (redie *F. gigantica* jsou schopné produkovat zárovek zárodky redií i cercárií), **B** – cercárie motolice *Fascioloides magna*. A – acetabulum, CŽ – cystogenní žláza, H – hltan, J – jícen, L – límec, O – ocásek, P – procrusculum, PO – porodní otvor, S – střevo, ÚO – ústní otvor, ÚP – ústní přísavka, ZC – zárodek cercárie, ZR – zárodek redie.

¹ Proces utváření tegumentu byl popsán u blízkce příbuzného druhu *Fasciola hepatica* (Southgate, 1970; Wilson a kol., 1971).

Vývoj sporocysty v tkáních meziphostitele doprovází její růst a zánik orgánů, které po nalezení plže ztrácí svůj význam – penetračních žláz, hlavového ganglia a oční skvrny. Mitotickým dělením totipotentních buněk (viz kapitola 3.3.1.) přítomných v tělní dutině sporocysty vznikají zárodky stádií nazývané redie první generace (nebo také mateřské redie) (Obr. 2A.). Po dosažení dostatečného stupně vývoje opouští tělo sporocysty protržením její tělní stěny. V důsledku toho sporocysta hyne a méně vyvinuté zárodky dokončují svůj vývoj volně v těle plže (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971).

V tělní dutině redií první generace vznikají obdobným způsobem jako v případě sporocyst redie druhé generace (dceřiné redie) (Obr. 3.) (Laursen a Yoshino, 1999). Na celkovém počtu generací redií se autoři neshodují. Zatímco Swales (1935) a Erhardová-Kotrlá (1971) pozorovali přítomnost pouze dvou generací, Vignoles a kol. (2006) nacházeli ve velkých jedincích plže *G. truncatula* i malý počet mírně degenerovaných redií třetí generace.

Posledním životním stádiem v meziphostiteli produkovaným druhou (případně třetí) generací redií je cercárie (Obr. 2B.). Na rozdíl od předchozích životních stádií již není schopná reprodukce a po dokončení svého vývoje uniká z těla plže do vodního prostředí (mechanismus není doposud objasněný), kde aktivně vyhledává pevný povrch. Po jeho nalezení vytváří za pomoci produktů cystogenních žláz dormantní stádium – metacercárii, které je v případě náhodného pozření infekční pro definitivního hostitele (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Vignoles a kol., 2006).



Obr. 3. Schéma vývoje motolice *F. magna* v mezihostitelském plži (Dinnik a Dinnik, 1956; upravil J. Pankrác). Existence třetí generace redií byla zaznamenána pouze některými autory (Vignoles a kol., 2006). CE – cercárie, MI – miracidium, RE1 – redie první generace, RE2 – redie druhé generace, RE3 – redie třetí generace, SP – sporocysta.

3.3. Rozmnožování motolic v prvním mezihostiteli

Rozmnožování motolic skupiny Digenea probíhá dvěma značně odlišnými způsoby uplatňujícími se v různých fázích životního cyklu. Zaprvé se jedná o pohlavní rozmnožování dospělců (některými autory označovanými jako hermafroditická generace viz dále) vázané na definitivního hostitele (obratlovce), které je obdobou rozmnožování dospělců ostatních zástupců skupiny Platyhelminthes. Druhý způsob rozmnožování nezahrnuje vznik pohlavních buněk a dochází k němu u životních stádií nazývaných redie a sporocysty v těle prvního mezihostitele (nejčastěji zástupce skupiny Mollusca). Přímým zdrojem dceřiného potomstva (redií, dceřiných sporocyst a cercárií) jsou v tomto případě totipotentní buňky, které se mohou jako nediferencované kmenové buňky opakovaně mitoticky dělit a poté se diferencují na specializovaný typ buněk označovaný jako buňky „zárodečné“². Právě ty nakonec dají mitotickým dělením (podobně jako zygota) vzniknout

² Diferencované totipotentní buňky, ze kterých vznikají zárodky redií, dceřiných sporocyst a cercárií jsou v literatuře označovány jako „germinal cells“. Protože je jejich příbuznosti s pravými zárodečnými buňkami stále nejasná, budou dále uváděny v uvozovkách.

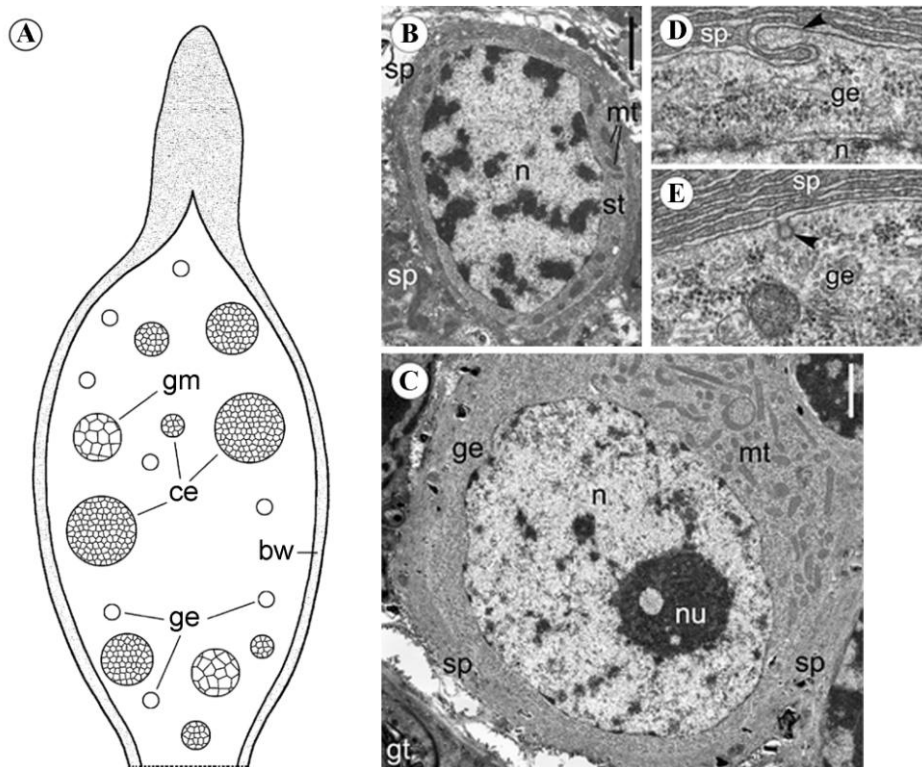
zárodku dceřiného jedince (Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

Rozmnožování motolic v prvním mezipříměti je předmětem výzkumu již od druhé poloviny 19. století. Za účelem vysvětlit povahu tohoto jevu byly v první polovině 20. století navrženy nejrůznější hypotézy. Později byly některé zcela zavrženy (například přítomnost redukčního dělení nebo vznik pohlavních buněk v pohlavních orgánech sporocyst a redií) a ze zbylých se zformovaly dva hlavní myšlenkové proudy (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937; Cort a kol., 1954). První z nich se přiklání k myšlence, že jsou diferencované „zárodečné“ buňky sporocyst a redií homologické se zárodečnými buňkami hermafroditických stádií z obratlovců. Sporocysty a redie jsou pak považovány za nezávislé, morfologicky odlišné generace rozmnožující se apomiktickou (ameiotickou) partenogenezí (James a Bowers, 1967; Khalil a Cable, 1968; Pearson, 1972; Gibson 1987; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). Druhá skupina autorů se spíše domnívá, že redie a sporocysty představují polymorfní larvy, které se v rámci své komplikované metamorfózy v dospělce rozmnožují nepohlavně vnitřním pučením (Clark, 1974; Whitfield a Evans, 1983; Reuter a Kreshchenko, 2004). K rozřešení tohoto problému je nutné na základě molekulární biologie a transmisní elektronové mikroskopie rozhodnout, zda jsou „zárodečné“ buňky sporocyst a redií homologní s „pravými“ zárodečnými buňkami v liniích vedoucích ke vzniku pohlavních buněk, nebo se jedná pouze o specifickou formu totipotentních buněk s analogickou ultrastrukturou (Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

3.3.1. Reprodukce sporocyst a redií motolic

Z hlediska způsobu reprodukce redií a sporocyst je možné rozdělit motolice do dvou skupin.

V prvním, častějším případě disponují redie a sporocysty specializovaným orgánem, sloužícím jednak k produkci nových „zárodečných“ buněk a zadruhé velmi často i k výživě a ochraně zárodků na nejnižších stupních vývoje (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). Tento orgán se nazývá zárodečná masa a nachází se v tělní dutině redií a sporocyst jako oválný útvar, který buď volně plave v tělní dutině (Obr. 4A.), nebo je do různé míry přichycen k tělní stěně mateřského organismu prostřednictvím cytoplazmatických výběžků parenchymatických (somatických) buněk. Zárodečná masa se skládá ze 3 typů buněk: kmenových buněk, „zárodečných“ buněk a podpurných buněk (Brooks, 1930; Cort a kol., 1954; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003).



Obr. 4. Vznik zárodků motolic. **A** – schématické znázornění tělního výběžku sporocysty *Prosorhynchoides gracilescens* (Bucephalidae) obsahujícího zárodečné masy, volné „zárodečné“ buňky a zárodky cercárií, **B** – kmenová buňka redie *Himasthla elongata* (Echinostomatidae), měřítko: 1 μ m, **C** – „zárodečná“ buňka v závěru diferenciacie (*H. elongata*), měřítko: 1 μ m, **D** – cytoplazmatický výběžek na rozhraní podpurná buňka/„zárodečná“ buňka (*H. elongata*), měřítko: 0,5 μ m, **E** – pinocytóza na rozhraní podpurná buňka/„zárodečná“ buňka (*H. elongata*), měřítko: 0,5 μ m (Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014; upravil J. Pankrác). bw – tělní stěna („body wall“), ce – zárodek cercárie („cercarial embryo“), ge – „zárodečná“ buňka („germinal cell“), gm – zárodečná masa („germinal mass“), gt – střevo („gut“), mt – mitochondrie, n – nukleus, nu – nukleolus, sp – podpurná buňka („supporting cell“), st – kmenová buňka („stem cell“).

Kmenové buňky (popsané u motolic čeledí Bucephalidae a Echinostomatidae) jsou nediferencované oválné buňky o velikosti okolo 6 μm s jádrem vyplňujícím prakticky celý jejich objem (Obr. 4B.). Diferencují se z nich dva zbylé buněčné typy zárodečné masy – podpůrné a „zárodečné“ buňky. Svě počty doplňují rovnoměrným („equal“) mitotickým dělením (Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

Jedním z diferencovaných buněčných typů zárodečné masy jsou „zárodečné“ buňky (Obr. 4C.). Proces jejich diferenciace z kmenových buněk je doprovázen růstem jádra a cytoplazmy, zvýšením poměru cytoplazma/jádro, decentralizací jádra v cytoplazmě a zmnožením organelové výbavy naznačujícím zvýšení metabolické aktivity (Podvyznaya a Galaktionov, 2014). Velmi významný je i vznik struktury nazývané „nuage“. Jedná se o granulo-fibrózní akumulaci elektrodenzního materiálu neznámé funkce, která se objevuje volně v cytoplazmě nebo na vnější straně jaderné membrány a je univerzálním morfologickým znakem buněk zárodečných linií (Saffman a Lasko, 1999; Extavour a Akam, 2003; Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). Morfologie buňky a přítomnost „nuage“ naznačují možnou homologii „zárodečných“ buněk s pravými zárodečnými buňkami samičí linie vedoucí ke vzniku vajíčka (Pieper, 1953; Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). V souvislosti s dokončováním diferenciace mohou nastat v závislosti na druhu motolice dva různé scénáře. Buď se „zárodečná“ buňka začne v rámci zárodečné masy dělit a dá tak vzniknout zárodku, který se po dosažení určitého stavu vývoje oddělí do tělní dutiny, nebo se od zárodečné masy odloučí jako samostatná buňka a k dosažení plně diferencovaného stavu a vzniku zárodku dojde až v tělní dutině (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). Diferencované (a diferencující se) „zárodečné“ buňky se mitotickým dělením množit nedokáží (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Podvyznaya, 2007).

Druhým diferencovaným buněčným typem jsou takzvané podpůrné buňky („supporting cells“) podílející se na udržení struktury zárodečné masy, mechanické ochraně, odstraňování zplodin a zřejmě i zajišťování výživy ostatních buněk a zárodků. Vysílají složitě uspořádané cytoplazmatické výběžky vytvářející trojrozměrnou síť, ve které jsou zárodečné elementy pevně ukotveny (Obr. 4D., 4E.). K určitému rozvolnění této sítě dochází pouze u buněk nebo zárodků, které jsou připraveny zárodečnou masu opustit (Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

Ve sporocystách a rediích některých čeledí motolic, například Fasciolidae,

Paramphistomidae nebo Heterophyidae, zárodečné masy nevznikají (Ameel a kol., 1950; Van der Woude, 1954; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). K rozmnožování sporocyst a redií těchto druhů dochází pouze v průběhu jejich zárodečného vývoje mitotickým dělením kmenových buněk předurčených k diferenciaci v buňky „zárodečné“. Ty později dají vznik budoucím zárodkům (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Podvyaznaya, 2007).

3.3.2. Vývoj zárodku dceřiných sporocyst, redií a cercárií motolic

Raná embryogeneze sporocyst, redií a cercárií motolic je charakteristická nerovnoměrným („unequal“) dělením „zárodečné“ buňky, úplným rýhováním a asynchronním dělením blastomer (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). Studie provedená na motolici *Paragonimus kellicotti* ukázala významnou skutečnost, že průběh rané embryogeneze miracidia, mateřské redie, dceřině redie a cercárie tohoto druhu se zcela shoduje (Chen, 1937). Tento trend je možná obecně platný pro všechny druhy motolic (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003).

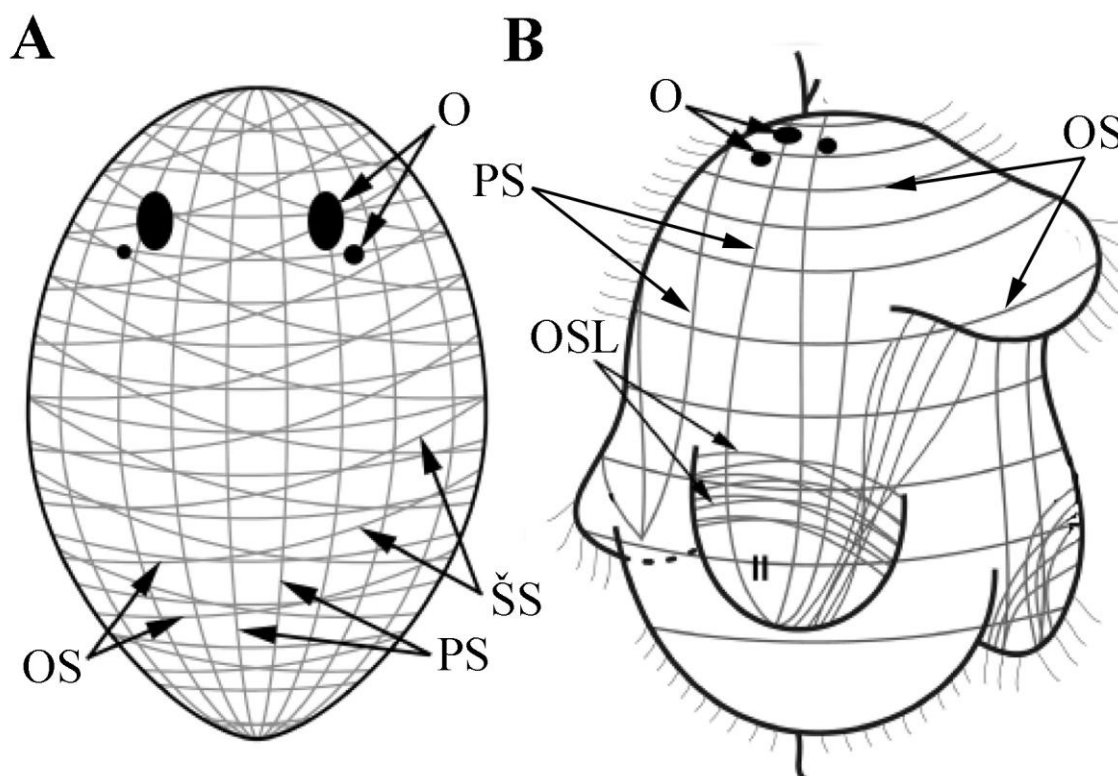
Ve fázi vývoje, kdy zárodek tvoří 7–14 buněk, se jedna z blastomer diferencuje na plochou povrchovou buňku, která svými cytoplazmatickými výběžky postupně obaluje zárodek. Později se objeví další buňky tohoto typu a společně utvoří okolo zárodku syncytiální obal nazývaný primitivní epitel (nebo také „investing membrane“ či „embryonic envelope“), čímž se tvarově nepravidelný shluk různě velkých blastomer přemění na stádium s hladkým povrchem označovaným jako „zárodečná koule“ (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937; Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). Až v pozdějším vývoji se na povrchu zárodku vytvoří pravý tegument a po vzniku bazální laminy je primitivní epitel odvržen (Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). Funkcí primitivního epitelu je zřejmě mechanická ochrana zárodku a látková výměna s vnějším prostředím (Žďárská, 1995). Pokud zárodky neplavou volně v tělní tekutině, jak je tomu například u čeledi Bucephalidae, bývají kromě primitivního epitelu obaleny ještě cytoplazmatickými výběžky parenchymatických (somatických) buněk mateřského organismu sloužícími zřejmě opět k ochraně a výživě zárodku (Irwin a kol., 2003). U redií motolice *Cryptocotyle lingua* bylo v souvislosti s růstem zárodků popsáno jejich postupné přesouvání anteriorním směrem a uvolňování ze sítě cytoplazmatických výběžků do tělní dutiny (Cable, 1934).

3.4 Vznik a vývoj tělních soustav zástupců skupiny Platyhelminthes

V rámci diplomové práce byla studována morfogeneze 3 tělních soustav redií a cercárií motolice *F. magna* – svalové, nervové a vylučovací. Protože jsou informace o morfogenezi zástupců parazitické skupiny Neodermata nedostatečné, bylo nezbytné zabývat se i volně žijícími druhy v rámci celé skupiny Platyhelminthes.

3.4.1. Svalová soustava

Raná myogeneze byla detailněji popsána pouze u volně žijících zástupců Platyhelminthes skupin Polycladida a Macrostomorpha patřících do společné skupiny Rhabditophora (Rieger a kol., 1991, 1994; Reiter a kol., 1996; Bolaños a Litvaitis, 2009; Semmler a Wanninger, 2010). Většina z těchto prací se zabývá zástupci s nepřímým vývojem probíhajícím přes Müllerovu larvu, u níž se stavba svaloviny výrazně liší od juvenilních stádií ploštěnek s přímým vývojem (Obr. 5A., 5B.) (Bolaños a Litvaitis, 2009; Semmler a Wanninger, 2010). Jediné dva druhy Platyhelminthes s přímým vývojem a zároveň podrobným popisem vzniku a raného vývoje svaloviny jsou *Macrostomum hystricinum marinum* (Macrostomorpha) a *Melloplana ferruginea* (Polycladida) (Rieger a kol., 1994; Reiter a kol., 1996; Bolaños a Litvaitis, 2009). V rámci skupiny Neodermata se zakládáním svaloviny a jejím embryonálním vývojem žádná práce detailněji nezabývá.



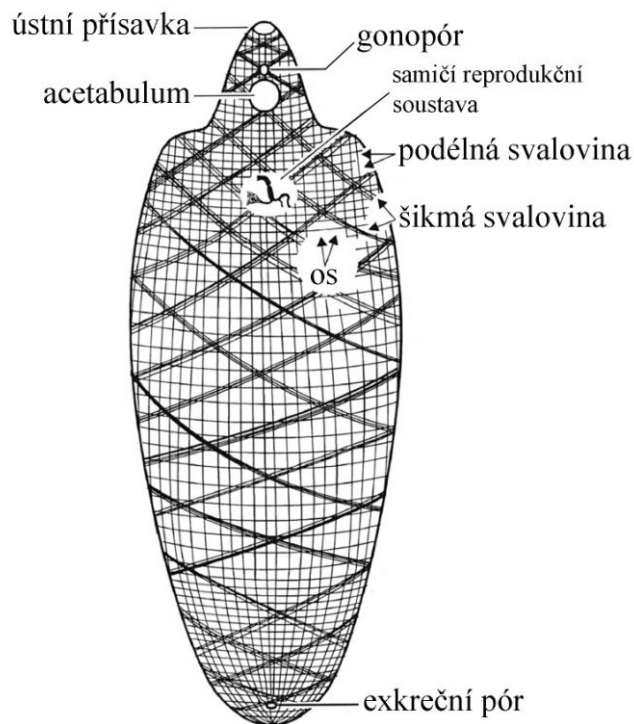
Obr. 5. Srovnání svaloviny tělní stěny volně žijících zástupců Platyhelminthes s přímým a nepřímým vývojem (Bolaños a Litvaitis, 2009; upravil J. Pankrác). **A** – juvenilná jedinec ploštěnky *Melloplana ferruginea* s přímým vývojem, **B** – Müllerova larva ploštěnky *Maritigrella crozieri*. O – oko, OS – okružní svalovina, OSL – okružní svalovina laloku, PS – podélná svalovina, ŠS – šikmá svalovina.

Svalovina tělní stěny ploštěnek skupiny Rhabditophora se skládá podobně jako u motolic ze tří svalových vrstev – okružní, podélné a šikmé (Obr. 5A., 6.). Odlišné je jejich uspořádání. Střední vrstvu svalů tvoří u zástupců Rhabditophora svaly šikmé, zatímco u zástupců Trematoda svaly podélné. Vnější svalovou vrstvu představuje u obou skupin okružní svalovina (Halton a Maule, 2004; Tyler a Hooge, 2004). Vznik svalových vláken souvisí s diferenciací progenitorových buněk – myoblastů na diferencované svalové buňky – myocyty³. Myoblasty mají podobně jako kmenové buňky volně žijících druhů skupiny Platyhelminthes vysoký poměr zastoupení jádra k objemu cytoplazmy. Po započetí diferenciace se buňka prodlužuje a tento poměr se zmenšuje. Typickým znakem diferencující se svalové buňky je granulární charakter cytoplazmy, o jehož povaze se dosud s jistotou neví, ale mohl by souviset s přítomností polyribosomů (Cebrià a kol., 1997). Jako první se objevují roztroušené základy svalových vláken, které se postupně seskupí do hrubého a nepravidelného ortogonálního uspořádání tvořeného okružními a podélnými svaly. Vrstva šikmých svalů se utváří až jako poslední. Další vývoj doprovází vznik

³ Diferenciace myoblastu byla popsána u ploštěnky *Girardia tigrina* (Tricladida) (Cebrià a kol., 1997).

sekundárních svalových vláken vedoucí k přeměně hrubého ortogonu na jemnou svalovou mřížku typickou pro dospělé (hrubé ortogonální uspořádání podélných a příčných svalových vláken viz Obr. 5A.) (Reiter a kol., 1996; Bolaños a Litvaitis, 2009; Semmler a Wanninger, 2010).

Významné jsou i výsledky získané u zástupců taxonu Acoelomorpha, bazálních bilaterálních organismů dříve řazených na základě podobné tělní stavby mezi Platyhelminthes (Ruiz-Trillo a kol., 2002; Cook a kol., 2004). Výstavbový princip svaloviny tělní stěny založený na vzniku primárního ortogonu tvořeného okružními a podélnými vlákny, které jsou posléze využity jako templát pro diferenciaci dalších myocytů se ukázal být společný pro skupiny Acoelomorpha, Platyhelminthes a Annelida. To naznačuje, že by se možná mohlo jednat o původní vývojový mechanismus společný všem bilaterálně souměrným mnohobuněčným organismům (Ladurner a Rieger, 2000).



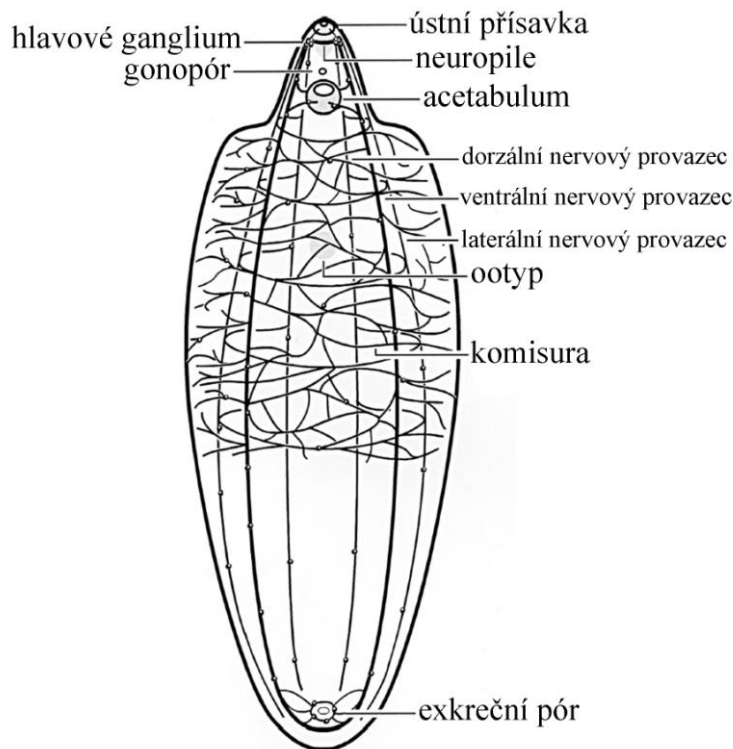
Obr. 6. Schéma uspořádání svaloviny tělní stěny motolic (Halton a Maule, 2004; upravil J. Pankrác).
os – okružní svalovina.

3.4.2. Nervová soustava

Vznik a vývoj nervové soustavy byl podrobně popsán u mnoha významných skupin organizmů s bilaterální symetrií těla (Bilateria), jako jsou například Chordata, Arthropoda, Platyhelminthes, Annelida nebo Mollusca. U většiny z těchto skupin se nervový systém zakládá invaginací nebo migrací progenitorových buněk nervové soustavy z povrchového neuroektodermu do nitra zárodku, kde se diferencují na neurony a gliové buňky. Buňky neuroektodermu, které zůstávají i nadále na povrchu zárodku, zakládají epitel budoucí epidermis (Jacob, 1984; Arendt a Nubler-Jung, 1999; Stollewerk a Chipman, 2006; Meyer a Seaver, 2009).

U skupiny Platyhelminthes je situace zcela odlišná. Nervová soustava se vyvíjí z blastomer přítomných „uvnitř“ zárodku, zatímco epidermis se formuje nezávisle (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Morris a kol., 2004). Většina studií ontogenetického vývoje nervové soustavy byla provedena na volně žijících zástupcích skupin Macrostomorpha, Polycladida, Rhabdocoela, Tricladida a Temnocephalida (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001; Morris a kol., 2004; Cardona a kol., 2005). Z parazitických zástupců skupiny Neodermata byl proces neurogeneze popsán pouze u tasemnice *Echinococcus multilocularis* a motolice *Diplostomum pseudospathaceum* (Niewiadomska a kol., 1996; Koziol a kol., 2013).

Centrální nervová soustava zástupců skupiny Platyhelminthes je tvořena anteriorně umístěným oválným hlavovým gangliem, ze kterého vybíhají do zbytku těla podélné nervové provazce – konektivy, propojené příčnými provazci – komisurami, dohromady tvořící charakteristický tvar ortogonu (Obr. 7.). Jeden pár podélných provazců je na základě větší tloušťky a významu pro organizmus označován jako hlavní („main nerve cords“), ostatní páry pak jako vedlejší („minor nerve cords“). Periferní nervový systém tvoří „submuskulární“ a „subepidermální“ pletence (Reuter a kol., 1998; Halton a Maule, 2004).



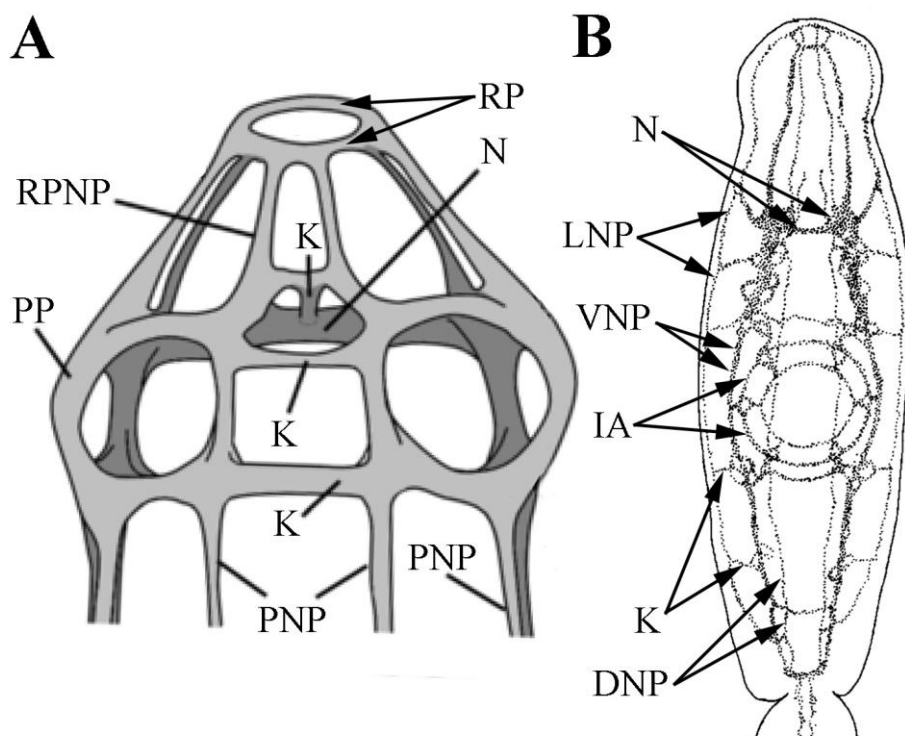
Obr. 7. Schéma nervové soustavy motolic (Halton a Maule, 2004; upravil J. Pankrác).

Proces zakládání primordia nervové soustavy je známý u skupiny Polycladida. Spirálním dělením vznikají ze zygoty 4 kvartety mikromer – kvartet 1–3 se nachází na animálním pólu a kvartet 4 na vegetativním pólu zárodku. V průběhu gastrulace kvartety 1–3, tvořené tzv. animálními mikromerami, obklopí kvartet 4, jehož buňky se tím ocitnou uvnitř zárodku. Jedna z buněk kvartetu 4 (označovaná jako 4d) se poté začne intenzivně dělit a společně se sousedícími animálními mikromerami zakládá v budoucí anteriorní části zárodku hlavové ganglium (Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000). U zástupců skupin Macrostromorpha, Polycladida, Rhabdocoela a Temnocephalida má primordium hlavového ganglia podobu buď dvou bilaterálně symetrických oválných kompaktních hemisfér (Rhabdocoela, Temnocephalida), nebo jediného kompaktního vejčitého útvar (Polycladida, Macrostromorpha). U Rhabdocoela hemisféry později splývají do jediné oválné masy. Vnější část hlavového ganglia – kortex, je tvořen těly neuronů vysílajícími do středu hlavového ganglia nervové výběžky (axony), které se vzájemně proplétají a tvoří neuropile (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001; Morris a kol., 2004). Vybrané neurony („pioneer neurons“) uspořádané v bilaterálně souměrných shlucích po obou stranách hlavového ganglia vytváří během své diferenciace dlouhé axony („pioneer axons“), které zakládají dráhy budoucího

ortogonálního uspořádání podélných konektiv a příčných komisur. V průběhu diferenciaci je v axonech a v menší míře i v tělech těchto neuronů přítomný acetylovaný tubulin umožňující jejich snadné odlišení imunohistochemickými metodami. (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001; Morris a kol., 2004). U druhu *Craspedella pedum* (Temnocephalida), který v dospělosti disponuje komplexním ortogonem bylo dokončení tvorby komisur pozorováno až v pozdním embryonálním vývoji (Younossi-Hartenstein a kol., 2001).

Vývoj nervové soustavy tasemnice *E. multiocularis* (protoskolexu) byl sledován prostřednictvím imunohistochemického značení neurotransmiteru serotoninu a neuropeptidu FMRFamidu (nervová soustava anteriorní části protoskolexu *E. multiocularis* viz Obr. 8A.). Prvním pozorovaným nervovým uskupením bylo primordium rostelárního prstence. Další vývoj probíhal ve směru od anterioru k posterioru založením hlavového ganglia a hlavního páru laterálních podélných nervových provazců. V poslední fázi bylo dokončeno uspořádání nervové soustavy skolexu a vznikly další páry nervových provazců a jejich propojení příčnými komisurami (Koziol a kol., 2013).

V případě motolice *D. pseudospathaceum* sledovali autoři vznik a vývoj systému nervových buněk obsahujících cholinesterázu (ChNS) a katecholaminy (ANS) (nervová soustava cercárie *D. pseudospathaceum* viz Obr. 8B.). Jako první byl prokázán vznik nervových buněk hlavového ganglia a jejich příčného propojení. V další fázi byly založeny všechny (3) páry podélných nervových provazců (dorzální pár se vyvíjel jako poslední) a hexagonální uspořádání nervových buněk okolo vznikající břišní přísavky. Následoval rychlý vývoj vedoucí ke zmnožení buněk hlavového ganglia, vzniku těl neuronů podél podélných nervových provazců a založení nervového systému ocásku. Zmíněný popis se týkal výhradně buněk ChNS. Buňky ANS se formovaly velmi pomalu a uspořádání obdobné ChNS utvořily až v pozdním vývoji metacercárie (Niewiadomska a kol., 1996).



Obr. 8. Nervová soustava skolexu tasemnice *Echinococcus multilocularis* (A) a cercárie *Diplostomum pseudospathaceum* (B) (Niewiadowska a kol., 1996; Koziol a kol., 2013; upravil J. Pankrác). DNP – dorzální nervový provazec, IA – inervace acetabula, K – komisura, LNP – laterální nervový provazec, N – neuropile, PNP – podélný nervový provazec, PP – nervový prstenec přísavky, RP – rostelární nervový prstenec, RPNP – rostelární podélný nervový provazec, VNP – ventrální nervový provazec.

3.4.3. Vylučovací soustava

Zástupci skupiny Platyhelminthes, ale i jiné skupiny bilaterálně souměrných mnohobuněčných organismů (např. Syndermata, Nemertina nebo Entoprocta) mají vylučovací soustavu protonefridiálního typu. Právě u Platyhelminthes byl její vznik a vývoj popsán nejpodrobněji (La Rue, 1957; Galaktionov a Dobrovolskij, 1987, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Hartenstein a Ehlers, 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Cardona a kol., 2005).

Protonefridie jsou tvořeny sítí sběrných kanálků odvádějících exkrety ven z těla organismu (Obr. 9A.). Tělní tekutina je do tohoto systému nasávána podtlakem vyvolaným kmitáním cilií specializovaných buněk nazývaných cyrtocyty (nebo také plaménkové buňky) (Obr. 9B.), filtrována přes jejich cytoplazmatické výběžky a nakonec vypuzena exkretčním pórem do vnějšího prostředí. Hlavní funkce protonefridií pravděpodobně spočívá v odstranění zplodin metabolismu, méně významná je pak osmoregulační funkce

(Wilson a Webster, 1974; Bartolomaeus a Ax, 1992).

U volně žijících zástupců Platyhelminthes byl vznik vylučovací soustavy popsána u skupin Rhabdozoa, Polycladida a Tricladida (Hartenstein a Ehlers, 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Cardona a kol., 2005). Primordiální buňky budoucích kanálků jsou před započatím formování vylučovací soustavy izolovaně rozptýlené ve vnitřních vrstvách zárodku (Hartenstein a Ehlers, 2000). V průběhu vývoje se postupně seskupují do jednoho páru podlouhlých dutých bilaterálně souměrných útvarů (zřejmě mezodermálního původu), umístěných podélně na bocích těla, v jejichž lumenu jsou přítomny shluky cilií. Během dalšího vývoje se tyto základy protonefridiálních kanálků prodlužují. Na průřezu jsou typicky tvořeny jedinou plochou buňkou, která se obtáčí okolo lumenu a nakonec napojuje sama na sebe prostřednictvím adherens junctions a septate desmosomes (Obr. 9C.). Další vývoj vylučovací soustavy nebyl pozorován. (Hartenstein a Ehlers, 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2000).

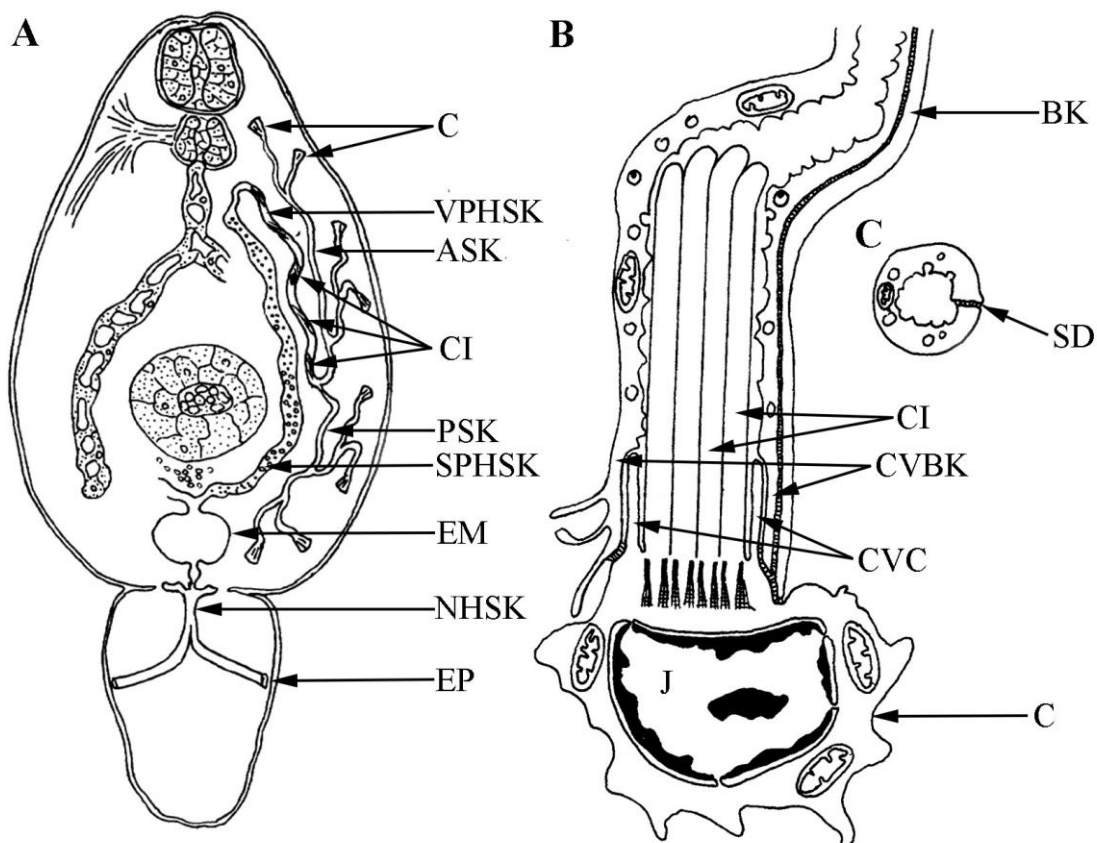
U zástupce skupiny Tricladida (*Schmidtea polychroa*) byla morfogeneze popsána mírně odlišně. Primordiem protonefridií zde byla uskupení malých kulovitých buněk uspořádaných v pravidelných rozestupech podél okraje těla. Zvětšováním, prodlužováním a ohýbáním buněk těchto uskupení se začaly formovat kanálky. Všechna metamericky uspořádaná primordia později vytvořila nezávislou síť jemných kanálků splývajících do jediného mohutného spoje směřujícího příčně do těla zárodku. Na konci každého z kanálků vznikl jeden cyrtocyt. V dalším vývoji se všechny příčné kanálky spojily do jediného páru podélně uspořádaných, tzv. hlavních sběrných kanálků (Cardona a kol., 2005).

U zástupců skupiny Neodermata byl vývoj vylučovací soustavy intenzivně studován zejména u cercárií motolic. Její morfogeneze a končená podoba byly v minulosti považovány za jeden z nejvýznamnějších znaků pro vytvoření přirozeného fylogenetického systému Digenea (Cort, 1917; Faust, 1918; Hussey, 1941; La Rue, 1957). Někteří autoři dokonce zastávali názor, že při znalosti životního cyklu může uspořádání vylučovací soustavy cercárií posloužit jako jediné kritérium fylogenetických studií (Faust, 1932). Redie a sporocysty nezískaly pro fylogenetiku větší význam. Morfogeneze vylučovací soustavy proto zůstala v jejich případě opomenuta.

Stěny kanálků cercárií jsou tvořeny plochými buňkami vzájemně propojenými pomocí septate desmosomes. Jejich lumen je tedy extracelulární (Czubaj a Niewiadomska, 1996). Tělní tekutina je podtlakem hnána přes filtrační aparát tvořený

vzájemně propojenými cytoplazmatickými výběžky cyrtocytu a první buňky kanálku (Obr. 9B.) (Cardell, 1962). Od anteriorních a posteriorních skupin cyrtocytů je tělní tekutina odváděna sběrnými kanálky, které se spojují a vytvářejí jeden pár hlavních sběrných kanálků (Obr. 9A.). Ty vedou exkrety do exkrečního měchýře a následně párovým (např. Fasciolidae) nebo nepárovým (např. Opisthorchiidae) exkrečním pórem ven z těla cercárie (Cort, 1917; Faust, 1932; Hussey, 1943; Kuntz, 1957; Galaktionov a Dobrovolskij, 1987, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003).

U všech druhů motolic, u nichž byla morfogeneze vylučovací soustavy popsána, prochází cercárie ve svém vývoji stádiem se 4 páry cyrtocytů rovnoměrně rozdělenými mezi anteriorním a posteriorním sběrným kanálkům. U některých druhů se z každého z těchto 8 cyrtocytů zakládá budoucí uskupení, v rámci kterého se počet cyrtocytů zdvojnásobí, nebo dále navyšuje (např. Microphallidae) (Galaktionov a Dobrovolskij, 1987, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). U jiných druhů motolic dochází k nárůstu počtu skupin na 10 (např. Opisthorchidae), nebo na 12 (např. Notocotylidae). Počet buněk v rámci těchto skupin může být různý (Odening, 1963, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Galaktionov a Dobrovolskij, 1987, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). Hlavní sběrné kanálky vedoucí exkrety od anteriorních a posteriorních sběrných kanálků se v průběhu embryonálního vývoje v posteriorní části těla cercárie přibližují, až nakonec splynou. V místě tohoto splynutí se vytváří exkreční měchýř (Kuntz, 1950, 1951, 1952).



Obr. 9. Schéma vylučovací soustava motolic (Kuntz, 1957; Czubaj a Niewiadowska, 1996; upravil J. Pankrác). **A** – vylučovací soustava zárodku cercárie motolice *Fasciola gigantica*, **B** – podélný řez cyrtocytem a první buňkou kanálku, **C** – příčný řez buňkou kanálku. ASK – anteriorní sběrný kanálek, BK – buňka kanálku, C – cyrtocyt, CI – cilie, CVBK – cytoplazmatický výběžek buňky kanálku, CVC – cytoplazmatický výběžek cyrtocytu, EM – exkreční měchýř, EP – exkreční pór, J – jádro, NHSK – nepárový hlavní sběrný kanálek, PSK – posteriorní sběrný kanálek, SD – septate desmosomes, SPHSK – sestupná část párového hlavního sběrného kanálku, VPHSK – vzestupná část párového hlavního sběrného kanálku.

4. Metodika

4.1. Získávání materiálu

Materiál použitý v experimentální části diplomové práce:

1. Životní stádia motolice *Fascioloides magna* – vajíčka, miracidia, sporocysty, redie a cercárie.
2. Dospělci ploštěnky *Macrostomum* sp. sloužící jako pomocný organizmus pro osvojení si různých metod značení, zejména značení proliferujících buněk pomocí 5-brom-2'-deoxyuridinu.
3. Dospělci ploštěnky *Macrostomum lignano* zahrnutí do experimentální části diplomové práce za stejným účelem jako *Macrostomum* sp.

4.1.1. Životní stádia *Fascioloides magna*

Životní stádia motolice *Fascioloides magna* je možné rozdělit podle způsobu, jakým byla získávána na stádia z vajíček – miracidia a stádia z plže – sporocysty, redie a cercárie.

Miracidium

První životní stádium motolice *F. magna* nazývané miracidium se líhlo po inkubaci ve vodním prostředí z vajíček produkovaných dospělci v jaterních pseudocystách definitivního hostitele.

Chov definitivního hostitele *F. magna* není v podmínkách PřF UK možný, vajíčka byla proto získávána ze zvířat ulovených v rámci redukce početních stavů spárkaté zvěře. Jednalo se zejména o druh *Cervus elaphus* z oblasti Křivoklátska (Česká republika) a okolí vodní nádrže Gabčíkovo (Slovenská republika). Aby došlo k narušení pseudocyst s dospělci a uvolnění vajíček zde kumulovaných, byla játra infikovaného hostitele nařezána na plátky o tloušťce cca 2 cm. Vajíčka byla poté z pseudocyst vypláchnuta odstátou

vodovodní vodou, později použitou i pro přečišťování vajíček, jejich skladování a inkubaci (viz dále). Výplach jater obsahující kromě vajíček i části jaterní tkáně, krev a metabolické produkty motolice byl nejprve hrubě přečištěn pomocí sít a poté opakovaně promýván a dekantován, dokud nebylo dosaženo čisté suspenze vajíček. Skladování vajíček probíhalo ve tmě při teplotě 4 °C a to nejdéle po dobu 2 let.

Pro získání miracidíí byla vajíčka inkubována po dobu 15–20 dnů ve tmě (bránící miracidíím v líhnutí) při teplotě 25 °C a následně přemístěna na světlo, které indukovalo líhnutí. Aktivně se pohybující miracidia vykazovala pozitivní fototaxi, na základě které byla pomocí světelného zdroje soustředěna na okraji Petriho misky. Zde byla odebírána a okamžitě fixována nebo použita k infekci mezihostitelských plžů.

Sporocysta, dvě generace redií a cercárie

Mezi životní stádia motolice *F. magna* vyvíjející se v mezihostitelském plži patří sporocysta, dvě generace redií a cercárie. Za účelem usnadnění přístupu k modelovému materiálu byl na katedře Parazitologie PřF UK zaveden chov přirozeného mezihostitele, sladkovodního plže *Pseudosuccinea columella* získaného pro experimentální účely v roce 2010 z okolí dolního toku řeky Columbia (Oregon, USA). Plži byli chováni v plastových boxech obsahujících odstátou vodovodní vodu a krmeni třikrát týdně čerstvými listy hlávkového salátu.

Po dosažení velikosti 2–4 mm byli plži experimentálně infikováni. Byli umístěni společně se 2–10 miracidíi do objemu 350 µl odstáté vodovodní vody na dobu 5 hodin za laboratorní teploty. Větší počet miracidíí (10) byl nutný pro nalezení obtížně zachytitelných sporocyst. Za účelem získání sporocyst a redií byli infikovaní plži pitváni pomocí preparačních jehel ve fyziologickém roztoku imitujícím látkové složení hemolymfy plže *Galba truncatula* (dále jen FRGT – fyziologický roztok *G. truncatula*), typického evropského mezihostitele motolice *F. magna*. Při jakékoliv manipulaci se sporocystami a rediemi bylo pro jejich malou velikost nutné pracovat pod stereomikroskopem.

Zárodky redií druhé generace a cercárií

Pomůcky:

- kuchyňská špejle
- nitrocelulózové lepidlo
- minucie

Postup:

Pro studium morfogeneze orgánových soustav bylo vhodné zárodky redií druhé generace a cercárií vypreparovat z těla jedinců předchozí generace (redií první generace a redií druhé generace). Jako nejvhodnější postup se ukázalo odtržení první třetiny těla redie pomocí minucí upevněných nitrocelulózovým lepidlem k potravinářské špejli. Zárodky se poté vlivem vnitřního tlaku samy uvolnily do FRGT, ve kterém byla preparace prováděna. Veškerá manipulace probíhala pro stereomikroskopem.

4.1.2. *Macrostomum* sp.

Sladkovodní ploštěnka rodu *Macrostomum* byla získávána ze stěn akvárií v laboratorních chovech plže *P. columella*. Druhové zařazení nebylo určováno. *Macrostomum* sp. bylo využito k ověření správného postupu u metod, jejichž aplikace na modelu *F. magna* nebyla úspěšná. Konkrétně se jednalo o značení proliferujících buněk prostřednictvím 5-brom-2'-deoxyuridinu (viz kapitola 4.5.3.).

4.1.3. *Macrostomum lignano*

Ploštěnka *Macrostomum lignano* je jeden z nejvýznamnějších modelových organismů pro studium kmenových buněk bezobratlých organismů. Jedná se o mořský herbivorní druh žijící na pobřeží Jaderského moře, který byl podobně jako *Macrostomum* sp. využit pro ověření správného postupu u vybraných metod. Vzorek byl získán v roce 2012 z laboratoře Evoluční biologie, Zoologického institutu, University v Basileji.

Chov

Ploštěnky *M. lignano* byly chovány ve skleněných Petriho miskách (látky uvolňující se ve vodním prostředí ze syntetických polymerů mohou mít negativní vliv na růst a rozmnožování) s nárůstem jejich potravy, řasy *Nitzschia curvilineata* (viz dále). Pro zajištění vhodného prostředí pro růst *N. curvilineata* byly ploštěnky chovány v f/2 (složení viz níže) roztoku v laboratorní teplotě za světelného cyklu světlo:tma – 12:12 hodin.

Roztok f/2

Chemikálie:

- dusičnan sodný (NaNO_3)
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- nonahydrát křemičitanu sodného ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)
- thiamin . HCl
- biotin
- kobalamin
- Na_2 . EDTA (sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové)
- hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- tetrahydrát chloridu manganatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- heptahydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- hexahydrát chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- dihydrát molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Postup:

Roztok f/2 byl připraven postupným rozmícháváním 1 ml roztoků solí I až IV a 0,5 ml vitaminového roztoku ve 2 l uměle připravené mořské vody o koncentraci mořských solí 32 g/l. Roztoky I až III byly připraveny rozpuštěním solí v destilované vodě podle tabulky 2., roztok vitaminů stejným způsobem podle tabulky 3. Pro přípravu roztoku IV bylo 0,88 g Na_2 . EDTA rozpuštěno v 80 ml destilované vody a následně bylo přidáno 0,63 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Po úplném rozpuštění obou zmíněných solí byl postupně přimícháván 1 ml od každého z roztoků solí kovů A až E připravených rozpuštěním v destilované vodě podle tabulky 4.

Roztok f/2 byl poté sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 48 minut a skladován ve vzduchotěsné nádobě. Před každým použitím byl filtrován pro odstranění případných vysrážených solí.

Tab. 2. Vodné roztoky I, II a III pro přípravu roztoku f/2.

	Chemikálie	Koncentrace (mmol/l)	Koncentrace (g/l)
roztok I	NaNO_3	1764,71	150
roztok II	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	72,46	10
roztok III	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	105,63	30

Tab. 3. Vodný vitamínový roztok pro přípravu roztoku f/2.

Chemikálie	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace (mg/l)
thiamin . HCl	1185,96	400
biotin	8,19	2
kobalamin	1,48	2

Tab. 4.: Vodné roztoky solí kovů A, B, C, D a E pro přípravu roztoku IV.

	Chemikálie	Koncentrace (mmol/l)	Koncentrace (g/l)
roztok solí kovů A	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	904,47	179
roztok solí kovů B	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	76,51	22
roztok solí kovů C	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	42,03	10
roztok solí kovů D	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40,05	10
roztok solí kovů E	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24,8	6

Chovné Petriho misky

Po 4 týdnech od naočkování řasy *N. curvilineata* do skleněných Petriho misek obsahujících roztok f/2 se na jejich dně vytvořil rovnoměrný nárost sloužící jako potrava pro

M. lignano. Podmínky pro vznik nárostu byly identické s podmínkami chovu ploštěnek (světlo:tma – 12:12 hodin, laboratorní teplota). Zásobní kultura řasy *N. curvilineata* byla držena ve skleněných zkumavkách obsahujících 0,9% agar rozpuštěný v roztoku f/2 a zatuhnutý pod úhlem 168°.

4.2. Fyziologické roztoky a pufrы

4.2.1. Fyziologický roztok pufrovaný fosforečnany (PBS)

Použití:

PBS byl používán ve všech imunohistochemických metodách značení pro udržení pH vhodného pro správnou funkci proteinů, například protilátek nebo proteinázy K a dále jako rozpouštědlo pro přípravu fixačního roztoků paraformaldehydu.

Chemikálie:

- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- chlorid sodný (NaCl)
- destilovaná voda
- koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl)
- koncentrovaný roztok hydroxidu sodného (NaOH)

Pomůcky:

- pH metr inoLab WTW series

Postup:

Roztoky $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a Na_2HPO_4 připravené v destilované vodě ve shodné koncentraci 0,2 mol/l byly smíchány v poměru 19:81. Vzniklý roztok byl doplněn destilovanou vodou na dvojnásobek svého objemu. Nakonec byl přimíchán NaCl v koncentraci 0,12 mol/l. Kyselost PBS byla upravena koncentrovaným roztokem NaOH ,

případně koncentrovanou HCl, na hodnotu pH 7,4 ověřenou pH metrem inoLab (Vacek, 1988).

4.2.2. Fyziologický roztok podle složení hemolymfy plže

Galba truncatula

Použití:

FRGT byl používán při preparaci a kultivaci životních stádií *F. magna* z mezihostitelského plže (redií obou generací a zárodků redií a cercárií) a jako rozpouštědlo pro přípravu roztoků paraformaldehydu určených k fixaci těchto stádií pro imunohistochemické metody značení.

Chemikálie:

- chlorid sodný (NaCl)
- hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃)
- hydrogenuhličitan draselný (KHCO₃)
- síran amonný [(NH₄)₂SO₄]
- dodekahydrát fosforečnanu sodného (Na₃PO₄ · 12H₂O)
- glukóza (C₆H₁₂O₆)
- hexahydrát chloridu vápenatého (CaCl₂ · 6H₂O)
- hexahydrát chloridu hořečnatého (MgCl₂ · 6H₂O)

Postup:

Rozpuštěním jednotlivých chemikálií v destilované vodě podle tabulky 5. bylo připraveno 800 ml roztoku A a 100 ml roztoku B. Oba roztoky byly poté smíchány a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml (Pullin, 1971).

Tab. 5. Příprava vodných roztoků A a B fyziologického roztoku podle složení hemolymfy plže *Galba truncatula*.

	Chemikálie	Koncentrace (mmol/l)	Koncentrace (g/l)
roztok A	NaCl	38,84	2,27
	NaHCO ₃	22,38	1,88
	KHCO ₃	3	0,3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,38	0,05
	Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O	0,11	0,04
	Glukóza	5,66	1,02
roztok B	CaCl ₂ · 6H ₂ O	27,63	6,05
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	20,57	4,18

4.3. Fixace tkání

4.3.1. Histochemie (fixace)

Použití:

Pro účely histochemického barvení byli fixováni celí jedinci miracidí, sporocyst a redií obou generací v Bouinově roztoku.

Chemikálie:

- Bouinův roztok (Sigma)

Postup:

Tkáně určené pro studium s využitím histochemických metod barvení byly fixovány v Bouinově roztoku 12–24 hodin v laboratorní teplotě. Objem fixáže byl vždy více než 20krát vyšší než objem tkáně.

4.3.1. Imunohistochemie a značení faloidinem konjugovaným s fluorescein izokyanátem (FITC) (fixace)

Použití:

Pro fixaci tkání určených k imunohistochemickému značení a značení faloidinem konjugovaným s FITC byly využívány 4% roztoky paraformaldehydu. K fixaci miracidíí a ploštěnek *Macrostomum* sp. a *Macrostomum lignano* byl používán roztok paraformaldehydu v PBS. V roztoku paraformaldehydu ve FRGT byly fixovány cercárie, redie a zárodky obou těchto stádií.

Chemikálie:

- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT
- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu v PBS
- 7,14% (w/v) roztok MgCl₂ v f/2

Postup:

Tkáně určené pro imunohistochemické metody značení a značení faloidinem konjugovaným s fluorescein izokyanátem (FITC) byly fixovány 12 hodin při teplotě 4 °C nebo 4 hodiny při laboratorní teplotě v 4% (w/v) roztocích paraformaldehydu připravených jeho rozpuštěním ve fyziologických roztocích. Rozpuštění paraformaldehydu probíhalo za stálého míchání po dobu 2 hodin při teplotě 60 °C. V případě redií, cercárií a zárodků těchto stádií se jednalo o FRGT, u *M. lignano* a *Macrostomum* sp. byl použit PBS. Aby se zamezilo smrštění ploštěnek ve fixačním roztoku, byly předtím inkubovány v 7,14% (w/v) roztoku MgCl₂ f/2 v laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Objem fixáže byl vždy nejméně 20krát vyšší než objem tkáně. Pro zachování svých vlastností byl rozpuštěný paraformaldehyd skladován ve tmě při teplotě -20 °C.

4.4. Histochemie

Použití:

Histochemické metody barvení byly použity výhradně za účelem studia rozmnožování motolice *F. magna* v mezihostitelském plži.

4.4.1. Příprava JB-4 tkáňových bločků

Chemikálie:

- 80% etanol
- 96% etanol
- 100% etanol
- JB-4 Plus® Embedding Kit (Polysciences, Inc.)
 - infiltrační roztok
 - zalévací roztok

Postup:

Po fixaci Bouinovým roztokem bylo nutné vymýt přebytečnou kyselinu pikrovou lázněmi v 80% etanolu opakovanými do doby, dokud její uvolňování viditelně neustalo. Dehydratace tkáně nutná pro další zpracování byla provedena vzestupnou etanolovou řadou určenou pro tkáně do velikosti 0,5 cm³ podle tabulky 6. (Vacek, 1988). Pro uzavření tkáně do pryskyřice JB-4 Plus® bylo nutné nejprve ji prosytit infiltračním roztokem připraveným rozpuštěním 0,125 g benzoyl peroxidu v 10 ml roztoku A a to ve třech krocích trvajících 90 minut, 12 hodin a opět 90 minut. Polymeraci pryskyřice a uzavření tkáně do bločku započalo po přidání zalévacího roztoku tvořeného roztokem B smíseným s roztokem A v poměru 1:25. Polymerace pryskyřice byla považována za dokončenou po 24 hodinách v laboratorní teplotě. Jako formičky pro tkáňové bločky byly použity želatinové kapsle.

Tab. 6. Kroky použité k odvodnění tkání před přípravu tkáňových bločků.

Krok	Etanol	Čas
1.	96%	6 hodin
2.	100%	1 hodina
3.	100%	1 hodina
4.	100%	1 hodina

4.4.2. Příprava tkáňových řezů

Chemikálie:

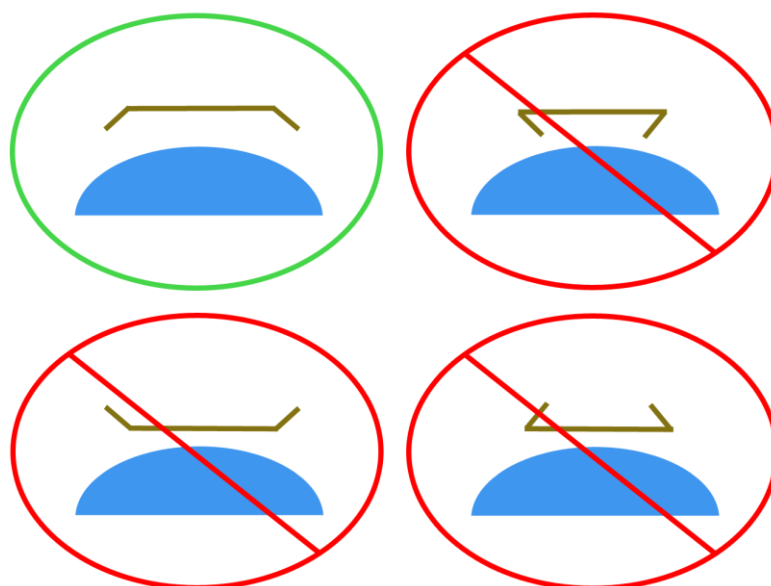
- destilovaná voda

Přístroje:

- mikrotom (SHANDON Finesse ME)
- skleněné nože připravené na Reichert-Jung Knifemaker (ver. 705202)
- podložní skla SuperFrost® Plus (Thermo Scientific)
- jehla (šicí)

Postup:

Tkáňové bločky byly krájeny na řezy o tloušťce 1 μm , nebo 4 μm (v závislosti na množství experimentálního vzorku) s pomocí mikrotomu SHANDON Finesse ME skleněnými noži připravenými na Reichert-Jung Knifemaker. Vzniklé řezy byly pomocí tenké jehly jednotlivě přenášeny z nože na povrch kapky destilované vody umístěné na podložních sklíčkách SuperFrost® Plus. Před krájením byl povrch skleněného nože lehce zvlhčen dechem, aby vlhkost přenesená na řez zabránila jeho zkroucení v průběhu přemísťování. Na jedno podložní sklíčko bylo přeneseno obvykle 6 řezů v přesně daném pořadí nezbytném pro vyhodnocení prostorové morfologie struktur. Aby nedošlo k přehnutí okrajů řezů při položení na vodu, bylo nutné, aby byly jejich okraje vždy namířené pod mírným úhlem směrem k podložnímu sklíčku (Obr. 10.). Protože měly řezy samovolnou tendenci se stáčet, bylo nezbytné přenést je z nože na kapku rychlým a plynulým pohybem. Vyschnutím destilované vody se řezy pevně přichytily k povrchu sklíčka.



Obr. 10. Správné umístění řezu na kapku destilované vody (zeleně) zabraňující přehnutí okrajů řezů.

4.4.3. Barvení a montování tkáňových řezů

Použití:

Za účelem barvení jader a cytoplazmy buněk účastnících se rozmnožování redií byly použity dva způsoby přehledného barvení – Ehrlichův hematoxylin v kombinaci s eosinem a Haidenheinův železitý hematoxylin.

Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma barvenými spočíval v přehlednosti při orientaci v preparátu. Zatímco Haidenheinův železitý hematoxylin vytvářel monochromatické preparáty, kde byla jádra i cytoplazma buněk barvena sytě modře, při barvení Ehrlichovým hematoxylinem v kombinaci s eosinem se cytoplazma buněk barvila růžově a jádra modře. Preparáty obarvené kombinací hematoxylin-eosin proto byly výrazně přehlednější.

Pro tuto práci bylo důležité zachytit detaily struktury jader barvených buněk. V tomto ohledu přinášel Haidenheinův hematoxylin vyšší kontrast mezi barvenými a nebarvenými strukturami. Množství rozeznatelných detailů bylo u obou metod srovnatelné.

Příprava Ehrlichova hematoxylinu

Chemikálie:

- hematoxylin
- 96% etanol
- destilovaná voda
- koncentrovaná kyselina octová
- glycerol
- síran hlinito-draselný ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$)
- jodičnan sodný (NaIO_3)

Postup:

2 g hematoxylinu byly rozpuštěny ve 100 ml 96% etanolu. Do roztoku bylo postupně přimícháváno 100 ml destilované vody, 100 ml glycerolu a 10 ml koncentrované kyseliny octové. Poté byl roztok nasycen $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$. Oxidace hematoxylinu na hematein byla urychlena přimícháním 0,4 g NaIO_3 . Hotový roztok Ehrlichova hematoxylinu byl před použitím přefiltrován přes filtrační papír.

Příprava roztoku eosinu Y

Chemikálie:

- eosin Y
- destilovaná voda
- 96% etanol
- 75% etanol
- koncentrovaná kyselina octová

Postup:

1 g eosinu Y byl rozpuštěn ve 20 ml destilované vody a doplněn 96% etanolem do objemu 100 ml. Vzniklý roztok byl naředěn přimícháním 300 ml 75% etanolu. Nakonec byly přidány 2 ml koncentrované kyseliny octové.

Příprava Heidenhainova železitého hematoxylinu

Chemikálie:

- dodekahydrát síranu železito-amonného ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- destilovaná voda
- hematoxylin
- 100% etanol
- jodičnan sodný (NaIO_3)

Postup:

Pro barvení Heidenhainovým železítým hematoxylinem bylo třeba připravit dva různé roztoky – mořidlo a samotný 0,5% roztok hematoxylinu. Mořidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml destilované vody. Po nasycení roztoku byl nadbytek soli odfiltrován přes filtrační papír. 0,5% roztok hematoxylinu byl připraven rozpuštěním 0,5 g hematoxylinu v 10 ml 100% etanolu a doplněním destilovanou vodou na objem 100 ml. Pro urychlení oxidace hematoxylinu bylo do jeho roztoku přidáno 0,2 g NaIO_3 .

Barvení Ehrlichovým hematoxylinem a roztokem eosinu Y

Chemikálie:

- 1% Ehrlichův hematoxylin
- 0,25% roztok eosinu Y
- 70% etanol
- koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl)
- 96% etanol

Postup:

Podložní sklíčka s řezy byla nejprve na dobu 10 minut ponořena do 1% Ehrlichova hematoxylinu. Nenavázaný hematein (barvicí složka Ehrlichova hematoxylinu) byl odmyván 5 minut pod tekoucí vodovodní vodou. Diferenciace barvení byla provedena 2–3 rychlými ponořeními do roztoku kyselého etanolu připraveného přidáním 3 kapek koncentrované HCl do 100 ml 70% etanolu. Po dokončení barvení hematoxylinem byly řezy barveny 30 sekund v 0,25% eosinu Y. V případě nechtěného přebarvení řezu byl nadbytečný eosin byl odmyt krátkým ponořením do 96% etanolu.

Barvení Heidenhainovým železitým hematoxylinem**Chemikálie:**

- mořidlo (nasycený vodný roztok $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- 0,5% Heidenhainův železitý hematoxylin

Postup:

Podložní sklíčka s tkáňovými řezy byla ponořena na dobu 30 minut do mořidla o teplotě 60 °C. Po krátkém opláchnutí tekoucí vodovodní vodou byla na 15 sekund vložena do roztoku Heidenhainova železitého hematoxylinu o laboratorní teplotě.

Při klasickém postupu jsou tkáňové řezy nejprve přebarveny a následně za pravidelné kontroly pod mikroskopem diferencovány pomocí mořidla. Tento regresivní způsob barvení se ale v případě tkáně uzavřené v pryskyřici JB-4 Plus® neosvědčil. Diferenciace probíhala velmi nerovnoměrně – některé oblasti tkáně byly stále přebarvené, zatímco z jiných byl hematein zcela vyváznán.

Montování tkáňových řezů**Chemikálie:**

- kanadský balzám (Roth)
- DPX médium (Sigma)

Postup:

Po dokončení barvení byla podložní sklíčka ponechána v laboratorní teplotě, dokud řezy zcela nevyschly. Poté byly preparáty zamontovány do kandského balzámu, nebo DPX. Velikost krycího sklíčka byla nejčastěji 22x40 mm.

4.5. Imunohistochemie

Použití:

Imunohistochemické metody značení byly využívány pro studium morfogeneze nervové a vylučovací soustavy redií druhé generace a cercárií a pro značení proliferujících buněk redií obou generací a ploštěnek *Macrostomum* sp. a *Macrostomum lignano*. Značení probíhalo na celých jedincích („whole mount“).

4.5.1. Permeabilizace tkání *Fascioloides magna*, *Macrostomum* sp. a *Macrostomum lignano*

Použití:

Před samotným značením bylo nutné tkáň zprostupnit (permeabilizovat) a zajistit tak přístup protilátky nebo jiné specificky se vážající molekuly k cílovým tkáním. K tomuto účelu byly použity metody chemické a mechanické permeabilizace.

Příprava roztoků pro chemickou permeabilizaci

Použití:

Chemická permeabilizace byla prováděna u všech imunohistochemických značení a při značení F-aktinu faloidinem konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem.

Chemikálie:

- dodecylsírán sodný (angl. sodium dodecyl sulphate – SDS)
- Triton X-100 (Sigma)
- PBS
- proteináza K – *Tritrachium* (Sigma)

Postup:

K chemické permeabilizaci byly použity:

1. roztoky detergentů
2. roztoky detergentů obsahující proteinázu K

Roztok detergentů se skládal z dodecylsírany sodného v koncentraci 0,5 %, nebo 1 % (w/v) v závislosti na metodě značení (viz kapitola 4.5.3. a 4.5.4.) a Tritonu X-100 v koncentraci 0,3 % (v/v) rozpuštěných v PBS. Roztok obsahující proteinázu K byl připraven jejím rozpuštěním v koncentraci 2 µg/ml, nebo 100 µg/ml v PBS obsahujícím 0,5% (w/v) SDS a 0,3% Triton X-100.

Mechanická permeabilizace**Použití:**

Mechanický způsob permeabilizace (společně s chemickým) bylo nutné použít při imunohistochemickém značení tělních struktur redií a cercárií *F. magna*, kde chemická permeabilizace (narozdíl od *M. lignano*) nevedla k účinnému pronikání protilátek. U zárodků redií a cercárií, jejichž velikost činila mechanickou permeabilizaci velmi obtížnou, nebyla použita. Při značení F-aktinu faloidinem konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem nebyla mechanická permeabilizace prováděna, aby nedošlo k porušení svaloviny tělní stěny studovaných objektů.

Pomůcky:

- kuchyňská špejle
- nitrocelulókové lepidlo
- trn kopřivy *Urtica dioica*

Postup:

Mechanicky byla těla redií a cercárií permeabilizována propíchnutím trnem kopřivy *Urtica dioica*. Trn byl nejprve upevněn nitrocelulózovým lepidlem ke kovovému nástavci a poté ke kuchyňské špejli. Permeabilizované objekty byly rovnoměrně propíchnuty ve 100 μ m rozestupech. Použitelnost trnů k mechanické permeabilizaci bylo nutné posoudit mikroskopicky – vhodné byly pouze trny s ostrým zakončením.

4.5.2. Obecná metodika imunohistochemického značení

Použití:

Obecná metodika imunohistochemického značení vycházející z práce Collins a kol. (2011) byla v různých obměnách (viz dále) použita při imunohistochemických značeních tělních struktur redií, cercárií a zárodků těchto stádií. Mezi tyto struktury patřily:

- fosforylovaný histon H3 – buněčné jádro ve fázi mitózy
- bromdeoxyuridin – buněčné jádro po průchodu syntetickou fází buněčného cyklu
- neurotransmitter serotonin – nervová soustava
- neuropeptid FMRFamid – nervová soustava
- acetylovaný α -tubulin – vylučovací a nervová soustava

Po dokončení značení byla tkáň montována do média s obsahem 4',6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI) – fluorescenční sondy specificky značící DNA v buněčných jádrech. Značení DAPI umožňovalo snazší hledání tkáně při fluorescenční a konfokální mikroskopii.

Chemikálie:

- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT nebo PBS
- 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – promývací roztok
- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (2 μ g/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok A

- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (100 µg/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok A2
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok B
- 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin) (Sigma), 0,3% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 (BIO–RAD) v PBS – blokační roztok
- VECTASHIELD® obsahující 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, Inc.)

Pomůcky:

trn *Urtica dioica*

Postup:

Pro vymytí přebytečné fixáže (popis fixace viz kapitola 4.3.1.) z tkání byly provedeny 4 proplachy v promývacím roztoku. Po fixaci bylo nutné učinit tkáň prostupnou pro protilátky. *Macrostomum* sp., *M. lignano* a zárodky redií a cercárií *F. magna* byly permeabilizovány pouze chemicky, redie a cercárie *F. magna* byly fixovány nejdříve mechanicky (viz výše) a až poté chemicky. K chemické permeabilizaci byly použity tři různé roztoky. Prvním krokem permeabilizace byla inkubace tkáně v permeabilizačním roztoku A1 5 minut při teplotě 37 °C. V případě ploštěnek *Macrostomum* sp. a *M. lignano* byl použit permeabilizační roztok A2 s vyšším zastoupením proteinázy K a doba permeabilizace byla prodloužena na 15 minut. Druhý krok představovala permeabilizace v permeabilizačním roztoku B 15 minut v laboratorní teplotě. Před přistoupením k druhému kroku permeabilizace a po jeho dokončení byla tkáň 4x propláchnuta v promývacím roztoku. Pro zablokování míst nespecificky vázajících proteiny byla tkáň inkubována v blokačním roztoku 2 hodiny při laboratorní teplotě. Ve stejném roztoku byly následně rozpuštěny primární a sekundární protilátky. Inkubace s primárními i sekundárními protilátkami probíhala za shodných podmínek – 24 hodin ve tmě při 4 °C. Nenavázané primární protilátky byly odmyvány promývacím roztokem 2 hodiny při laboratorní teplotě. Zatímco koncentrace primárních protilátek se lišila (bude popsána pro jednotlivé případy), sekundární protilátky byly používány vždy v koncentraci 1:400. Po inkubaci se sekundárními protilátkami byla tkáň krátce promyta a zamontována do media VECTASHIELD® s obsahem DAPI.

4.5.3. Metody značení proliferujících buněk redií *F. magna*

Použití:

Ve výzkumu rozmnožování motolic v mezihostiteli byly doposud až na některé výjimky používány pouze histologické metody kombinované se světelnou nebo elektronovou mikroskopií. Za účelem obohacení těchto metod byly v rámci diplomové aplikovány dva různé přístupy ke značení proliferujících buněk redií *F. magna*, mezi které patří i kmenové a „zarodečné“ buňky zodpovědné za produkci zárodků redií a cercárií.

První metoda značí specificky všechny buňky ve fázi mitózy protilátkami namířenými proti fosforylované formě histonu H3. Aby se zvýšila nízká pravděpodobnost záchytu buněk v této fázi cyklu, inkubují se živé buňky v roztocích kolchicinu, který vazbou na tubulin brání vzniku funkčního dělicího vřeténka a tím buňky v mitóze uzavírá.

Druhá metoda využívá zařazení analogu thymidinu (5-brom-2'-deoxyuridinu) do replikující se DNA živých buněk v syntetické fázi buněčného cyklu. Ten je poté možné v buňkách vizualizovat za pomoci protilátek.

Obě metody byly použity pro značení proliferujících buněk redií obou generací a pomocných organismů – ploštěnek *Macrostomum* sp. a *Macrostomum lignano*.

Značení buněk v mitotické fázi buněčného cyklu

Použití:

Mitóza zaujímá pouze zlomek celého životního cyklu buňky. Inkubace živých jedinců (případně celých infikovaných plžů) v roztoku kolchicinu umožnila uzamčení proliferujících buněk v mitotické fázi cyklu a tím i zvýšení pravděpodobnosti jejich záchytu protilátkami namířenými proti fosforylovanému histonu H3, specifickému markeru mitózy. V případě redií *F. magna* byl použit roztok kolchicinu ve FRGT, pro *M. lignano* roztok o shodné koncentraci, ale rozpuštěný v f/2 (*Macrostomum* sp. nebylo do tohoto experimentu zařazeno).

Chemikálie:

- 0,05% (w/v) roztok kolchicinu ve FRGT
- 0,05% (w/v) roztok kolchicinu ve f/2
- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT
- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu v PBS
- 7,14% (w/v) MgCl₂ v roztoku f/2
- 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – promývací roztok
- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (2 µg/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok A1
- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (100 µg/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok A2
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok B
- 1% (w/v) BSA, 0,3% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 v PBS – blokační roztok
- králičí polyklonální protilátky proti fosforylovanému histonu H3 o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku (Millipore)
- kozí protilátky proti králičím IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Postup:

Nejvhodnější doba inkubace redií v roztoku kolchicinu byla 3 hodiny. Při 6 nebo 12 hodinové inkubaci již ke zvýšení četnosti záchytu buněk v mitotické fázi buněčného cyklu nedocházelo. Další postup byl shodný s obecnou metodikou imunohistochemického značení. Koncentrace primární protilátky byla 1:400 (Ladurner a kol., 2000; Collins a kol., 2011; upravil J. Pankrác).

Značení buněk v syntetické fázi buněčného cyklu

Použití:

Metoda značení buněk v syntetické fázi byla aplikována na redie druhé generace *F. magna* a ploštěnky *Macrotomum* sp. a *Macrostomum lignano*. Umožnila získat informaci o tom, zda se buňka dělila (procházela fází replikace) v průběhu inkubace živého jedince s 5-brom-2'-deoxyuridinem. Protože tato molekula není toxická, mohla inkubace trvat i několik dní (viz dále).

Chemikálie:

- 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU) (Sigma) v koncentraci 30 mmol/l ve FRGT
- 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU) (Sigma) v koncentraci 30 mmol/l v odstáté vodovodní vodě
- 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU) (Sigma) v koncentraci 5 mmol/l v roztoku f/2
- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT
- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu v PBS
- 7,14% (w/v) MgCl₂ v roztoku f/2
- 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS
- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (2 µg/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS
- kyselina chlorovodíková (HCl) o koncentraci 0,1 mol/l v PBS
- kyselina chlorovodíková (HCl) o koncentraci 2 mol/l v PBS
- 1% (w/v) BSA, 0,3% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 v PBS
- myší monoklonální protilátky proti BrdU (Sigma) o koncentraci 1:100 v blokačním roztoku
- oslí protilátky proti myším IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Pomůcky:

- skleněná kapilára
- mikroinjektor (Narishige IM 300)

Postup – *Macrostomum* sp. a *M. lignano*:

Za účelem zajištění vstupu analogu thimidinu (BrdU) do proliferujících buněk byly živé ploštěnky *M. lignano* inkubovány 30 minut v roztoku BrdU o koncentraci 5 mmol/l rozpuštěném v f/2 roztoku, *Macrostomum* sp. 30 minut v roztoku BrdU o koncentraci 5 mmol/l rozpuštěném v odstáté vodovodní vodě. Od obecné metodiky imunohistochemického značení se značení proliferujících buněk v syntetické fázi cyklu odlišovalo přítomností dvou kroků vedoucích ke zpřístupnění analogu thymidinu pro primární protilátky. Prvním z těchto kroků zařazených ihned po permeabilizaci byla denaturace DNA inkubací v PBS obsahujícím HCl o koncentraci 0,1 mol/l po dobu 10 minut při teplotě 4°C. Druhým krokem byla denaturace v PBS obsahujícím HCl o koncentraci 2 mol/l po dobu 2 hodin ve 37°C. Rozpad DNA znemožňoval nasednutí DAPI. Montovací médium s jeho obsahem bylo použito pouze jako kontrola úspěšného provedení denaturačního kroku. Koncentrace primárních protilátek byla 1:100 (Ladurner a kol., 2000; Collins a kol., 2011; upravil J. Pankrác).

Postup – *F. magna*:

V případě redií *F. magna* byly za účelem zajištění vstupu analogu thimidinu (BrdU) do proliferujících buněk použity 4 metody:

1. inkubace redií ve FRGT obsahujícím BrdU o koncentraci 30 mmol/l – doba inkubace je omezená životností redií *F. magna* v *in vitro* podmínkách
2. inkubace infikovaných plžů v odstáté vodovodní vodě obsahující BrdU o koncentraci 30 mmol/l – neomezená doba inkubace
3. injekce 20 μ l FRGT obsahujícím BrdU o koncentraci 30 mmol/l injekční jehlou do hepatopankreatu infikovaného plže a jeho následná inkubace v roztoku o stejném složení – neomezená doba inkubace
4. mikroinjikace 10 nl FRGT obsahujícím BrdU o koncentraci 30 mmol/l skleněnou kapilárou do těla redie *F. magna* – doba inkubace je omezená životností redie v *in vitro* podmínkách

Další postup byl shodný jako v případě *Macrostomum* sp. a *M. lignano* (Ladurner a kol., 2000; Collins a kol., 2011; upravil J. Pankrác).

4.5.4. Metody značení tělních struktur redií a cercárií *F. magna*

Serotonin a FMRFamid

Použití:

Ke značení nervové soustavy redií druhé generace, cercárií a jejich zárodků byly použity protilátky namířené proti aktivním složkám nervového systému přítomným v tělech a axonech neuronů. Mezi tyto neuropřenače patřil neurotransmitter serotonin a neuropeptid FMRFamid.

Chemikálie:

- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT
- 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – promývací roztok
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok B
- 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 0,3% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 v PBS – blokační roztok
- králičí sérum proti serotoninu (Sigma) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- králičí sérum proti FMRFamidu (Neuromics) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- kozí protilátky proti králičím IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Postup:

Protokol pro značení nervové soustavy se od obecné metodiky imunohistochemického značení odlišoval v kroku permeabilizace proteinázou K, která nebyla pro její negativní vliv na výsledné značení použita. Permeabilizace roztokem B byla prodloužena z 15 na 20 minut. Koncentrace primárních protilátek byla 1:400 (Collins a kol., 2011; upravil J. Pankrác).

Acetylovaný α -tubulin

Použití:

Ke značení vylučovací soustavy redií druhé generace, cercárií a jejich zárodků byly použity protilátky namířené proti tubulinu přítomnému v ciliích cyrtoctů a ciliích vzestupných částí hlavních sběrných kanálků cercárií. Tubulinová vlákna byla zastoupena i v axonech vybraných částí nervové soustavy a senzorických ciliích redií a cercárií *F. magna*, proto byla tato metoda značení použita i při studiu morfogeneze nervové soustavy.

Chemikálie:

- 4% (w/v) roztok paraformaldehydu ve FRGT
- 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – promývací roztok
- 0,5% (w/v) SDS, proteináza K (2 μ g/ml), 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok A
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100 v PBS – permeabilizační roztok B
- 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 0,3% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 v PBS – blokační roztok
- myší monoklonální protilátky proti acetylovanému α -tubulinu (Sigma) o koncentraci 1:100 v blokačním roztoku
- oslí protilátky proti myším IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (Life Technologies) o koncentraci 1:400 v blokačním roztoku
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Postup:

Postup použitý při značení vylučovací soustavy se nelišil od obecné metodiky imunohistochemického značení. Koncentrace primární protilátky byla 1:100 (Collins a kol., 2011; upravil J. Pankrác).

4.6. Ostatní metody

4.6.1. Značení aktinových vláken tělních struktur redií a cercárií

F. magna

Použití:

Značení aktinových vláken bylo prováděno pomocí fluorescenční sondy tvořené faloidinem kovalentně vázaným s fluorescein isothiokyanátem (FITC), která se specificky váže na F-aktin. Tato metoda byla použita zejména ke studiu morfogeneze svalové soustavy redií druhé generace a cercárií. Díky přítomnosti F-aktinu v cytoplazmatických výběžcích cyrtoctů a ve svalovině sestupných částí hlavních sběrných kanálků a exkrecečního měchýře bylo možné uplatnit toto značení i pro studium vylučovací soustavy.

Chemikálie:

- 4% (w/v) paraformaldehyd ve FRGT
- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 10% (w/v) sacharóza, 0,1% (w/v) NaN_3 v PBS – inkubační roztok
- 200 ng/ml faloidinu konjugovaného s FITC (fluorescein isothiocyanate), 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 10% (w/v) sacharóza, 0,1% (w/v) NaN_3 v PBS
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Postup:

Po fixaci byla tkáň 4krát krátce promyta v inkubačním roztoku a poté přemístěna do inkubačního roztoku s obsahem 200 ng/ml faloidinu konjugovaného s FITC. Značení svaloviny probíhalo 48 hodin ve tmě při teplotě 4 °C. Po navázání faloidinu byla tkáň krátce promyta v inkubačním roztoku a poté zamontována do VECTASHIELD® s obsahem DAPI (Mair a kol., 2000; upravil J. Pankrác).

4.6.2. Tvorba tlustých tkáňových řezů pro konfokální mikroskopii

Použití:

Kvůli počátečním neúspěchům při značení celých jedinců redií a cercárií *F. magna* (později vyřešených díky mechanické permeabilizaci a úpravě postupu při chemické permeabilizaci) byla navržena alternativní metoda, která měla zajistit snadnější přístup chemikálií k cílovým tkáním. Cercárie a redie byly nejprve zality do agarového bločku, který byl dále zpracován a zalit podruhé, tentokrát do parafínového bločku. Po jeho nakrájení na 25 μm tlusté řezy byly tkáně značeny pomocí DAPI a faloidinu konjugovaném s FITC. Pro žádnou z těchto fluorescenčních sond nebyly takto připravené tkáňové řezy dobře prostupné. Po úspěšné aplikaci značení celých jedinců nebyla tato metoda již dále rozvíjena.

Příprava parafínového bločku

Chemikálie:

- 80% etanol
- 2% (w/v) agar ve FRGT
- Ehrlichův hematoxylin
- 96% etanol
- 100% etanol
- xylen
- koncentrovaný roztok parafínu v xylenu (parafín-xylen)
- parafín (Roth)

Postup:

Po fixaci Bouinovým roztokem byla přebytečná kyselina pikrová vymývána z tkání opakovanými lázněmi v 80% etanolu. Redie a cercárie *F. magna* byly uzavřeny do 1 ml 2% (w/v) agaru rozpuštěného ve FRGT, pro lepší manipulaci obarveného 4 μl Ehrlichova hematoxylinu. Další manipulace s tkání uzavřenou v agaru se shodovala s běžným postupem používaným pro přípravu parafínového bločku. Dehydratace a prosycení tkáně

parafínem bylo provedeno vzestupnou etanolovou řadou určenou pro tkáň do velikosti 1 cm³ podle tabulky 7. (Vacek, 1988). Po prosycení agarem byla tkáň uzavřena do čistého parafínu.

Tab. 7. Kroky použité k odvodnění tkáni a jejich prosycení parafínem.

Krok	Chemikálie	Čas
1.	96% etanol	8 hodin
2.	100% etanol	2 hodiny
3.	100% etanol	2 hodiny
4.	100% etanol	2 hodiny
5.	Xylen I	15 minut
6.	Xylen II	15 minut
7.	Xylen III	15 minut
8.	Xylen-parafín	30 minut
9.	Parafín I	3 hodiny
10.	Parafín II	5 hodin
11.	Parafín III	10 hodin

Tvorba tkáňových řezů

Chemikálie:

- destilovaná voda

Přístroje:

- mikrotom (SHANDON Finesse ME)
- žiletkové nože (Thermo Scientific)
- podložní skla SuperFrost® Plus (Thermo Scientific)
- pinzeta

Postup:

Parafínové tkáňové bločky byly krájeny na řezy o tloušťce 25 μm žiletkovými noži s pomocí mikrotomu SHANDON Finesse ME. Řezy byly pinzetou jednotlivě přenášeny do nádoby s destilovanou vodou a odtud sbírány na podložní sklíčka SuperFrost® Plus. Po vyschnutí destilované vody byly pevně přichycené řezy zavodňovány podle Tabulky 8 (Vacek, 1988).

Tab. 8. Kroky použité k zavodňování tkáňových řezů.

Krok	Chemikálie	Čas
1.	Xylen I	5 minut
2.	Xylen II	5 minut
3.	100% etanol	2 minuty
4.	96% etanol	2 minuty
5.	75% etanol	2 minuty
6.	tekoucí vodovodní voda	5 minut

Značení buněčných jader a svalové soustavy redií a cerkárií *F. magna* na tkáňových řezech**Chemikálie:**

- 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 10% (w/v) sacharóza, 0,1% (w/v) NaN_3 v PBS – inkubační roztok
- 200 ng/ml faloidinu konjugovaného s FITC (fluorescein isothiocyanate), 1% (w/v) SDS, 0,3% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA (bovine serum albumin), 10% (w/v) sacharóza, 0,1% (w/v) NaN_3 v PBS
- VECTASHIELD® obsahující DAPI

Postup:

Řezy byly krátce promyty v inkubačním roztoku a poté přemístěny do inkubačního roztoku s obsahem 200 ng/ml faloidinu konjugovaného s FITC. Značení svaloviny probíhalo 48 hodin ve tmě při teplotě 4 °C. Po dokončení inkubace byly řezy krátce promyty

v inkubačním roztoku a poté zamontována do VECTASHIELD® s obsahem DAPI (Mair a kol., 2000; upravil J. Pankrác).

4.6.3. Zpracování dat o morfogenezi tělních soustav

Použití:

Při studiu morfogeneze tělních soustav zárodků redií druhé generace a cercárií bylo vhodné pozorované výsledky vztáhnout k veličině, která koreluje se stupněm jejich vývoje. Díky tomu bylo možné stanovit, na jakém vývojovém stupni se zárodek nachází nezávisle na získaných datech. U volně žijících zástupců Platyhelminthes se k tomuto účelu používá čas – sleduje se doba od snesení vajíčka mateřským jedincem po vylíhnutí juvenilního jedince (Bolaños a Litvaitis, 2009). Tato doba je obvykle vyjadřována v absolutních hodnotách časových jednotek a zároveň i relativně procenty. Redie a cercárie se vyvíjejí uvnitř těla plže, takže není možné tento postup zvolit. Jako vztažnou veličinu jsme proto vybrali délku zárodku po fixaci. Absolutně je tato hodnota udávána v mikrometrech a relativně jako poměr délky zárodku k délce vyspělého stádia. U cercárií byla délka vyspělého stádia stanovena na 1200 μm (od anteriorního okraje tělní části po konec ocásku), u redií druhé generace na 3000 μm . Obě hodnoty vychází z prací Erhardová-Kotrlá (1971) a Swales (1935).

4.6.4. Disociace tkání redií a zárodků redií a cercárií motolice

F. magna

Metody disociace tkání na jednotlivé buňky byly určeny k analýze fluorescenčně značených jader buněk zárodků nebo proliferujících buněk tělní dutiny redií prostřednictvím průtokové cytometrie. Za tímto účelem byly použity dvě metody disociace tkání – disociace roztokem kyseliny octové a glycerolu a disociace roztokem trypsin-EDTA.

Disociace roztokem kyseliny octové a glycerolu

Chemikálie:

- koncentrovaná kyselina octová
- glycerol
- PBS

Postup:

Glycerol, koncentrovaná kyselina octová a PBS byly smíchány v poměru 1:1:13. Inkubace redí a zárodků redí a cercárií *F. magna* probíhala po dobu 2 hodin v laboratorní teplotě (Newmark a Alvarado, 2000).

Disociace roztokem trypsin-EDTA

Chemikálie:

- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- trypsin (Sigma)
- PBS

Postup:

Roztok trypsin-EDTA byl připraven rozpuštěním 250 mg trypsinu ve 100 ml PBS obsahujícím 0,5 mM EDTA. Redie a zárodky redí a cercárií *F. magna* byly inkubovány v 0,25% roztoku trypsin-EDTA ve 37 °C. Míra disociace buněk byla průběžně kontrolována za použití mikroskopu (<http://bioinfoweb.com>).

4.7. Získávání a zpracování obrazového materiálu

4.7.1. Získávání obrazového materiálu

Použití:

Obrazové výstupy histochemických metod barvení byly získávány pomocí světelné mikroskopie. Fluorescenční a konfokální mikroskopie byla použita k vyhodnocení imunohistochemických značení, značení DAPI a znašení faloidinem konjugovaným s FITC.

Pomůcky:

- fluorescenční mikroskop Olympus BX53 vybavený kamerou Olympus DP72
- fluorescenční mikroskop Olympus BX51 vybavený kamerou Olympus U-TV1 X
- konfokální mikroskop Leica TCS SP2
- fluorescenční mikroskop Olympus Cell-R vybavený kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG
- QuickPHOTO MICRO 2.3

4.7.2. Zpracování obrazového materiálu

Pomůcky:

- ImageJ 1.48
- Photoshop 7.0.1 CE
- Zoner Photo Studio 12

5. Výsledky

5.1. Vývoj reprodukčně aktivních stádií *F. magna* v plži *P. columella*

Za účelem získání informací nezbytných pro budoucí sběr materiálu pro další experimenty byl zaznamenáván průběh vývoje motolice *F. magna* v mezipříteli *P. columella* v prvních 25 dnech po infekci. Stádia přítomná v těle plže v pozdějších fázích vývoje již nebyla vhodná pro plnění cílů diplomové práce, proto byl 25. den experiment ukončen.

5.1.1. Sporocysta

Sporocysty byly v těle plže pozorovány od 1. do 19. dne po infekci. První a druhý den (do uvolnění redií první generace z těl sporocyst) byly jedinými stádii *F. magna* přítomnými v těle plže. Jejich jednoznačné určení umožňovala přítomnost celistvé nebo na dvě stejné poloviny rozpadlé oční skvrny (obvykle v přední části těla) a absence hltanu (Obr. 11A., 11B.). Charakteristické bylo i podlouhlé, na obou koncích oválně zakončené tělo dosahující 1. až 3. den po infekci délky 70–180 μm (Obr. 11A., 11B.). Pohyb sporocysty byl typický kontrakcemi těla v příčné a podélné ose. Přesnou lokalizaci sporocyst nebylo ve většině případů možné určit, protože se nacházely volně v tělní dutině mimo tkáň plže. Méně často byly uzavřeny v tkáni nohy a pláště (Obr. 11A.). Od 2. dne byly v tělní dutině sporocyst poprvé zaznamenány vyvíjející se zárodky redií první generace (Obr. 11B.). Polovinu až 2/3 těla sporocysty zaujímal jediný zárodek⁴, výrazně vyvinutější než ostatní. Celkový počet zárodků byl odhadován na 3–5, přesně se jejich počet nepodařilo určit.

⁴ Zárodek je v diplomové práci definován jako jedinec cercárie nebo redie, který dosud neopustil tělo mateřského jedince (sporocysty, redie první generace nebo redie druhé generace).

5.1.2. Redie první generace

Redie první generace byly volně v těle plže nalézány od 3. dne do konce experimentu – 25. den po infekci.

Redie bezprostředně uvolněné ze sporocyst byly v největším zastoupení pozorovány 3. den po infekci. Měly oválný tvar, mírně rozšířený v anteriorní části těla. Hltan se dosud nenapojil na ústní otvor a byl uzavřen v mase buněk uvnitř přední části těla redie (Obr. 11C.). V úrovni hltanu se na povrchu těla zakládal límec. Velikost redií v tomto stádiu byla asi 130 μm a dosud nevykazovaly žádný pohyb.

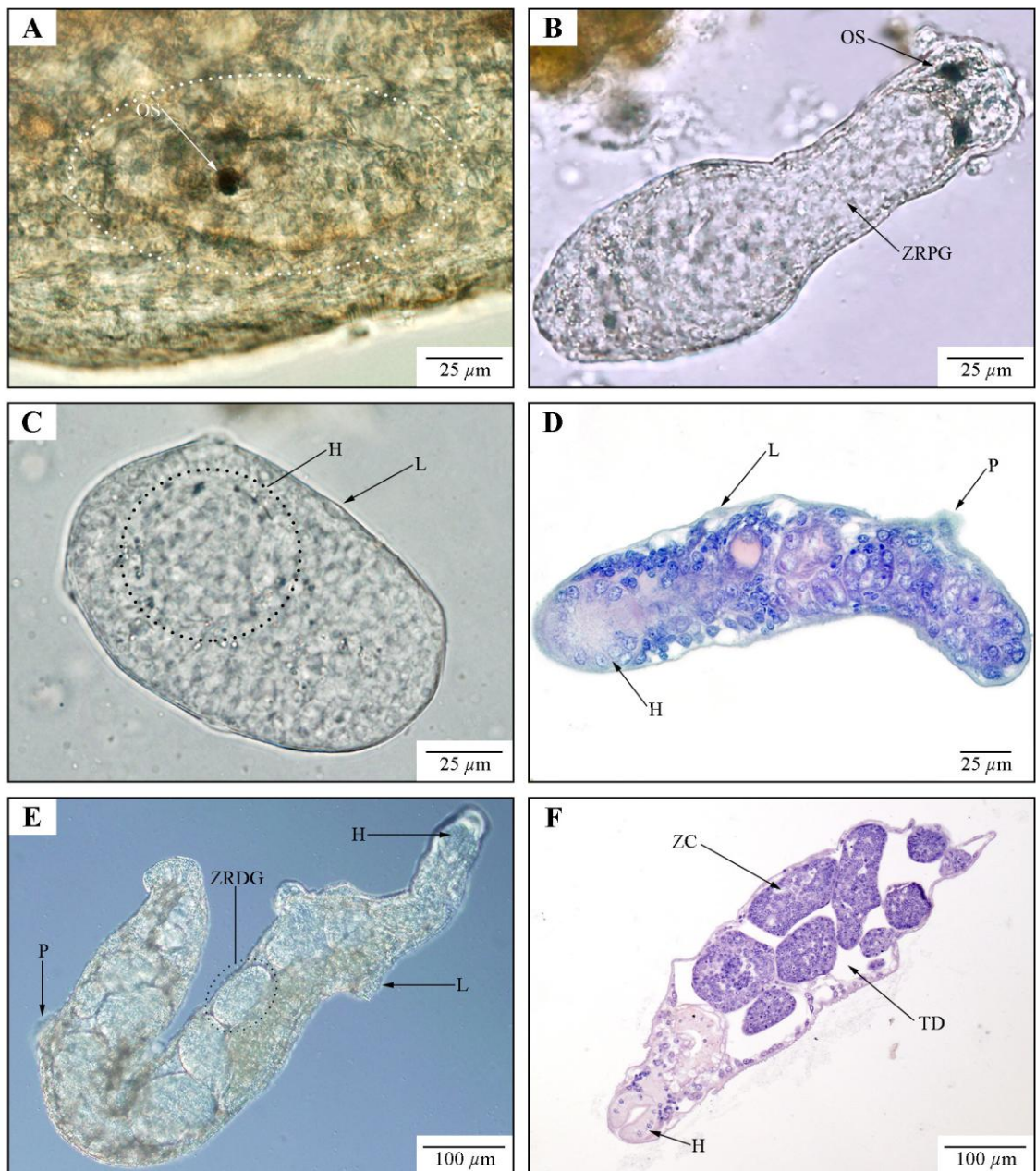
Od 5. dne byly pozorovány redie první generace vybavené vyvinutým límcem a procrusculy. Hltan byl napojen na ústní otvor. Redie byly schopné podélné kontrakce a ohýbání těla (Obr. 11D.).

Do 12. dne po infekci byly kromě redií první generace na pokročilém stupni vývoje běžně pozorovány redie podobající se stavem svého vývoje rediím ze 3. dne po infekci. Méně často pak i redie, u kterých se dosud nezformoval hltan.

Přítomnost vyvíjejících se zárodků redií druhé generace byla poprvé zaznamenána v tělní dutině redií první generace 9. den po infekci. Od 13. dne po infekci byly některé redie první generace nalézány v tkáni hepatopankreatu. Zárodky redií druhé generace přítomné stále v těle mateřských jedinců od 13. dne po infekci disponovaly hltanem, střevem, límcem i procrusculy a vykazovaly uvnitř redií první generace aktivní podélný kontraktivní pohyb i pohyb do stran (Obr. 11E.).

5.1.3. Redie druhé generace

Redie druhé generace se nacházely volně v těle plže od 15. dne po infekci až do ukončení experimentu. Jejich uvolnění z těl redií první generace vedlo přibližně ke zdvojnásobení celkového počtu redií přítomných v těle plžů (např. z 11 na 24). Nejvýznamnějším znakem, na základě kterého byly odlišovány od redií první generace, byla přítomnost zárodků cercárií v jejich tělní dutině (Obr. 11F.). Spolehlivý morfologický znak, který by tyto dvě generace rozlišil v raných stádiích vývoje, se nepodařilo nalézt. Dále byly rozlišovány na základě své lokalizace (viz dále) a doby, která uběhla od infekce plže.



Obr. 11. Životní stádia *F. magna* z mezihostitelského plže. **A** – sporocysta v tkáni pláště plže, **B** – volná sporocysta, **C** – redie první generace bezprostředně po uvolnění ze sporocysty, **D** – mladá redie první generace (hematoxylin-eosin), **E** – redie první generace obsahující zárodky redií druhé generace, **F** – redie druhé generace obsahující zárodky cercárií (hematoxylin-eosin). H – hltan, L – límec, OS – oční skvrna, P – procrusculum, TD – tělní dutina, ZC – zárodek cercárie, ZRDG – zárodek redie druhé generace, ZRPG – zárodek redie první generace.

Do 17. dne po infekci se redie druhé generace nacházely vždy volně uložené v tělní dutině plže. Od 17. dne byla poprvé zaznamenána jejich cílená migrace do tkání hepatopankreatu. V dalším vývoji infekce se v hepatopankreatu nacházela naprostá většina dceřiných redií. Mohly se zde ocitnout dvojím způsobem. Buď se v této tkáni uvolnily z redií první generace (menší část), nebo sem aktivně migrovaly. Redie přítomné v hepatopankreatu měly ve střevě části jeho hnědě zbarvené tkáně.

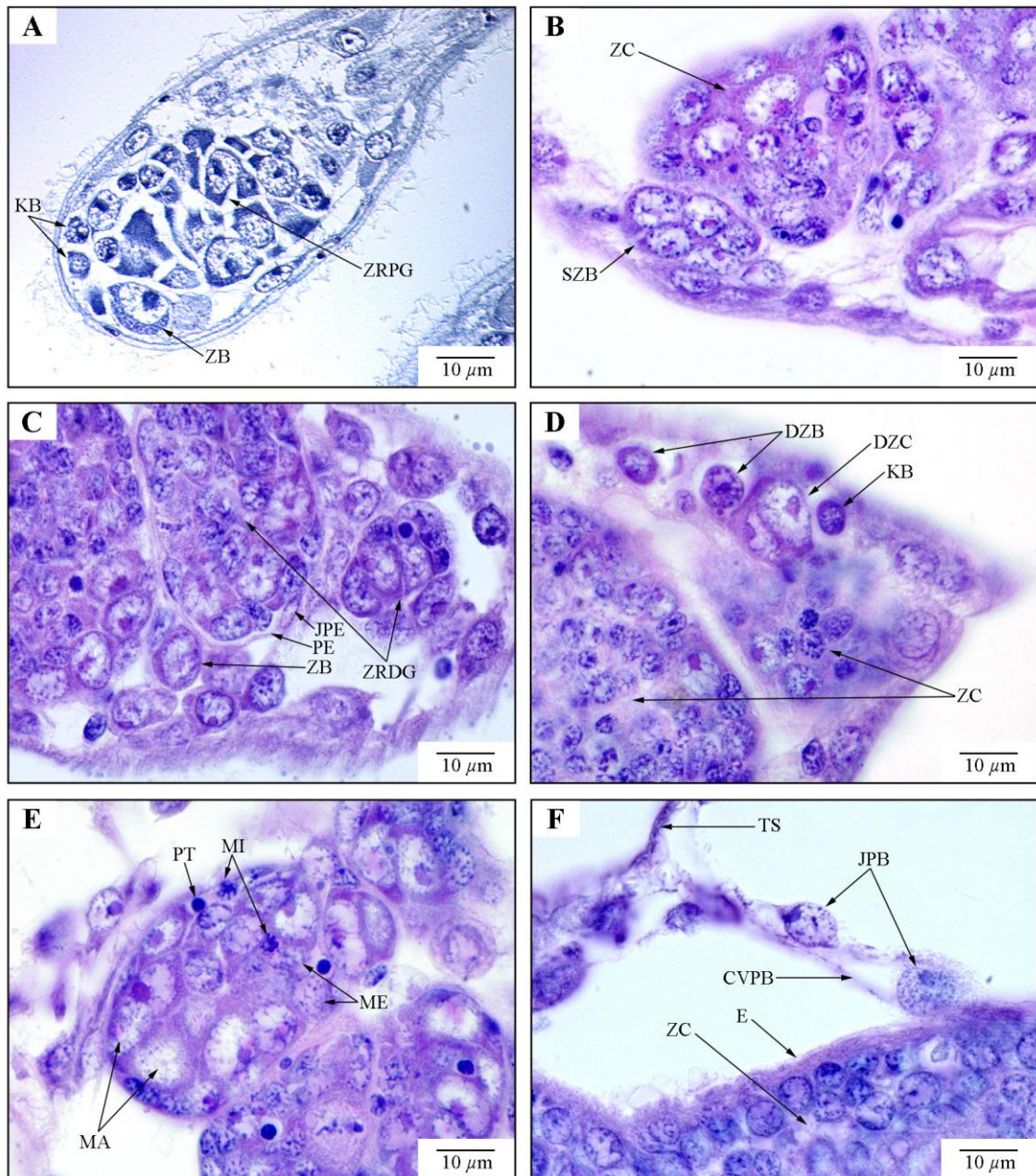
Redie druhé generace opouštěly tělo mateřského jedince na pokročilém stupni vývoje (viz výše). Již během dvou dnů od svého osamostatnění byly v jejich tělní dutině pozorovány zárodky cercárií (Obr. 11F.). První cercárie se uvolnily do těla plže 25. den po infekci.

5.2. Vznik zárodků redií a cercárií *F. magna*

5.2.1. Morfologická charakteristika kmenových a „zárodečných“ buněk *F. magna*

Buňky, odpovídající svými morfologickými znaky „zárodečným“ a kmenovým buňkám, nebo buňkám, které se z kmenových buněk na „zárodečné“ buňky diferencují, byly nalezeny v zadní polovině těla miracidí i redií *F. magna*. V tělní dutině miracidia je bylo nejprve třeba odlišit od zárodku redie první generace, který měl podobu rozvolněného shluku buněk různé velikosti propojených jemnými cytoplazmatickými výběžky (Obr. 12A.).

Kmenové buňky (či „zárodečné“ buňky na začátku diferenciaci) měly kulaté nebo oválné jádro o velikosti 3,7–4,5 μm (Obr. 12A., 12D.). Cytoplazma tvořila pouze zlomek objemu buňky, velikost celé buňky (4–6 μm) byla proto jen o málo větší než velikost jádra. Průměr jádérka byl asi 1,5 μm . Heterochromatin tvořil síť tlustých vláken, které zabíraly významnou část objemu jádra. Populace v rediích měla cytoplazmu uspořádanou do úzkého prstýnku rovnoměrně obklopujícího jádro. Lišila se tím od populace v miracidíích, kde cytoplazma v některých místech mírně odstupovala od jádra a vytvářela krátké výběžky (Obr. 12A.).



Obr. 12. Vznik zárodků redií a cercárií *F. magna*. **A** – zadní polovina těla miracidia obsahující zárodek redie první generace, volnou „zárodečnou“ buňku a volné kmenové buňky (Haidenheinův hematoxylin), **B** – shluk „zárodečných“ buněk v zadní části těla redie druhé generace (hematoxylin-eosin), **C** – zadní část těla redie první generace obsahující volnou „zárodečnou“ buňku a zárodky redií druhé generace obalené primitivním epitelem (hematoxylin-eosin), **D** – zadní část těla redie druhé generace obsahující zárodek cercárie tvořený 2 blastomerami, kmenovou buňku a diferencující „zárodečné“ buňky (hematoxylin-eosin), **E** – buněčné složení zárodku redie druhé generace ve stádiu zárodečné koule (hematoxylin-eosin), **F** – parenchymatické buňky obalující svými cytoplazmatickými výběžky povrch zárodku cercárie; v opačném směru jsou cytoplazmatické výběžky napojeny na tělní stěnu redie druhé generace (hematoxylin-eosin). CVPB – cytoplazmatický výběžek parenchymatické buňky, DZB – diferencující se „zárodečná“ buňka, DZC – dvoubuněčný zárodek cercárie, E – endocysta, JPB – jádro parenchymatické buňky, JPE – jádro primitivního epitelu, KB – kmenová buňka, MA – makromera, ME – mesomera, MI – mikromera, PE – primitivní epitel, PT – pyknotické tělísko, SZB – shluk „zárodečných“ buněk, TS – tělní stěna, ZB – „zárodečná“ buňka, ZC – zárodek cercárie, ZRDG – zárodek redie druhé generace, ZRPG – zárodek redie první generace.

„Zárodečné“ buňky byly na první pohled výrazně větší (Obr. 12A., 12B., 12C.). V závislosti na stupni diferenciacce dosahovalo jejich oválné jádro délky 5–12 μm a délka celé buňky 7–16 μm . Velikost jádérka byla 2–4,3 μm . Cytoplazma tvořila často značný podíl na celkové velikosti buňky. Jádro bylo světlé, vlákna heterochromatinu tvořila zandebatelnou část jeho objemu. Morfologie „zárodečných“ buněk pozorovaných v tělní dutině redií a miracidíí byla obdobná.

Žádná z pozorovaných kmenových a „zárodečných“ buněk redií a miracidíí se nenacházela ve fázi mitózy.

5.2.2. Zárodečné masy v rediích *F. magna*

Přítomnost zárodečné masy ve středně velkých a velkých rediích, tedy v rediích, u kterých již došlo k rozvolnění tělní dutiny a rozestoupení zárodečného materiálu (zárodků a diferencujících se „zárodečných“ buněk), nebyla potvrzena. Zaznamenané shluky „zárodečných“ buněk neobsahovaly pro zárodečnou masu typické vysoké zastoupení kmenových buněk (Obr. 12B.). Kmenové buňky byly naopak nacházeny volně v tělní dutině redií (Obr. 12D.).

Přítomnost zárodečné masy v malých rediích nebylo možné detailně studovat, kvůli neostrým hranicím mezi vznikajícími zárodky a diferencujícími se „zárodečnými“ buňkami (Obr. 11D.).

5.2.3. Raná embryogeneze redií druhé generace a cercárií *F. magna*

Ke vzniku zárodků dělením „zárodečných“ buněk docházelo ve většině případů v okolí tělní stěny v zadní části těla redie. Během svého růstu se zárodky posouvaly anteriorním směrem.

V rediích první i druhé generace byly nacházeny struktury tvořené dvěma buňkami s jádry rozdílné velikosti představující zárodky redií a cercárií po prvním dělení „zárodečné“ buňky (Obr. 12D.). Hranice mezi cytoplazmou těchto buněk nebylo možné odlišit. Těsně sousedící jádra (obalené jakoby společnou cytoplazmou) svým vzhledem

připomínala jádra původní „zárodečné“ buňky. Na místě styku byla obě jádra zploštělá. Vzhled jadérka a uspořádání heterochromatinu byl v obou jádrech obdobný. Jediným znakem odlišujícím blastomery dvoubuněčného zárodku byla rozdílná velikost jejich jader.

V zárodcích redií a cercárií na nízkém stupni vývoje, označovaných pro jejich kulatý tvar jako zárodečné koule („germinal ball“), bylo možné rozlišit blastomery různých buněčných typů, které mohly být dle velikosti klasifikovány na makromery, mesomery a mikromery (Obr. 12E.). Morfologie makromer se shodovala s morfologií diferencovaných „zárodečných“ buněk. Mesomery disponovaly pravidelnějším a kompaktnějším tvarem jádra střední velikosti (6–8 μm) s hustěji uspořádaným heterochromatinem. Mikromery byly zřetelně menšího vzrůstu (velikost jádra byla 3,5–4,5 μm) a jejich heterochromatin se vyskytoval kromě vláken i v intenzivně barvených shlucích. U všech velikostních skupin blastomer byly zaznamenány struktury typické pro mitotickou fázi buněčného cyklu. Kromě blastomer byly v nitru zárodku pozorovány i pyknotická tělíska (zaniklé buňky) (Obr. 12E.). Jednalo se kulaté útvary o průměru 2,5–3 μm , bez jakýchkoliv vnitřních struktur, velmi intenzivně zbarvené hematoxylinem. Mezi buněčným složením zárodečných koulí redií a cercárií nebyl pozorován žádný rozdíl.

Vnější povrch zárodků byl obklopen dvěma typy obalů odlišného původu. Vnitřní syncytiální obal nazývaný primitivní epitel vytvářela cytoplazma plochých, diferencovaných buněk zárodku (Obr. 12C.). Jejich jádra byla dlouhá 6–7 μm a široká 2–3 μm . Vnější mnohavrstevný obal (endocysta) byl tvořen také cytoplazmatickými výběžky buněk, tentokrát se ale jednalo o tzv. parenchymatické buňky představující tělní buňky mateřského organismu (Obr. 12F.). Parenchymatické buňky měly charakteristické kulovité jádro o délce 7–10 μm s jadérkem umístěným v těsné blízkosti jeho stěny. Jejich často dlouhé cytoplazmatické výběžky byly napojeny mimo zárodků i na tělní stěnu redie. Zárodky na pokročilém stupni vývoje se uvolnily z uchycení ke stěně redie a začaly se volně pohybovat po její tělní dutině.

5.2.4. Zánik reprodukčních schopností redií *F. magna*

Zárodky dceřiných jedinců nevznikaly v rediích první a druhé generace po celou dobu jejich života. Ukončení reprodukce bylo možné na histologických řezech pozorovat v

podobě vymizení zárodků na nejnižším stupni vývoje. Tento proces doprovázel i masivní úbytek parenchymatických buněk, který umožnil volný pohyb zárodků v jinak prázdné tělní dutině (Obr. 11F.).

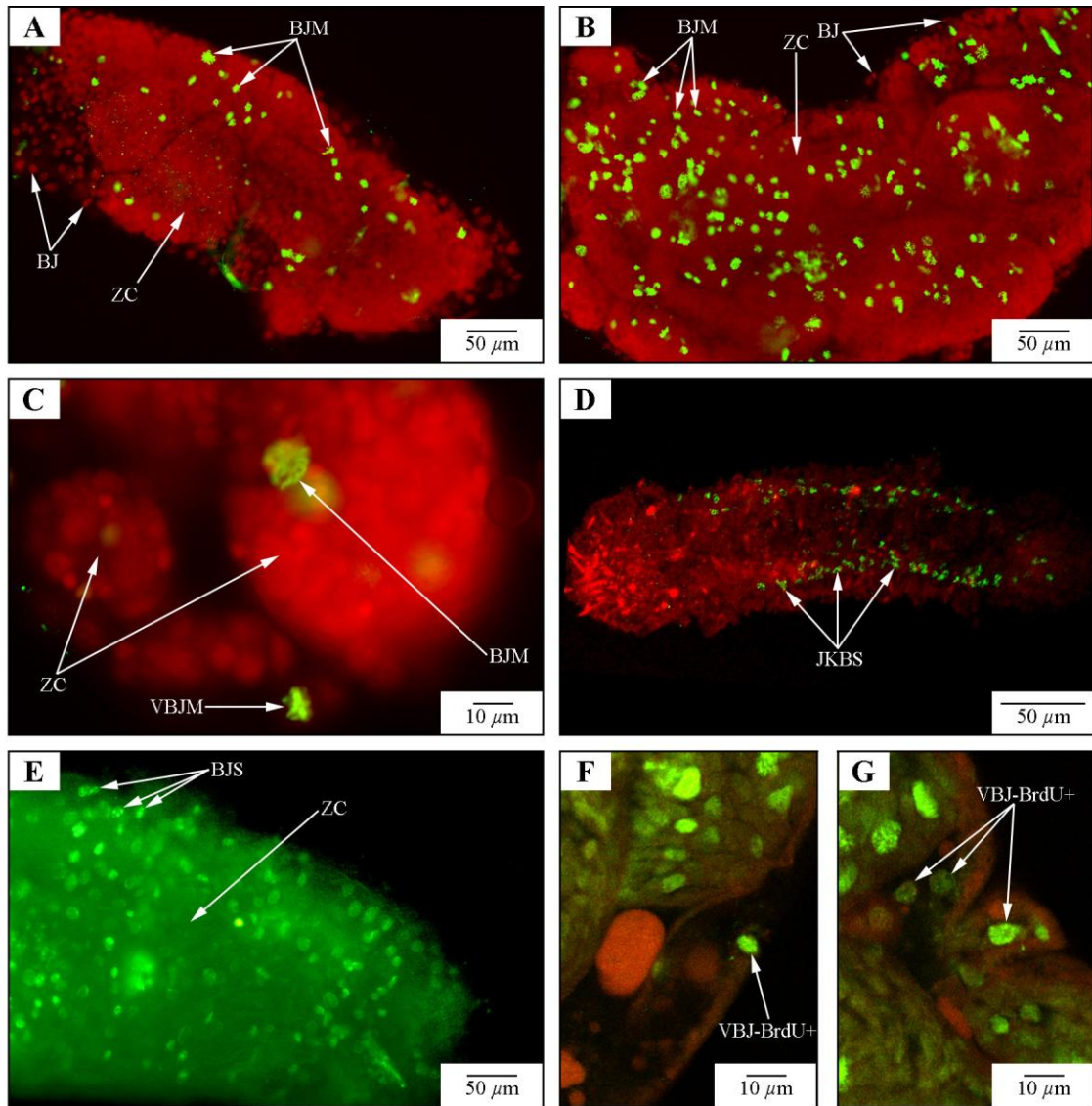
5.2.5. Specifické značení proliferujících buněk

V rámci diplomové práce se podařilo úspěšně specificky značit proliferující buňky dvěma různými metodami. První metodou byly za pomoci analogu thymidinu – bromdeoxyuridinu (BrdU) značeny buňky procházející syntetickou fází buněčného cyklu. Druhá metoda spočívala ve značení buněk ve fázi mitózy protilátkami namířenými proti fosforylovanému histonu H3. Disociace redií a zárodků redií a cercárií za pomoci roztoku kyseliny octové a glycerolu a roztoku trypsin-EDTA byla neúspěšná.

Značení mitotické fáze buněčného cyklu

Značení buněk redií první a druhé generace protilátkami proti fosforylovanému histonu H3 ukázalo nízkou frekvenci buněk v mitotické fázi buněčného cyklu. Všechny značené buňky byly součástí zárodků (Obr. 13A.). Při inkubaci redií nebo infikovaných plžů v roztoku kolchicinu se počet jader zachycených v mitóze navyšoval po dobu 3 hodin (Obr. 13B.). Po 6 a 12 hodinách inkubace zůstávala frekvence značených jader na podobné úrovni a poté se začala opět snižovat.

Záchyt mitózy u buněk mimo zárodky byl velmi vzácný. Při experimentálním značení 84 jedinců redií obou generací se po 3 hodinách inkubace v roztoku kolchicinu podařilo označit buňku mimo zárodek pouze u 3 jedinců. V každém z nich byla jediná (Obr. 13C.). Inkubace redií v roztoku kolchicinu trvající 24 a 48 hodin nevedla ke zvýšení počtu zachycených proliferujících nacházejících se mimo zárodky.



Obr. 13. Specifické značení jader proliferujících buněk. **A** – jádra blastomer zárodků cercárií v mitotické fázi (červená - DAPI), **B** – jádra blastomer zárodků cercárií v mitotické fázi po 3 hodinách inkubace v roztoku kolchicinu (červená - DAPI), **C** – jádro buňky v mitotické fázi volně v tělní dutině (mimo zárodek) v zadní části těla poblíž tělní stěny redie druhé generace (červená - DAPI), **D** – jádra kmenových buněk ploštěnky *Macrostomum lignano* v syntetické fázi buněčného cyklu (červená - autofluorescence) **E** – jádra blastomer zárodků cercárií v syntetické fázi buněčného cyklu, **F** a **G** – jádra buněk redie druhé generace, která v průběhu posledních 2 dnů prošla syntetickou fází buněčného cyklu a zároveň se nachází volně v tělní dutině (mimo zárodek) (červená - autofluorescence). BJ – buněčné jádro, BJM – buněčné jádro v mitóze, BJS – buněčné jádro v syntetické fázi buněčného cyklu, JKBS – jádro kmenové buňky v syntetické fázi buněčného cyklu, VBJ-BrdU+ – buněčné jádro pozitivní na přítomnost BrdU nacházející se volně v tělní dutině redie, VBJM – volně buněčné jádro (mimo zárodek) v mitóze, ZC – zárodek cercárie.

Znační syntetické fáze buněčného cyklu

Inkubací celých jedinců sladkovodních ploštěnek *Macrostomum* sp. a redií obou generací *F. magna* v roztoku BrdU nedocházelo k začlenění BrdU do DNA proliferujících buněk. Naopak u mořského druhu *Macrostomum lignano* bylo při této metodě BrdU do DNA inkorporováno ve všech případech (Obr. 13D.).

Do proliferujících buněk redií *F. magna* BrdU pronikal po mikroinjikaci jeho roztoku do tělní dutiny redie (Obr. 13E.). Druhou úspěšnou metodou byla injikace roztoku BrdU do hepatopankreatu infikovaného plže (Obr. 13F., 13G.).

Metodou značení proliferujících buněk pomocí BrdU se v různých oblastech tělní dutiny, často v blízkosti tělní stěny, podařilo nalézt volně umístěné buňky mimo těla zárodků, která prodělala syntetickou fázi buněčného cyklu.

5.3. Morfogeneze tělních soustav

Při studiu morfogeneze byly úspěšně označeny vybrané struktury 3 tělních soustav redie druhé generace a cercárie motolice *F. magna* – svalové, nervové a vylučovací. Úspěšně se podařilo značit pouze celé jedince redií a cercárií („whole mount“). Do 25 μ m tkáňových řezů stádiu zalitými do agarového a následně do parafinového bločku (viz kapitola 4.6.2.) chemikálie k cílovým strukturám nepronikaly. Hodnota délky zárodků po fixaci se ukázala jako vhodný nástroj pro přibližné stanovení stupně jejich vývoje.

5.3.1. Svalová soustava

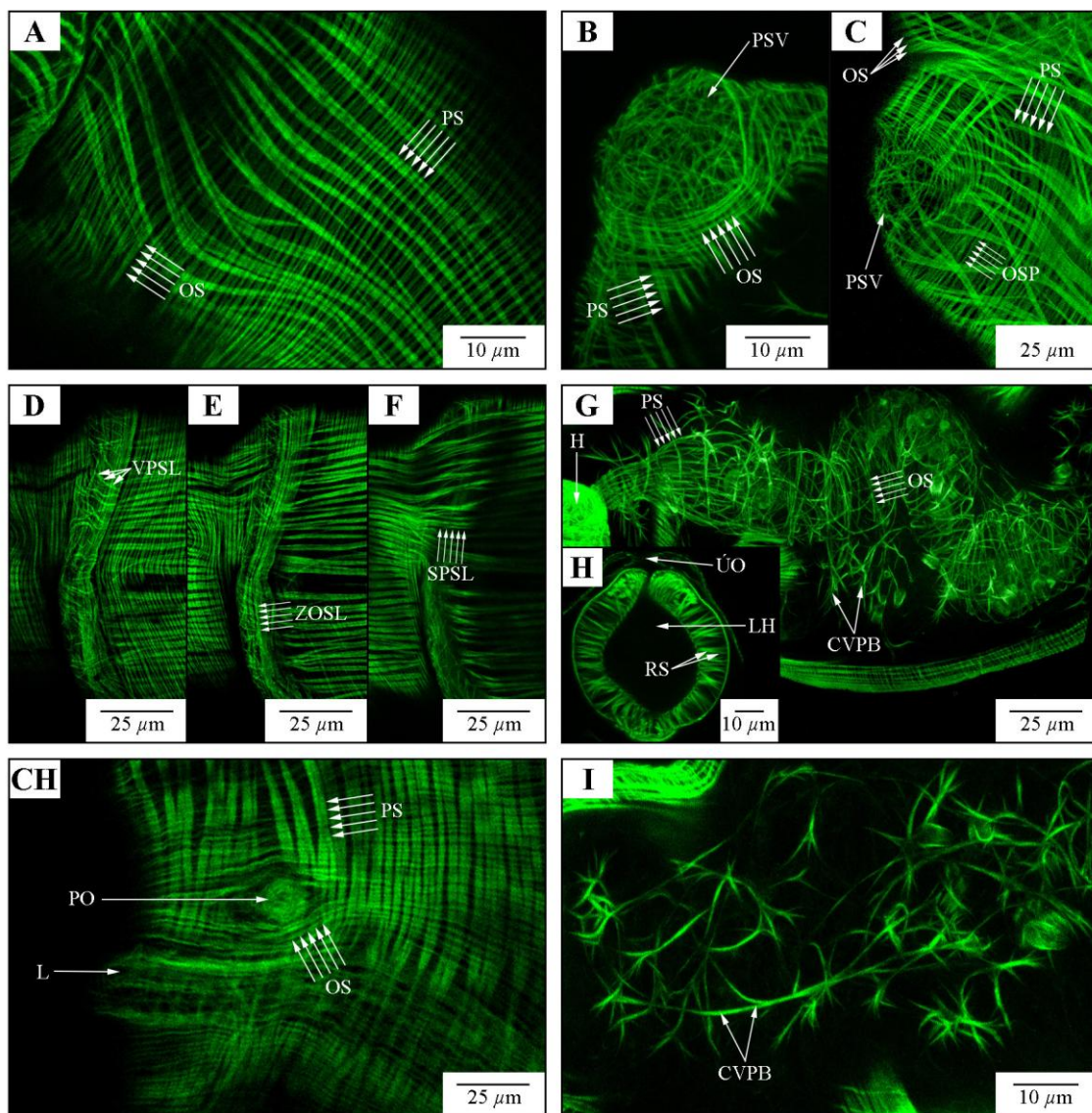
F-aktin, úspěšně značený fluorescenční sondou tvořenou faloidinem kovalentně vázaným s fluorescein isothiokyanátem (FITC), byl přítomen v největším zastoupení v kontraktilních elementech myocytů. Menší koncentrace F-aktinu byla pozorována také v aktinovém cytoskeletu blastomer zárodků na nízkém stupni vývoje, v cytoplazmatických výběžcích tvořících filtrační aparát cyrtocytů a v cytoplazmatických výběžcích parenchymatických buněk redie.

5.3.1.1. Svalová soustava redie druhé generace

Svalovina tělní stěny redií se významně lišila od podoby známé u dospělců motolic. Okružní svalová vlákna byla jemně rozprostřena po povrchu těla (Obr. 14A.). Místy docházelo k jejich rozplétání, propojování, křížení nebo vzájemnému vzdalování a následně opět přibližování. Podélná svalová vlákna redií vytvářela mohutné ploché provazce, které se ještě mnohem častěji než okružní svalová vlákna rozplétaly, křížily a propojovaly (Obr. 14A.). V častých případech ani neprocházely celým tělem redie, rozplétaly se a byly zakončeny v jeho poslední třetině. Přes svou neuspořádanost si však ve většině případů ponechávaly svůj podélný charakter. Šikmá a dorozoventrální svalovina, která u cercárií zajišťuje plochý tvar těla, zcela chyběla.

Redie nemají přísavky. K přichycení jim slouží podtlak vytvořený ústy, procrusculy (pár oblých laterálních výběžků v zadní třetině těla) a koncem těla (vlastní pozorování). Procruscula a konec těla redie se svou strukturou velmi podobaly. Ploché provazce podélné svaloviny se na jejich oblém konci rozplétaly a vytvářely jemnou pleteň (Obr. 14B., 14C.). Rozdíl mezi nimi spočíval zejména v uspořádání okružních svalových vláken, která byla u procruscul na rozdíl od konce těla nezávislá a kolmo uspořádaná na okružní svalovinu těla. Podélná svalovina procruscul byla tvořena na anteriorní straně provazci podélné svaloviny, které se odklonily ze své dráhy napříč tělem (proto byla podélná svalovina tělní stěny posteriorně od procruscul řidší než v jiných částech těla). Posteriorní strana procruscul byla vybavena vlastní nezávislou podélnou svalovinou.

Posledním významným útvarem souvisejícím se svalovinou tělní stěny je límec – příčný povrchový pás vyčnívající nad povrch redie a obkružující její tělo. Jeho specializovaná svalovina byla tvořena třemi vrstvami (Obr. 14D., 14E., 14F.). Střední vrstvu představovala zbytnělá svalová vlákna okružní svaloviny. Vnější a vnitřní vrstvu pak podélné svalové provazce, které se v oblasti límce rovnoměrně dělily na ty, které obcházely okružní svaly z vnější strany (vnější vrstva) a na ty, které procházely pod nimi (vnitřní vrstva). Zatímco vnitřní podélné provazce si zachovávaly stejný vzhled jako na jiných částech těla, vnější se rozplétaly do složité hustě uspořádané sítě jemných vláken.



Obr. 14. Svalová soustava redie druhé generace. **A** – svalovina tělní stěny, **B** – pleteň svalových vláken konce těla, **C** – pleteň svalových vláken procruscula, **D** – vrchní vrstva límce tvořená podélnou svalovinou, **E** – střední vrstva límce tvořená okružní svalovinou, **F** – spodní vrstva límce tvořená podélnou svalovinou, **G** – střevo, **H** – podélný řez hltanem, **CH** – porodní otvor, **I** – cytoplazmatické výběžky parenchymatických buněk v zadní části těla redie. CVPB – cytoplazmatický výběžek parenchymatické buňky, H – hltan, L – límec, LH – lumen hltanu, OS – okružní svalovina, OSP – okružní svalovina procruscula, PO – porodní otvor, PS – podélná svalovina, PSV – pleteň svalových vláken, RS – radiální svalovina, SPSL – spodní podélná svalovina límce, ÚO – ústní otvor, VPSL – vrchní podélná svalovina límce, ZOSL – zbytnělá okružní svalovina límce.

Trávicí soustava redie se skládá z mohutného kulovitého hltanu, na který navazuje nevětvené vakovité střevo (Obr. 14G., 14H.). Struktura svaloviny hltanu odpovídala přísavkám a hltanu cercárií (viz kapitola 5.3.1.3.). Vnější povrch hltanu byl obkroužen jedinou vrstvou velmi hustě a rovnoměrně uskupených svalových vláken. Svalovinu lumenu hltanu se nepodařilo detailněji pozorovat. Na hltan přímo navazovalo střevo, jícen nebyl přítomen. Svalová vlákna stěny střeva tvořila velmi řídkou síť větvících se okružních svalových vláken, která se často podélně stáčela (Obr. 14G.). Podélná svalová vlákna byla pozorována pouze v první třetině. Střevo bylo uchyceno ke stěně redie cytoplazmatickými výběžky parenchymatických buněk (Obr. 14G.).

Mezi ostatní aktinové struktury patřil porodní otvor lokalizovaný posteriorně za límcem (Obr. 14CH.). Jeho vnější papila byla zřejmě vybavena velmi jemným shlukem vláken. Podélná i příčná svalovina tělní stěny tuto papilu obcházely, svěrač pozorován nebyl. V zadní části těla redie vysílaly parenchymatické (somatické) buňky dlouhé cytoplazmatické výběžky s vysokým obsahem aktinu, které vzájemně propojovaly tělní stěny (Obr. 14I.).

„Prsténkové“, vřetenovité ani srpkovité struktury pozorované u cercárií se u redií nevyskytovaly.

5.3.1.2. Morfogeneze svalové soustavy redie druhé generace

Zárodky délky 89–150 μm (3–5 %) ⁵

Nejmenší, úspěšně označený zárodek měl délku 89 μm (3 %) a vejčitý tvar, kde užší konec připadal anteriorní a širší posteriorní straně těla (Obr. 15A.).⁶ Později během vývoje se širším stal naopak anteriorní konec, zárodek byl více protažený a anteriorní konec zploštělý (150 μm , 5 %) (Obr. 15F.). Nejmenší zachycené zárodky neměly dosud vyvinutou svalovinu tělní stěny. Pozorován byl pouze aktinový cytoskelet blastomer a zvýšená přítomnost aktinu v oblasti primordia hltanu (Obr. 15A.). Zintenzivněním produkce aktinu buňkami primordia hltanu se začal utvářet jeho typický sférický tvar

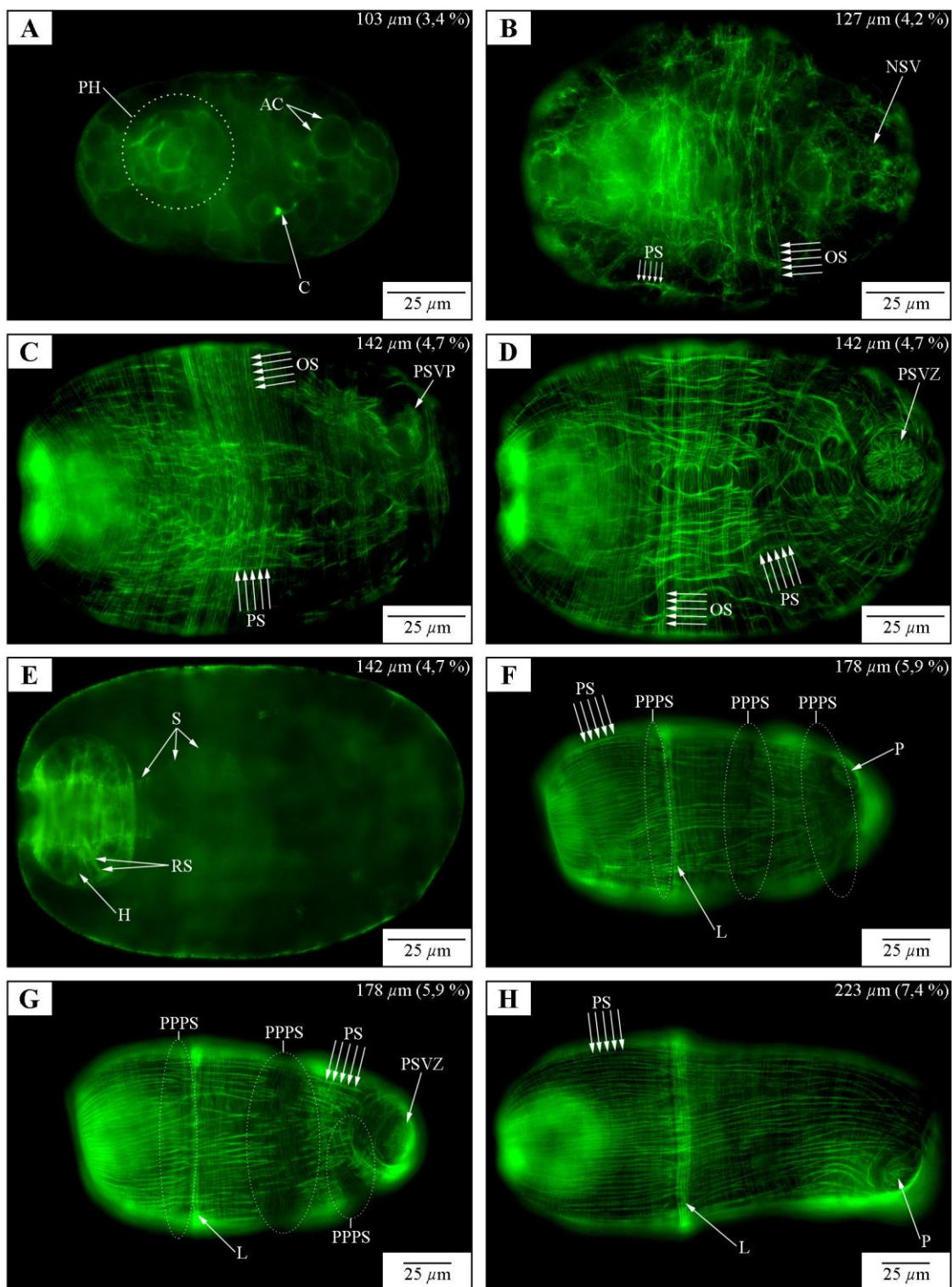
⁵ Procenta uvedená za délkou zárodka vyjadřují poměr jeho velikosti k velikosti plně vzrostlého stádia, viz kapitola 4.6.3.

⁶ Obrázky, na které je odkazováno, představují vždy shodný stupeň vývoje tělní soustavy, v jakém se nacházejí zárodky popsané v textu. Velikost zárodků uvedená v textu se může od velikosti uvedené na obrázku lišit.

s vnitřním lumen. Ústí hltanu bylo vždy místo s největší koncentrací aktinu z celého zárodku (Obr. 15C., 15D.).

První neuspořádané shluky krátkých vláken svaloviny tělní stěny se poprvé objevily u zárodku o velikosti 118 μm (3,9 %). Později začaly přeskupovat do volných pásů krátkých příčných vláken budoucí okružní svaloviny (Obr. 15B.). Vlákná byla na různých místech různě široká, stáčela se a nevedla vždy zcela kolmo na podélnou osu zárodku (122 μm , 4,1 %). Další vývoj okružní svaloviny vedl k prodloužení okružních svalových vláken a jejich rovnoměrnému rozprostření po těle zárodku. Vlákná vytvořila rovné, příčné linky (Obr. 15C., 15D.). V podélném směru zárodku se střídaly pásy okružní svaloviny o tloušťce 4–10 okružních vláken s vyšší koncentrací aktinu, díky nimž měl zárodek pruhovaný vzhled (142 μm , 4,7 %) (Obr. 15C., 15D.). Na dorzální straně těla byl vývoj okružní svaloviny rychlejší než na ventrální.

Krátce po vzniku vláken budoucí okružní svaloviny se objevily velmi volné, široké pásy tandemově i paralelně uspořádaných krátkých podélných svalových vláken na dorzální straně těla (127 μm , 4,2 %) (Obr. 15C.). Pozdější vývoj podélné svaloviny byl velmi pomalý. U zárodků velikosti 142–151 μm (4,6–5 %) se ustálilo uspořádání, které se v prakticky neměnné podobě udrželo až do velikosti 178 μm (6 %). Na dorzální straně v posteriorních dvou třetinách těla se nacházely 2 páry výše popsaných pásů podélných svalových vláken. V první třetině těla a na celé ventrální straně byla podélná svalová vlákna v různé hustotě rozptýlená po povrchu zárodku a postrádala organizaci do vyšších celků (Obr. 15D.). Charakteristické pro podélná svalová vlákna v tomto stádiu bylo, že se často nedržela podélného směru – stáčela se, byla krátká a nerovnoměrně široká – na koncích byla obvykle užší, než ve středu, nepravidelně se navzájem křížila a proplétala. Ve výsledku proto podélná svalovina působila na rozdíl od okružní neorganizovaným vzhledem (Obr. 15C., 15D.).



Obr. 15. Morfogeneze svalové soustavy redie druhé generace. **A** – primordium hltanu a aktinový cytoskelet blastomer zárodku délky 103 μm (3,4 %), **B** – utváření okružní a podélné svaloviny tělní stěny z neorientovaných vláken – ventrální strana zárodku délky 127 μm (4,3 %), **C** – rovnoměrné rozprostření okružní svaloviny tělní stěny na těle zárodku – dorzální strana zárodku délky 142 μm (4,7 %), **D** – rovnoměrné rozprostření okružní svaloviny tělní stěny na těle zárodku – ventrální strana zárodku délky 142 μm (4,7 %), **E** – napojení hltanu na prolomený ústní otvor – zárodek délky 142 μm (4,7 %), **F** – přeměna neuspořádané podélné svaloviny na rovná dlouhá podélná vlákna – dorzální strana zárodku délky 178 μm (5,9 %), **G** – přeměna neuspořádané podélné svaloviny na rovná dlouhá podélná vlákna – ventrální strana zárodku délky 178 μm (5,9 %), **H** – prodloužení podélných svalových vláken – dorzální strana zárodku délky 223 μm (7,4 %). AC – aktinový cytoskelet, C – cytotocyt, H – hltan, L – límeček, NSV – neorganizovaná svalová vlákna, OS – okružní svalovina, P – procrusculum, PH – primordium hltanu, PPPS – přechodové pásmo podélné svaloviny, PS – podélná svalovina, PSVP – pleteň svalových vláken procruscul, PSVZ – pleteň svalových vláken konce těla, RS – radiální svalovina, S – střevo, ÚO – ústní otvor.

V období vývoje délky zárodků 138–142 μm (4,6–4,7 %) došlo k založení většiny struktur známých ze plně vyvinuté redie. Na anteriorní straně bylo pozorováno prolomení ústního otvoru a jeho napojení na hltan, který se posunul více anteriorně (Obr. 15E.). Poprvé byla zaznamenána proximální část vznikajícího střeva (Obr. 15E.). Poblíž posteriorního konce zárodku se objevily základy procruscul v podobě párové oblasti, kterou obcházela vlákna okružní svaloviny (Obr. 15C.). Založen byl i límec zesílením vybraných okružních vláken v 1/3 těla. Na konci těla zárodku vzniklo kruhové pole specializovaných svalových vláken větvících se směrem od středu k okrajům (budoucí konec těla) (Obr. 15D.). V rámci tohoto pole se již nevyskytovaly okružní svaly.

Zárodky délky 150–510 μm (5–17 %)

U zárodku délky 178 μm (6 %) dosáhla okružní svalová vlákna stejně rovnoměrného uspořádání, které bylo pozorováno u plně vyvinuté redie (Obr. 15F., 15G.). Výše zmíněné silněji a slaběji značené pásy vláken vymizely. Protože byla okružní svalová vlákna velmi tenká a slabě značená, nebylo možné sledovat jejich další detaily.

Jak bylo zmíněno výše, první změny v uspořádání podélných svalových vláken oproti stavu ustálenému u zárodků velikosti 151 μm (5 %) došlo až při velikosti 178 μm (6 %). Podélná svalová vlákna se přestala stáčet a byla nyní výrazně mohutnější a řidčeji zastoupená než vlákna okružní (Obr. 15F., 15G.). Na těle zárodku se objevila 3 zřetelná přechodová místa, ve kterých byla podélná vlákna ukončena a začínala vlákna nová (Obr. 15F., 15G.). První se nacházelo anteriorně od límce, druhé na rozhraní druhé a třetí třetiny těla a třetí na úrovni procruscul. Nejrovnoměrnějšího uspořádání dosahovala podélná vlákna v oblasti mezi ústním otvorem a límcem. V pozdějším vývoji se díky vzájemnému propojování vláken v podélném směru začala tato přechodová místa ztrácet (223 μm , 7,4 %) (Obr. 15H.), částečně je však bylo možné rozeznat i u plně vyvinutých redií.

Vlákna disku na konci těla (popsaného poprvé u stádia velikosti 142 μm , 4,7 %) se u zárodku velikosti 255 μm (8,5 %) začala napojovat na podélná svalová vlákna tělní stěny. Podobný scénář byl pozorován i při vzniku procruscul. První základ budoucí jemné pleteně vláken na konci procruscul byl pozorován u zárodků velikosti 178 μm (6 %) (Obr. 15C.). V pozdějším vývoji se vlákna této pleteně napojovala na podélná vlákna tělní stěny (272 μm , 9 %). Nad povrch procruscula poprvé vystoupila u zárodku velikosti 163 μm .

Vystoupení límce nad povrch redie bylo poprvé pozorováno u zárodku velikosti 189 μm (6,3 %). Fluorescenční mikroskopie neumožnila pozorovat stádium, u kterého podélná svalová vlákna poprvé přešla „nad“ zbytnělé okružní svaly límce. Jejich rozpletení nad límcem bylo pozorováno až při velikosti zárodku 497 μm (16,6 %).

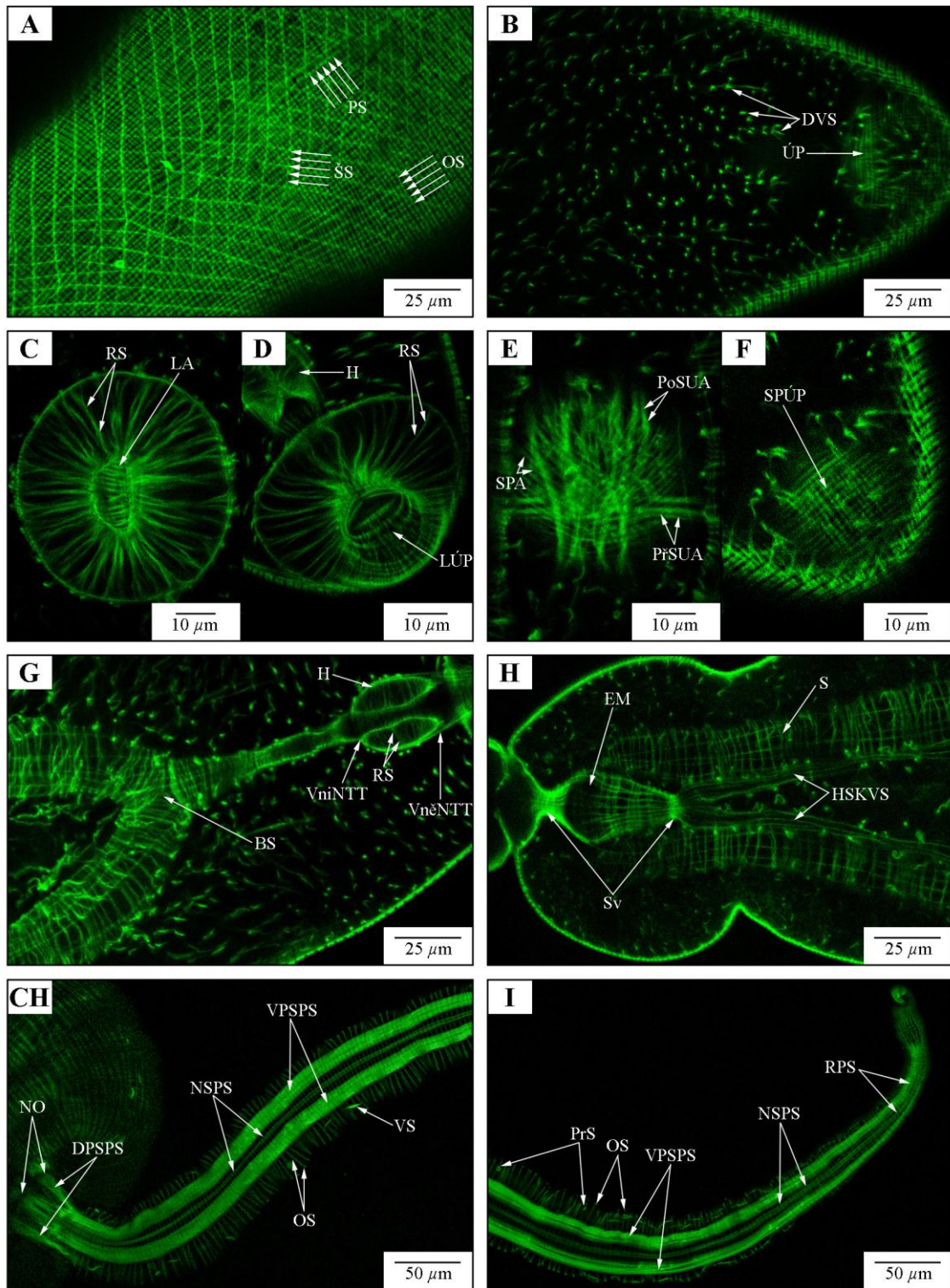
Do velikosti zárodku 140 μm (4,7 %) byly stěny hltanu pozorovatelné pouze v podobě aktinu na okrajích buněk, které ho tvořily. Od této velikosti byl poprvé zachycen vznik a postupné zahušťování radiální svaloviny, která hltanu dodala jeho konečnou podobu (Obr. 15E.).

Popsat morfogenezi svaloviny střeva redie bylo prostřednictvím použitých technik velmi komplikované. V plné délce byly jeho okraje poprvé zachyceny u zárodku velikosti 151 μm (5 %). U zárodku velikosti 297 μm (10 %) se střevo objevilo již ve své konečné podobě.

5.3.1.3. Svalová soustava cercárie

Ve svalovině tělní stěny cercárie byly pozorovány 3 vrstvy svalových vláken – okružní, podélná a šikmá (Obr. 16A.). Okružní svalová vlákna byla uspořádána velmi hustě a na většině těla do pravidelně se opakujících dvojic. Svalová vlákna podélná byla o něco řidší, pravidelně uspořádaná a bez jakéhokoliv vzoru. Nejhrubší byla vrstva rovnoměrně uspořádaných šikmých svalových vláken svírajících s okružní svalovinou úhel 45° (tento úhel však zřejmě závisel na podélném protažení cercárie) (Obr. 16A.). Některá šikmá svalová vlákna místy narušovala rovnoměrné uspořádání, např. náhlým ohnutím a překřížením nebo splynutím se svalovým vláknem sousedním. Zatímco podélná a okružní svalová vlákna obkružovala celé tělo a nebylo pozorováno jejich případné ukončení, šikmá svalová vlákna se zakládala po stranách těla a poté byla na druhé straně těla opět ukončena. Šikmá svalová vlákna na ventrální straně těla byla výrazně kratší a méně vyvinutá.

Dorzální a ventrální strana těla cercárie byly vzájemně propojeny pravidelně rozmístěnými dorzoventrálními svalovými vlákny, mohutnějšími v přední části cercárie (Obr. 16B.). Kromě nich byla pozorována i specializovaná svalová vlákna, která propojovala dorzální stěnu přední části cercárie s ventrální stěnou v oblasti acetabula.



Obr. 16. Svalová soustava cercárie. **A** – svalovina tělní stěny na dorzální straně těla, **B** – dorzoventrální svalovina v přední části těla, **C** – příčný řez acetabulem, **D** – šikmý řez ústní přísavkou, **E** – dorzální povrch acetabula, **F** – dorzální povrch ústní přísavky, **G** – trávicí soustava, **H** – vylučovací soustava, **CH** – ventrální strana proximální části ocásku, **I** – ventrální strana distální část ocásku. BS – bifurkace střeva, DPSPS – dorzální pár shluků podélné svaloviny, DVS – dorzoventrální svalovina, EM – exkretční měchýř, H – hltan, HSKVS – hlavní sběrné kanálky vylučovací soustavy, LA – lumen acetabula, LÚP – lumen ústní přísavky, NO – napojení ocásku, NSPS – nepárová shluk podélné svaloviny, OS – okružní svalovina, PoSUA – podélné svalové uchycení acetabula, PrS – prstýnkovité struktury, PrSUA – příčné svalové uchycení acetabula, PS – podélná svalovina, RPS – rozplétání podélné svaloviny, RS – radiální svalovina, S – střevo, SPA – svalová pochva acetabula, SPÚP – svalová pochva ústní přísavky, Sv – svěrač, ŠS – šikmá svalovina, ÚP – ústní přísavka, VniNTT – vnitřní napojení trávicí trubice, VněNTT – vnější napojení trávicí trubice, VPSPS – ventrální pár shluků podélné svaloviny, VS – vřetenovitá struktura.

Cerkárie *F. magna* byla vybavena dvěma oválnými přísavkami s velmi podobnou strukturou. Obě představovaly výrazné, mohutné orgány vybavené tlustou stěnou vyztuženou silnými vlákny radiální svaloviny (Obr. 16C., 16D.). U ústí obou přísavek byla zhuštěná okružní svalovina zřejmě představující jejich svěrač. Hlavní rozdíl představovalo lumen přísavek. Zatímco u acetabula bylo slepé, u ústní přísavky plynule navazovalo na trávicí trubici. Také výstelka lumenu a svalová vrstva tvořící vnější obal přísavky byly odlišné. Vnější i vnitřní povrch ústní přísavky byl podložen svalovinou, která se až na nepřítomnost šikmých svalových vláken velmi podobala svalovině tělní (Obr. 16D., 16F.). Zdálo se, že svalovina tělní stěny do lumenu ústní přísavky plynule přechází. Lumen acetabula bylo vybaveno vlastní nezávislou okružní svalovinou doplněnou šikmě uspořádanými svalovými vlákny (Obr. 16C.). Ve vnějším obalu acetabula zřejmě okružní svalová vlákna chyběla a byla přítomná pouze šikmě uspořádaná svalová vlákna (Obr. 16E.). Posledním rozdílem mezi acetabulem a ústní přísavkou bylo jejich uchycení. Acetabulum bylo pevně připojeno k ventrální stěně cercárie podélně a příčně uspořádanou svalovinou (Obr. 16E.). Ústní přísavka byla zřejmě uchycena pouze okolními dorzoventrálními svaly (Obr. 16F.).

Trávicí trubice cercárie *F. magna* prochází ústní přísavkou (představuje její vnitřní výstelku), krátce poté obaluje svalnatý hltan, tvoří úzký jícen a nakonec se rozvětňuje na dvě dlouhá slepá střeva (Obr. 16G.). Její stěnu podkládají příčná a podélná svalová vlákna, která jsou zejména v oblasti střeva velmi hrubá a volně uspořádaná. Částečné ukotvení trávicí soustavy bylo pozorováno v podobě blízkce sousedících dorzoventrálních svalů. Jedinou specializovanou svalovou strukturou trávicí trubice byla výše popsaná ústní přísavka a výrazně méně mohutný soudečkovitý hltan, v jehož stěně byla podobně jako u přísavek pozorována radiální svalová vlákna (Obr. 16G.).

Jedinou pozorovanou svalovou strukturou vylučovací soustavy byla podélná a příčná svalová vlákna stěny exkrecečního měchýře a podélná svalová vlákna hlavních sběrných kanálků (Obr. 16H.), která do exkrecečního měchýře po svém napojení plynule přecházela. Okružní svalovina na obou koncích měchýře vytvářela svěrače, v době fixace cercárie zatažené. Podélná svalovina kanálků po napojení na exkreceční měchýř plynule přecházela do jeho stěny (Obr. 16H.).

Nejvýraznější strukturou ocásku plně vyvinuté cercárie byl ventrální a dorzální pár mohutných shluků podélných svalových vláken zasahujících hluboko do jeho nitra (Obr. 16CH., 16I.). Oba páry vycházely z ventrální strany kořene ocásku (dorzální shluky

byl vklíněné mezi ventrální) (Obr. 16CH.). Směrem k terminální části se postupně rozprostíraly po jeho obvodu a do samotného konce ocásku vůbec nevcházely (Obr. 16I.). Mnohem méně výrazné, nepárové shluky podélných vláken, vedly na ventrální a dorzální straně ocásku umístěny mezi výše zmíněné mohutné svazky (Obr. 16CH., 16I.). Jiná podélná svalová vlákna ocásku pozorována nebyla. Příčná svalová vlákna tvořila po celé délce rovnoměrně uspořádané dvojčky (Obr. 16CH., 16I.).

Kromě svalových vláken byl F-aktin detekován i v jiných strukturách. U cercárií se jednalo o útvary tvarem připomínající prstýnky o velikosti 3–6 μm a větvenovité útvary o délce 7–14 μm (Obr. 16CH., 16I.).

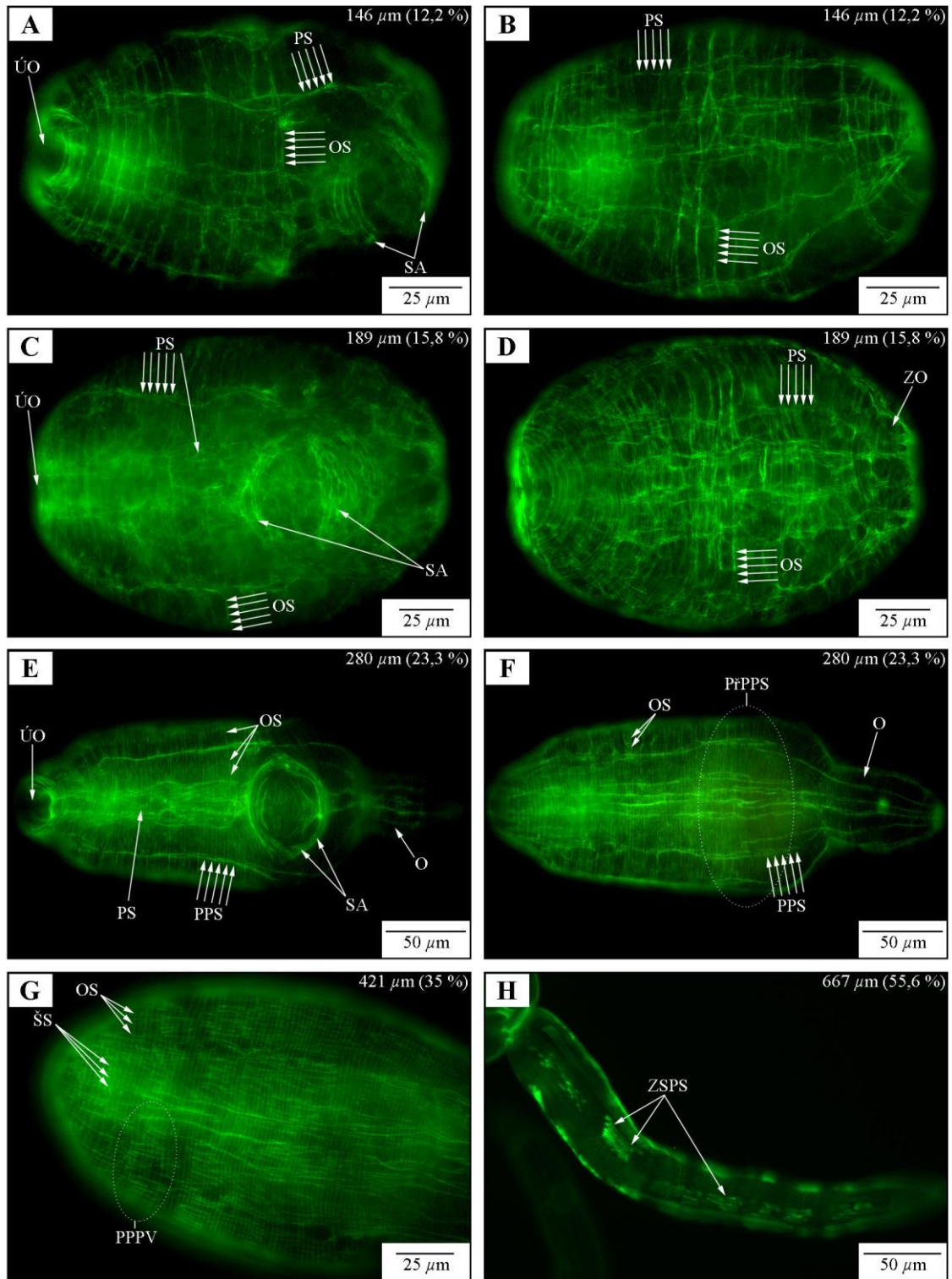
5.3.1.4. Morfogeneze svalové soustavy cercárie

130–300 μm (10,8–25 %)

Nejmenší zárodek cercárie, u kterého se podařilo zachytit aktinové struktury, byl oválného tvaru (na základě tvaru těla nebylo možné určit přední a zadní část), dlouhý 130 μm (9,2 %). Aktin byl pozorovatelný pouze ve svalových vláknech tělní stěny a v primordiu hltanu a acetabula (Obr. 17A., 17B., 18B.). Okružní i podélná svalová vlákna byla uskupena do pásů tvořených volně uspořádanými, krátkými, tenkými vlákny, která se často klikatila (ale nestáčela) a nebyla rovnoměrně široká. Pásky okružní a podélné svaloviny společně tvořily hrubou mřížku ortogonu (Obr. 17A., 17B.).

Pásů podélné svaloviny bylo 5 párů – 2 páry na ventrální straně, 1 pár laterálních, 2 páry dorzálních (Obr. 17A., 17B.). Pásky prostředního páru ventrální strany těla byly umístěny v těsné blízkosti a propojovaly primordium acetabula s ústním otvorem (Obr. 17A., 17C.). Pásů okružní svaloviny bylo 20–25 (přesný počet se nepodařilo zjistit), byly užší a lépe organizované. Na ventrální straně obcházely mohutné primordium acetabula, čímž vznikala mezera v jejich uspořádání dobře pozorovatelná na ventrální i dorzální straně těla (Obr. 17A., 17B.).

Masivní primordium acetabula kruhového tvaru o průměru 40 μm bylo lokalizováno v posteriorní části ventrální strany těla. Jeho okraje byly naznačeny hrubě uspořádanými svalovými vlákny, které jej po obvodu obkružovaly (Obr. 17A., 17C.).



Obr. 17. Morfogeneze svaloviny tělní stěny cercárie. **A** – hrubá ortogonální mřížka tvořená příčnou a podélnou svalovinou – ventrální strana zárodku délky 146 μm (12,2 %), **B** – hrubá ortogonální mřížka tvořená příčnou a podélnou svalovinou – dorzální strana zárodku délky 146 μm (12,2 %), **C** – pravidelné rozptřeni okružní svaloviny po těle zárodku – ventrální strana zárodku délky 189 μm (15,8 %), **D** – pravidelné rozptřeni okružní svaloviny po těle zárodku – dorzální strana zárodku délky 189 μm (15,8 %), **E** – uspořádní podélné svaloviny do podélných provazců – ventrální strana zárodku délky 280 μm (23,3 %), **F** – uspořádní podélné svaloviny do podélných provazců – dorzální strana zárodku délky 280 μm (23,3 %), **G** – vznik šikmé svaloviny a nových vláken podélné svaloviny – dorzální strana zárodku délky 421 μm (35 %), **H** – zakládání mohutných párových shluků podélné svaloviny ocásku – zárodku délky 667 μm (55,6 %). O – ocásek, OS – okružní svalovina, PPPV – příčný pás podélných vláken, PPS – provazec podélné svaloviny, PřPPS – přechodové pásmo provazců podélné svaloviny, PS – podélná svalovina, SA – svalovina acetabula, ŠS – šikmá svalovina, ÚO – ústní otvor, ZO – základ ocásku, ZSPS – základ párového shluku podélné svaloviny ocásku.

Zárodek měl již v tomto stádiu vývoje vchlípený ústní otvor dosud nepropojený s posteriorně umístěným hltanem (Obr. 18A., 18B.). Pozorovatelné byly pouze okraje stěn hltanu a jeho lumen, které se směrem k posteriornímu vyústění rozšiřovalo.

Během dalšího vývoje získala tělní část zárodku tvar podlouhlého trojúhelníku (od této části textu je nutné rozlišovat tělní část zárodku a ocásek), z jehož základny vystupoval ocásek (Obr. 17E., 17F.). Okružní svalová vlákna se rovnoměrně rozprostřela po povrchu zárodku a vyrovnala se do rovných příčných linek (285 μm , 23,8 %) (Obr. 17E., 17F.). Před dokončením tohoto procesu byly na tělní části zárodku pozorovány příčné pruhy 3–6 intenzivněji značených silnějších vláken (Obr. 17C., 17D.). Celý proces se velmi podobal morfogenezi okružní svaloviny redie. Mezera vzniklá kvůli přítomnosti acetabula se omezila jen na jeho těsnou blízkost.

Pásky podélné svaloviny se v průběhu vývoje postupně zužovaly, až se vlákna, která je tvořila, vzájemně zapletla a z každého pásu tak vznikl podélný provazec (280 μm , 23,3 %) (Obr. 17E., 17F.). Výjimkou byl střední pár pásů propojující ústní otvor a acetabulum. Ty se naopak rozvolnily a vzájemně splynuly (Obr. 17E.). V poslední čtvrtině tělní části vzniklo přechodové pásmo, ve kterém podélné anteriorní provazce končily a začínaly provazce posteriorní vedoucí do ocásku (viz dále) (Obr. 17F.). Na dorzální straně těla zároveň došlo k rozdvojení dvou středních párů provazců, takže se jejich celkový počet zvýšil na 6 párů. Šikmá svalovina se dosud neobjevila.

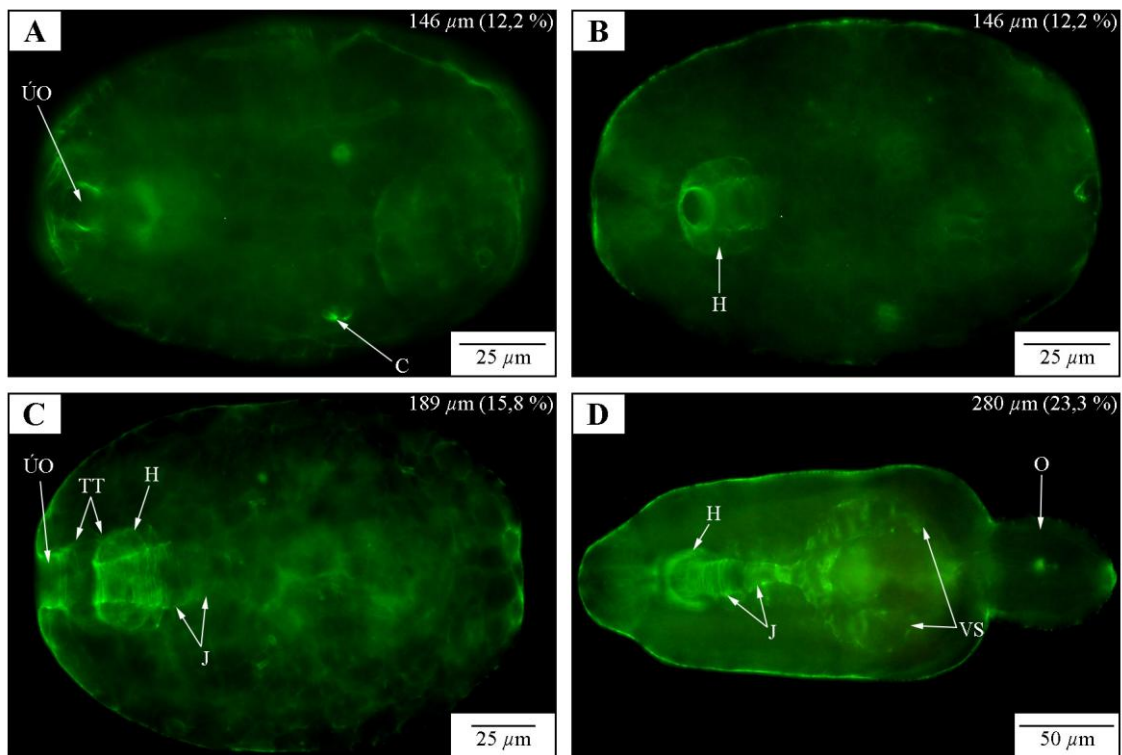
Svalová vlákna obkružující vznikající acetabulum se přeměnila na okružní svalovinu nezávislou na svalovině tělní (Obr. 17E.). Acetabulum se vyvíjelo jako oblý útvar vystrčený ventrálně vně zárodek v poslední třetině jeho tělní části. V anterioposteriorní ose se zploštilo a získalo tak oválný tvar. Primordium ústní přísavky se doposud neobjevilo.

Ve směru od anteroventrálně umístěného ústního otvoru začal v průběhu vývoje vznikat krátký úsek trávicí trubice, který se posléze napojil na hltan z jeho vnější strany (165 μm , 13,8 %) (Obr. 18C.), přerostl jej a vytvořil jeho vnější obal (280 μm , 23,3 %). Propojení mezi ústním otvorem a hltanem se směrem od ústního otvoru rozšiřovalo. U hltanu samotného k žádným výrazným změnám nedošlo, pouze zesílily jeho stěny a v lumenu začala být patrná okružní svalovina.

Anteriorní část jícnu byla poprvé pozorovatelná u zárodku o délce 189 μm (15,8 %). U zárodku o délce 255 μm (21,3 %) byl poprvé zaznamenán jícen v plné délce a zároveň i dvě krátké slepé větve střeva (Obr. 18D.). Jícen navazoval (na rozdíl od úseku

trávicí trubice propojujícího hltan s ústním otvorem) na hltan z jeho vnitřní strany. U tohoto zárodka na tomto stupni vývoje byly také poprvé pozorovány v okolí jícnu první základy dorzoventrálních svalových vláken.

Zadní část zárodka se od délky 184 μm (15,3 %) začala postupně zaškrcovat a protahovat až vystoupila z jeho obrysu a dala tím vzniknout základu ocásku (Obr. 17D.). Jeho původně velmi široký kořen se v průběhu vývoje postupně zužoval, až u zárodka o délce 284 μm (23,7 %) dosáhl užšího průměru, než byla střední část ocásku. Ocáskem probíhalo 6 párů posteriorních podélných provazců vznikajících v přechodovém pásmu v zadní čtvrtině tělní části zárodka (Obr. 17E., 17F.). Jeho okružní svalovina byla uspořádána stejně jemně jako v tělní části. U zárodka délky 300 μm (25 %) dosahoval ocásek délky 65 μm .



Obr. 18. Morfogeneze svaloviny trávicí soustavy cercárie. **A** – prolomený ústní otvor – zárodek délky 146 μm (12,2 %), **B** – hltan bez napojení na ústní otvor – zárodek délky 146 μm (12,2 %), **C** – vznik propojení mezi ústním otvorem a hltanem – zárodek délky 189 μm (15,8 %), **D** – vznik svaloviny jícnu a střeva – zárodek délky 280 μm (23,3 %). H – hltan, J – jícen, C – cyrtocyt, O – ocásek, TT – trávicí trubice, ÚO – ústní otvor, VS – větve střeva.

300–650 μm (25–54,2 %)

Pokročilý vývoj svaloviny tělní stěny cercárií tvořila zejména výstavba podélné a šikmé svaloviny. U okružní svaloviny již k žádným větším změnám nedošlo, bylo pouze pozorováno uspořádání okružních vláken do dvojic, které byly poprvé jasně patrné u zárodků délky 380 μm (31,7 %) (Obr. 17G.). Podélná svalovina tvořená provazci popsanými v minulé kapitole začala být postupně doplňována o krátká (8–45 μm) podélná vlákna a to hlavně na anteriorní polovině (ventrální i dorzální) tělní části zárodku (337 μm , 28 %) (Obr. 17G.). Nejčastěji se zakládala v podobě příčných pásů směřujících od stran ke středu těla tvořenými krátkými podélnými vlákny uspořádanými paralelně vedle sebe. Šířka pásu odpovídala délce vláken, které ho tvořily (Obr. 17G.). V dalším vývoji se podélná vlákna začala objevovat i v posteriorních oblastech, prodlužovala se a propojovala v podélném směru. Podélné provazce postupně zcela zanikly a vlákna přítomná mezi ústním otvorem a acetabulem doplnila nově vznikající podélnou svalovinu. Definitivní struktura podélné svaloviny byla poprvé zaznamenána u zárodku velikosti 563 μm (47 %).

První šikmá svalová vlákna byla zaznamenána v okolí podélné osy ventrální strany v celé délce tělní části zárodku jako krátká vlákna o délce 10–15 μm svírající úhel 45° s okružními vlákny (380 μm (31, 7 %) (Obr. 17G.). V dalším vývoji se prodlužovala, ale výrazněji pouze jejich konec směřující laterálním směrem. Směrem ke středu se prodloužila pouze o tolik, že došlo k jejich vzájemnému překřížení. Až poté, co laterální konec dosáhl k boku těla, se začal intenzivněji prodlužovat i jejich druhý konec (605 μm , 50,4 %).

Dorzoventrální svalová vlákna přítomná původně pouze v okolí jícnu se začala postupně objevovat i v jiných oblastech anteriorní poloviny těla (605 μm , 50,4 %). V posteriorní části těla se utvořila naposledy.

Vývoj obou přichytných orgánů – ústní přísavky a acetabula byl dokončen až v pozdní fázi morfogeneze. Vnější okraj ústní přísavky byl poprvé pozorován u zárodku o délce 337 μm (28,1 %), kdy již její tvar odpovídal konečné podobě tohoto orgánu. Ústní přísavka se vytvořila okolo trávicí trubice (vystylající lumen přísavky) propojující hltan s ústním otvorem. U zárodku délky 563 μm (46,9 %) byly poprvé pozorovány radiální svaly ústní přísavky. Acetabulum se až do zárodku o délce 605 μm (50,4 %) vyvíjelo jako vychlípený orgán. K jeho vchlípení došlo až po vzniku svěrače jeho budoucího ústí zesílením okružních a podélných svalových vláken na bázi vystouplého základu acetabula. V souvislosti se zrychleným růstem posteriorní části cercárie v pozdní fázi morfogeneze

(300–600 μm) se acetabulum posunulo z posteriorní třetiny tělní části výrazně blíže ke středu těla cercárie.

Morfologické změny v trávicí soustavě souvisely zejména s výše zmíněnou zvýšenou rychlostí vývoje zadní části těla zárodku. Bifurkace střeva se posunula anteriorním směrem a jeho větve prodloužily. Zároveň s tím došlo ke zkrácení a ztenčení jícnu, takže se počátek větví střeva přesunul do středu vzdálenosti mezi hltanem a acetabulem.

Vývoj ocásku byl doprovázen jeho rychlým růstem. U cercárie délky 667 μm (46,4 %) ocásek poprvé dosáhl stejné délky jako tělní část – 330 μm . V dalším vývoji byl již vždy delší. U cercárie délky 524 μm (43,7 %) se na ocásku začínají zakládat nová podélná svalová vlákna. Některá jsou výrazně mohutnější a s vyšší koncentrací aktinu než ostatní (Obr. 17H.). Jejich podélným propojením se zakládají ventrální a dorzální páry mohutných shluků podélné svaloviny popsanych v kapitole 5.3.1.3.

5.3.2. Nervová soustava

Morfogeneze serotonergní části nervové soustavy redií druhé generace a cercárií mohla být sledována díky úspěšné aplikaci protilátkového značení namířeného proti serotoninu. Senzorické cilie a axony vybraných částí nervové soustavy se podařilo vizualizovat za pomoci protilátek proti acetylovanému α -tubulinu. Značení neuronů využívajících neuropeptid FMRFamid bylo neúspěšné.

5.3.2.1. Nervová soustava redie druhé generace

Axony serotonergních neuronů vytvářely v redii *F. magna* velmi hrubou, nepravidelnou síť na bocích těla. Některé úseky axonů vedly spíše podélným směrem, jiné naopak spíše příčným směrem (Obr. 19A.). Uspořádání serotonergních axonů do nervových provazců nebylo pozorováno. V anteriorní oblasti redie byla pletěň nervových vláken kvůli vyššímu zastoupení těl neuronů a jejich výběžků komplikovanější (Obr. 19B.). Posteriorně od hltanu se nacházelo neuropile hlavového ganglia tvořené axony obkružujícími začátek

střeva (Obr. 19B.). V redii bylo zjištěno celkem 6 párů serotonergních neuronů (Obr. 19C.). První 4 páry byly přítomny v řadě za sebou v oblasti mezi koncem hltanu a límcem. Pátý pár se nacházel na hranici první a druhé třetiny těla a poslední na úrovni procruscul. Vzácně se podařilo označit i tělo neuronu, který do typického uspořádání serotonergní nervové soustavy nepatřil (Obr. 19C.). Z jediného těla neuronu vycházelo často až 5 axonů do různých směrů, kde se větvyly a případně napojovaly na jiné, sousedící axony (Obr. 19D.). Těla neuronů byla díky vysoké koncentraci serotoninu velmi jasně značená. Měla buď oválný, nebo naopak spíše protáhlý tvar a délku 7–11 μm (Obr. 19B.).

Vysoké zastoupení jemných axonů serotonergních neuronů bylo zjištěno ve svalových orgánech – hltanu, límci a procrusculech. V procrusculech a v límci nebyla pozorována žádná pravidelnost jejich uspořádání. Axony hltanu vycházely z neuropile a ve velmi pravidelných rozestupech obkružovaly vnější stranu jeho svalnaté stěny směrem k ústnímu otvoru (Obr. 19E.).

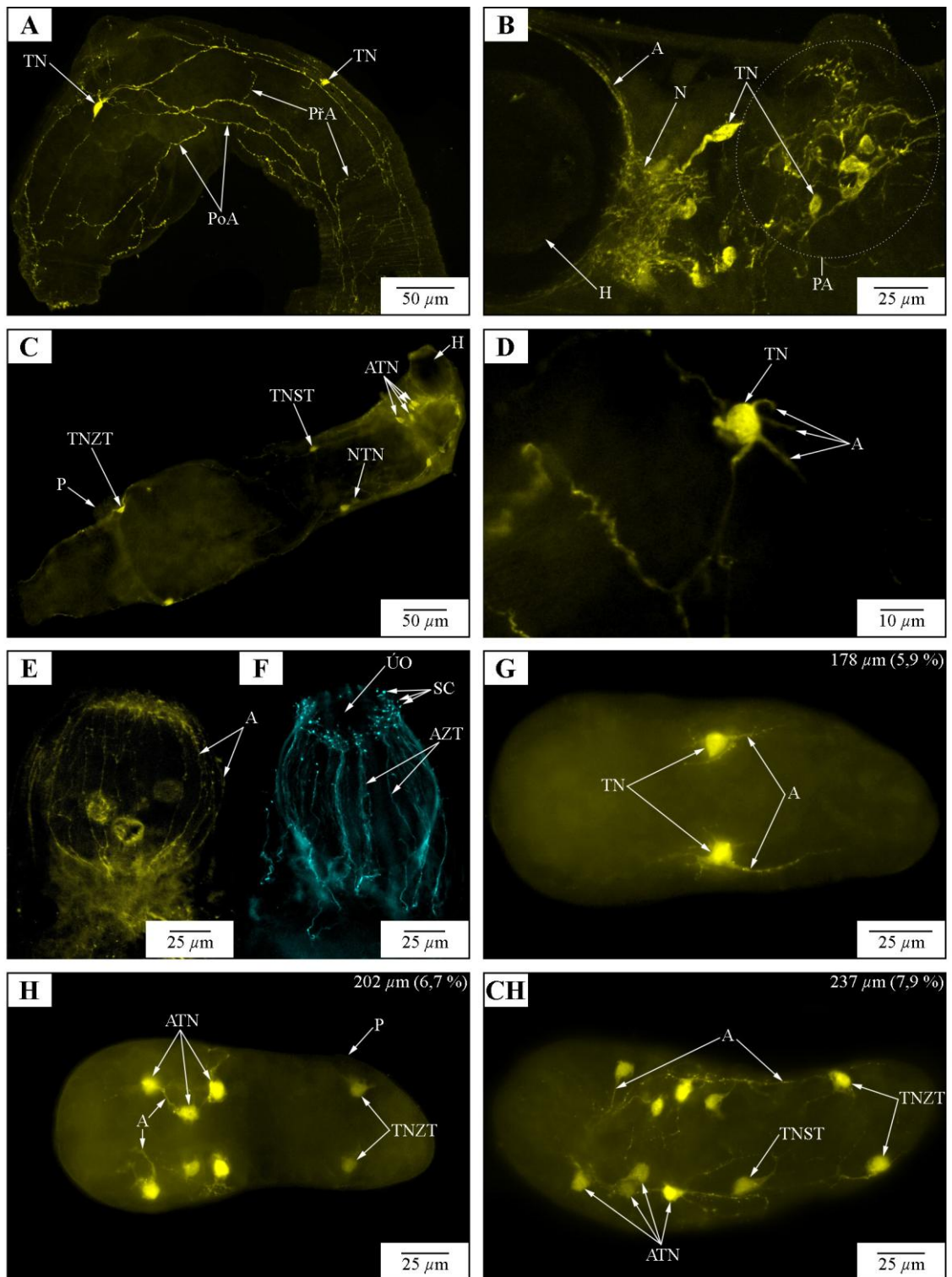
Značení protilátkami namířenými proti acetylovanému α -tubulinu odhalilo podél vnější stěny hltanu kromě již zmíněných serotonergních axonů také široké svazky všech axonů, které byly vyztuženy tubulinovými vlákny (Obr. 19F.). Stejně jako serotonergní axony vycházely od posteriorního konce hltanu (pravděpodobně z neuropile) směrem k ústnímu otvoru.

Poslední nervovou strukturou, pozorovanou u redií byly senzoričké cilie zachycené opět díky obsahu tubulinových vláken a to zejména okolo ústního otvoru a občas i na jiných místech přední části těla redie, kde se napojovaly na axony procházející okolo hltanu (Obr. 19F.).

Metodu značení nervové soustavy využívající protilátky namířené proti FMRFamidu se nepodařilo úspěšně aplikovat.

5.3.2.2. Morfogeneze nervové soustavy redie druhé generace

Serotonergní část nervové soustavy redie druhé generace se zakládala v podobě jednoho páru neuronů po stranách těla zárodku, ze kterého vystupovaly krátké axony anteriorním a posteriorním směrem (150 μm , 5 %) (Obr. 19G.). Počet axonů vystupujících z obou neuronů se v průběhu vývoje zvyšoval, axony se prodlužovaly a některé z nich větvyly (172 μm , 5,7 %).



Obr. 19. Nervová soustava redie druhé generace a její morfogeneze. **A** – podélné a příčné axony serotonergních neuronů na boční straně těla, **B** – neuropile obkružující střevo v sousedství hltanu; pleteň axonů serotonergních neuronů v anteriorní části těla redie, **C** – uspořádání 6 párů těl serotonergních neuronů v těle redie; přítomnost nepárového těla neuronu nepatřícího do standardního uspořádání serotonergní nervové soustavy, **D** – oválný typ serotonergního neuronu, ze kterého vystupuje 5 axonů, **E** – serotonergní axony na obvodu hltanu, **F** – axony zpevněné tubulinovými vlákny na obvodu hltanu; senzorké cilie vyskytující se zejména v okolí ústního otvoru, **G** – přítomnost první vzniklého páru těl serotonergních neuronů v zárodku délky 178 μm (5,9 %), **H** – přítomnost tří párů těl serotonergních neuronů v anteriorní oblasti a jednoho páru na úrovni procrusculu u zárodku délky 202 μm (6,7 %), **CH** – přítomnost konečného počtu těl serotonergních neuronů na jedné straně těla zárodku délky 237 μm (7,9 %). A – axon, AZT – axon vyztužený tubulinovými vlákny, ATN – těla anteriorních serotonergních neuronů, H – hltan, N – neuropile, NTN – nepárové tělo neuronu, P – procrusculum, PA – pleteň axonů, PoA – podélný axon, PFA – příčný axon, SC – senzorké cilie, TN – tělo neuronu, TNST – tělo serotonergního neuronu středu těla, TNZT – tělo serotonergního neuronu zadní části těla, ÚO – ústní otvor.

Následný vývoj byl velmi rychlý. Anteriorně od výše popsaného páru neuronů se objevily dva nové páry. Třetí nově vzniklý pár byl založen ve třech čtvrtinách těla zárodku na úrovni procruscul (192 μm , 6,4 %). Vyvíjející se redie tedy v tomto stádiu vývoje disponovala 4 páry serotonergních neuronů – skupina 3 párů byla lokalizována v anteriorní polovině těla a jeden pár v zadní části těla zárodku (Obr. 19H.).

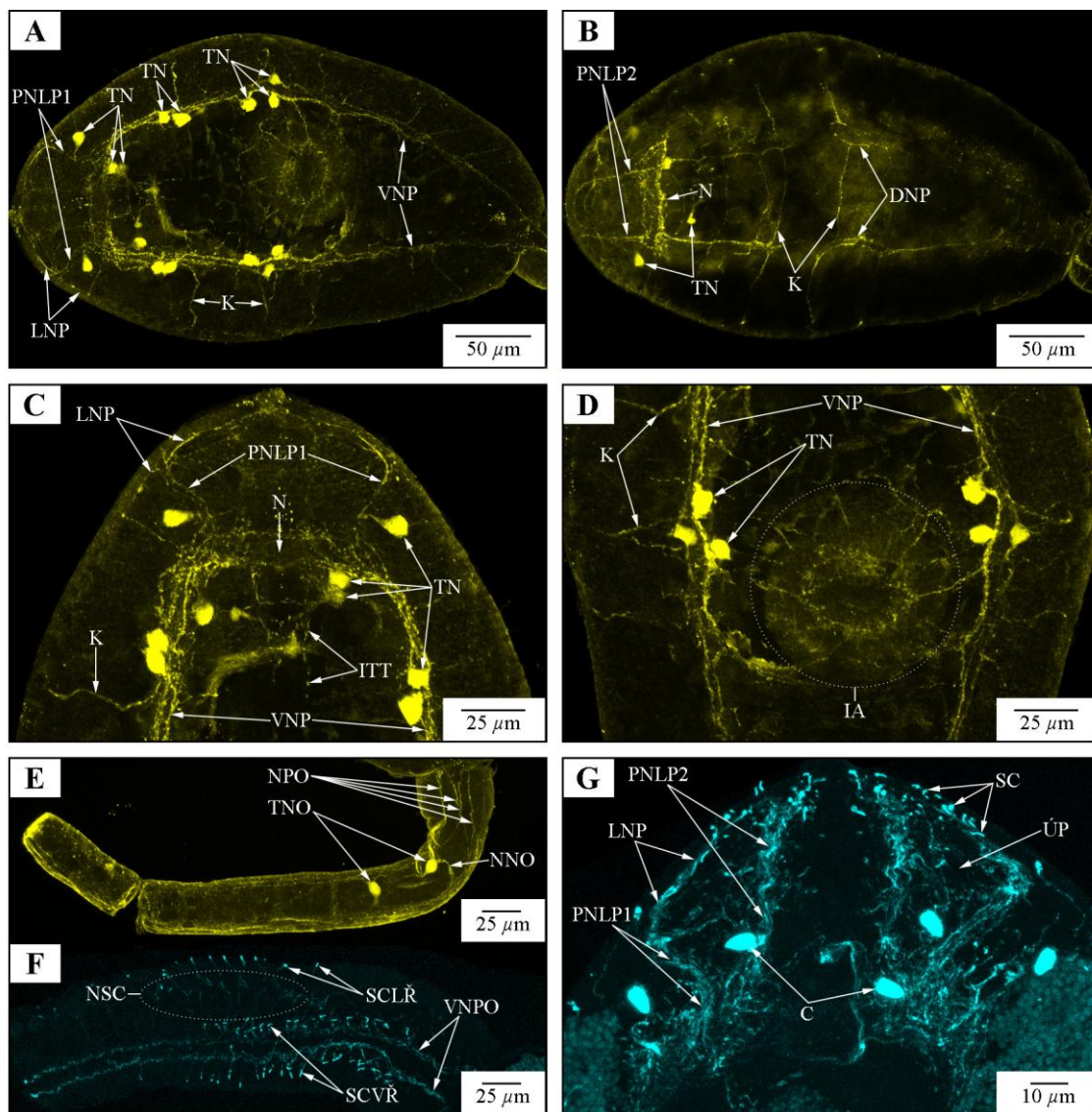
Velikost těl nově pozorovaných neuronů byla vždy stejná jako u těch již dříve vzniklých. Rozpoznat je bylo možné díky slabšímu značení, které bylo pravděpodobně způsobeno nižším zastoupením serotoninu (Obr. 19H.). V dalším vývoji se intenzita jejich značení vyrovnala. Každý nový pár neuronů se vždy zapojil do podélné sítě axonů původních neuronů přítomné na obou stranách těla. Existence příčných propojení mezi těmito serotonergními uskupeními nebyla v této fázi vývoje prokázána (192 μm , 6,4 %).

Poslední dva zbývající páry neuronů byly poprvé pozorovány u stádia o délce 237 μm (7,9 %). Jednalo se zprv o pár, který doplnil výše popsanou anteriorní skupinu (tvořenou nyní 4 páry) a zadruhé pak o pár neuronů, který vznikl v oblasti mezi anteriorní skupinou a posteriorním párem (Obr. 19CH.). Vývoj serotonergní nervové soustavy nebyl na obou stranách těla zárodku stejně rychlý. V zárodku této velikosti bylo zároveň poprvé pozorováno neuropile a z něj vycházející vlákna lemující vnější povrch hltanu směrem k ústnímu otvoru (z Obr. 19CH. nejsou tyto struktury viditelné).

Axony vyztužené tubulinovými vlákny byly poprvé zaznamenány na vnější straně hltanu u zárodku velikosti 173 μm (5,7 %). Jejich podoba se shodovala s axony plně vyvinutých redií. První sensorické cilie byly zaznamenány v okolí ústního otvoru (207 μm , 6,9 %).

5.3.2.3. Nervová soustava cercárie

V tělní části cercárie *F. magna* byly axony serotonergních neuronů přítomny ve všech párech podélných nervových provazců motolic – ventrálních, dorzálních a laterálních (Obr. 20A., 20B.). Jejich nejvyšší zastoupení bylo ve ventrálním páru. Naopak laterální pár byl zejména ve střední a zadní části těla cercárie velmi slabě značený.



Obr. 20. Nervová soustava cercárie. **A** – ventrální a laterální pár nervových provazců a těla serotonergních neuronů na ventrální straně těla, **B** – dorzální pár nervových provazců a neuropile na dorzální straně těla, **C** – detail anteriorní části ventrální strany těla ukazuje přítomnost inervace trávicí trubice a propojení neuropile s laterálními párem nervových provazců, **D** – detail střední části ventrální strany těla ukazuje přítomnost inervace acetabula, **E** – přítomnost dvou těl serotonergních neuronů a ventrálního a dorzálního páru nervových provazců v ocásku, **F** – tubulin přítomný ve ventrálním páru nervových provazců ocásku povrchových senzoričkových ciliích, **G** – tubulin přítomný v axonech propojujících neuropile a laterální nervové provazce a v senzoričkových ciliích na povrchu anteriorní části těla. C – cytotocyt, DNP – dorzální nervový provazec, IA – inervace acetabula, ITT – inervace trávicí trubice, K – komisura, LNP – laterální nervový provazec, N – neuropile, NNO – napojení těla serotonergního neuronu na nervový provazec ocásku, NPO – ventrální a dorzální pár nervových provazců ocásku, NSC – napojení laterální řady senzoričkových cilií na ventrální nervové provazce ocásku, PNLPI – propojení neuropile a laterálního nervového provazce obcházející ústní přísavku, PNLPI2 – propojení neuropile a laterálního nervového provazce procházející podél stěn lumenu ústní přísavky, SC – senzoričková cilie, SCLŘ – laterální řada senzoričkových cilií ocásku, SCVŘ – 2 řady senzoričkových cilií na ventrální straně proximální části ocásku, TN – tělo serotonergního neuronu, TNO – těla serotonergních neuronů ocásku, ÚP – ústní přísavka, VNP – ventrální nervový provazec, VNPO – ventrální nervový provazec ocásku.

Podélné nervové provazce byly navzájem propojeny příčnými komisurami (Obr. 20A., 20B.). Provazce dorzálního páru spojovalo 6 komisur rovnoměrně rozmístěných v oblasti mezi acetabulem a ústní přísavkou. Ventrální pár byl propojen jednou komisurou posteriorně od acetabula a dvěma komisurami za ústní přísavkou. Provazce laterálního páru nebyly na rozdíl od předchozích propojeny mezi sebou. Namísto toho se mnohačetnými komisurami (nejméně 11 párů) po celé délce tělní části cercárie napojovaly na ventrální pár a 5 komisurami pravidelně rozmístěnými v přední polovině těla na dorzální pár (Obr. 20A., 20B.).

V oblasti nad hltanem leželo neuropile hlavového ganglia, přímo napojené na serotonergní axony ventrálního páru provazců (Obr. 20C.). Axony dorzálního páru se k neuropile připojovaly párovou spojkou mířící kolmo ventrálním směrem a axony laterálního páru dvěma páry propojení. První pár lemoval okraje lumenu ústní přísavky a druhý procházel laterálně v blízkosti její vnější stěny (Obr. 20B., 20C.).

V tělní části cercárie bylo pozorováno celkem 8 těl serotonergních neuronů sousedících vždy s významným uskupením axonů (Obr. 20A., 20C.). První pár (nejblíže anterioru) se nacházel v blízkosti propojení neuropile a laterálních nervových provazců procházejícím vně ústní přísavky. Druhý pár přímo komunikoval s neuropile. V těsné blízkosti ventrálního páru provazců se nalézalo 5 párů těl neuronů uspořádaných do dvou skupin, jedné po 2 a jedné po 3 neuronech. Skupina 3 těl neuronů byla umístěna na úrovni anteriorního okraje acetabula. Skupina 2 těl byla na úrovni poloviční vzdálenosti mezi acetabulem a ústní přísavkou. Poslední pár těl neuronů byl napojen na svazky serotonergních axonů lemujících trávicí trubici v oblasti posteriorního konce hltanu (Obr. 20C.).

Specializovaná inervace orgánů byla pozorována u acetabula a trávicí trubice. Do acetabula vcházely axony vybíhající z ventrálního páru provazců a rozprostíraly se v okolí jeho lumenu (Obr. 20D.). Axony inervující trávicí trubici vybíhaly pravděpodobně z neuropile (přímo se to však prokázat nepodařilo), obíhaly vně svalnatou stěnu hltanu a poté pokračovaly podél jícnu, dokud se jejich značení nevytratilo (Obr. 20C.).

V ocásku cercárie byly zaznamenány dva páry nervových provazců serotonergních axonů probíhajících podélně po jeho ventrální a dorzální straně (Obr. 20E.). Pouze u ventrálního páru se podařilo prokázat přímé napojení na provazce tělní části cercárie. V ocásku se nacházela i dvě těla serotonergních neuronů paralelně uspořádaná v jeho proximální části (Obr. 20E.). Oba neurony byly svými axony napojeny na ventrální i

dorzální provazce ocásku.

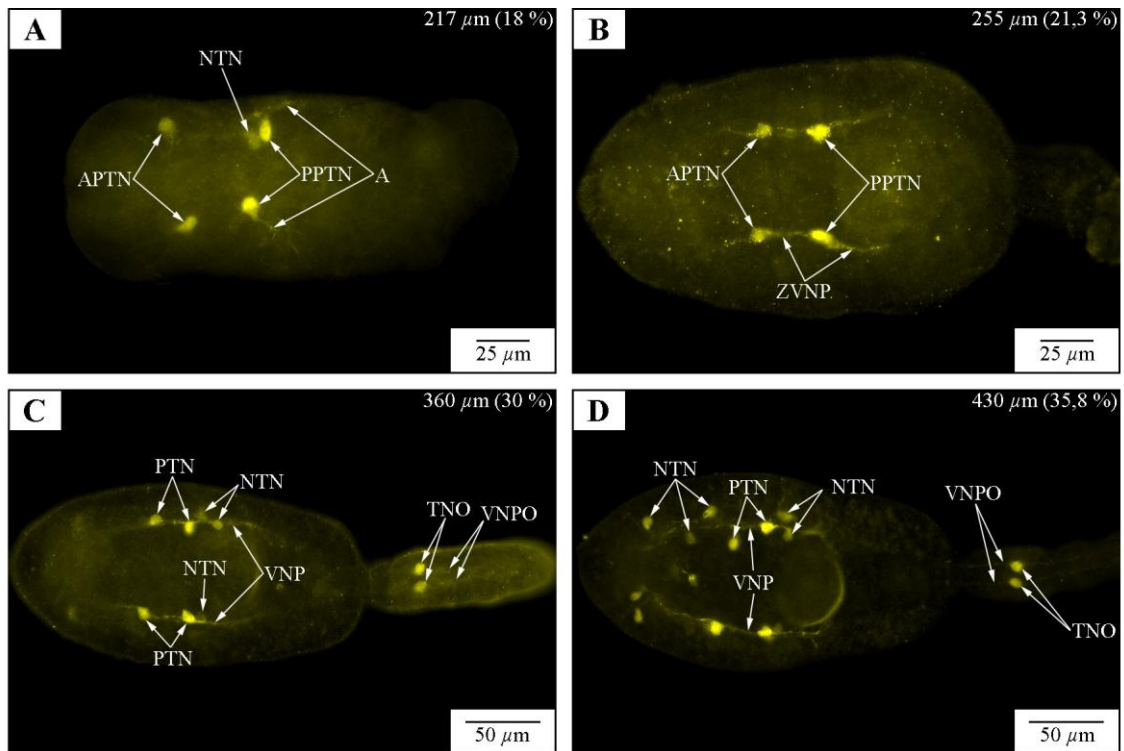
Kromě serotonergních neuronů a jejich výběžků byly v těle cercárie zachyceny i nervové struktury vyztužené tubulinovými vlákny. Protilátky namířené proti acetylovanému α -tubulinu odhalily axony vycházející z oblasti posteriorně od ústní přísavky (pravděpodobně z neuropile, ve kterém však nebyla přítomnost tubulinu zaznamenána) a směřující podél stěn jejího lumenu k ústnímu otvoru (Obr. 20G.). Svazky těchto vláken byly výrazně mohutnější než svazky serotonergních axonů vedoucí na stejném místě. Druhým typem axonů, kde byl tubulin zaznamenán, byl dorzální a ventrální pár nervových provazců ocásku (Obr. 20F.).

Zcela jinou strukturou nervové soustavy cercárie úspěšně značenou díky přítomnosti tubulinu byly sensorické cilie (Obr. 20F., 20G.). V nejvyšší hustotě byly zaznamenány v okolí ústního otvoru (Obr. 20G.), méně často se vyskytovaly i na jiných oblastech povrchu tělní části cercárie. Na ocásku byly uspořádány do 2 ventrálních řad v jeho proximální části a jedné laterální řady na každé straně ocásku po celé jeho délce (Obr. 20F.). Značení namířené proti acetylovanému tubulinu také umožnilo zobrazit příčná nervová propojení mezi sensorickými ciliemi a nervovými provazci ocásku (Obr. 20F.).

Značením součástí nervové soustavy obsahujících neuropeptid FMRFamid bylo zachyceno pouze slabě značené neuropile s jedním párem těl neuronů v jeho blízkosti a ventrální nervové provazce.

5.3.2.4. Morfogeneze nervové soustavy cercárie

Serotonergní součást nervové soustavy byla poprvé zaznamenána u zárodku délky 217 μm (18 %) v podobě dvou párů těl serotonergních neuronů (Obr. 21A.). Anteriorní pár se nacházel na hranici první a druhé čtvrtiny délky tělní části a posteriorní v jejím středu. Poblíž pravého neuronu posteriorního páru bylo zachyceno ještě jedno slaběji značené nepárové tělo serotonergního neuronu. V pokročilejších vývojových stádiích však již znovu zaznamenáno nebylo. U neuronů posteriorního páru byly pozorovány axony směřující směrem k zadní části těla zárodku (Obr. 21A.).



Obr. 21. Morfogeneze nervové soustavy cercárie. **A** – přítomnost anteriorního a posteriorního páru serotonergních neuronů u zárodku délky 217 μm (18 %); nově vzniklé (slaběji značené) nepárové tělo neuronu není obvyklou součástí serotonergní nervové soustavy, **B** – vznik základu serotonergních axonů ventrálních nervových provazců propojení anteriorního a posteriorního páru neuronů, **C** – založení nových (méně výrazně značených) párů těl serotonergních neuronů v okolí původního posteriorního páru a v ocásku u zárodku délky 360 μm (30 %), **D** – vznik anteriorních těl neuronů u zárodku délky 430 μm (35,8 %); v neuropile nejsou axony serotonergních neuronů dosud přítomné. A – axon, APTN – anteriorní pár serotonergních neuronů, NTN – nově vzniklé tělo neuronu, PPTN – posteriorní pár serotonergních neuronů, PTN – původní tělo neuronu, TNO – tělo serotonergního neuronu ocásku, VNP – ventrální nervový provazec, VNPO – ventrální nervový provazec ocásku, ZVNP – základ ventrálního nervového provazce.

U zárodků na vyšším stupni vývoje začaly všechny neurony zmíněné čtveřice (pátý, nepárový neuron již nebyl víckrát zaznamenán) vytvářet axony, které se staly součástí ventrálních nervových provazců. (255 μm , 21,3 %) (Obr. 21B.). Na obou stranách těla byly neurony navzájem podélně propojeny. Příčná propojení pozorována nebyla.

U zárodku délky 360 μm (30 %) se na jedné straně zárodku objevila 2 nová těla neuronů v okolí původního posteriorního páru a vytvořila tak skupinu 3 těl nacházející se u vyvinutých cercárií laterálně od acetabula. Zároveň se objevily i serotonergní axony patřící dorzálním nervovým provazcům. Jejich napojení na těla neuronů nebylo pozorováno. V ocásku došlo k založení ventrálního i dorzálního páru provazců a vzniku jednoho páru těl neuronů v jeho proximální části (Obr. 21C.).

Konečná fáze morfogeneze serotonergních součástí nervové soustavy cercárie spočívala ve vzniku dvou nových párů těl serotonergních neuronů na anteriorním konci

axonů ventrálních provazců v přední části těla zárodku (430 μm , 35,8 %) (Obr. 21D.). První z nich, ležící více anterolaterálním směrem, byl budoucí pár těl neuronů sousedících s vnějším párovým propojením mezi neuropile a podélnými laterálními provazci (viz kapitola 5.3.2.3.). Druhý pár nacházející se mírně posteriorně a více ke středu byl budoucí pár těl serotonergních neuronů asociovaných s neuropile.

Jako poslední byl zaznamenán vznik těl neuronů v okolí posteriorního konce hltanu a serotonergních axonů neuropile. Průběh morfogeneze serotonergních axonů laterálních nervových provazců, axonů lemující trávicí trubici a lumen acetabula se nepodařilo pozorovat.

Vznik axonů pozitivních na přítomnost tubulinových vláken poukázal na relativně pozdní zakládání serotonergních axonů v ontogenezi cercárie. Axony odpovídající svou polohou serotonergnímu propojení mezi neuropile a anteriorní částí laterálních provazců byly zaznamenány už u zárodku o délce 199 μm (16,6 %). První senzoričké cíle se objevily v okolí ústního otvoru u zárodku dlouhého 265 μm (22,1 %).

5.3.3. Vylučovací soustava

Morfogeneze vylučovací soustavy redií druhé generace a cercárií byla studována především imunohistochemicky protilátkami namířenými proti acetylovanému α -tubulinu přítomnému v tubulinových strukturách cyrtocytů a u cercárií i ve vzestupných částech hlavních sběrných kanálků. Sestupné části hlavních sběrných kanálků cercárií se podařilo označit díky přítomnosti F-aktinu fluorescenční sondou tvořenou faloidinem kovalentně vázaným s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Zakládání systému kanálků vylučovací soustavy se nepodařilo přímo vizualizovat.

5.3.3.1. Vylučovací soustava redie druhé generace

K vylučovací soustavě redií druhé generace byly s jistotou přiřazeny pouze svazky cílů cyrtocytů (acetylovaný α -tubulin) a propletené výběžky cyrtocytu a první kanálkové buňky (F-aktin).

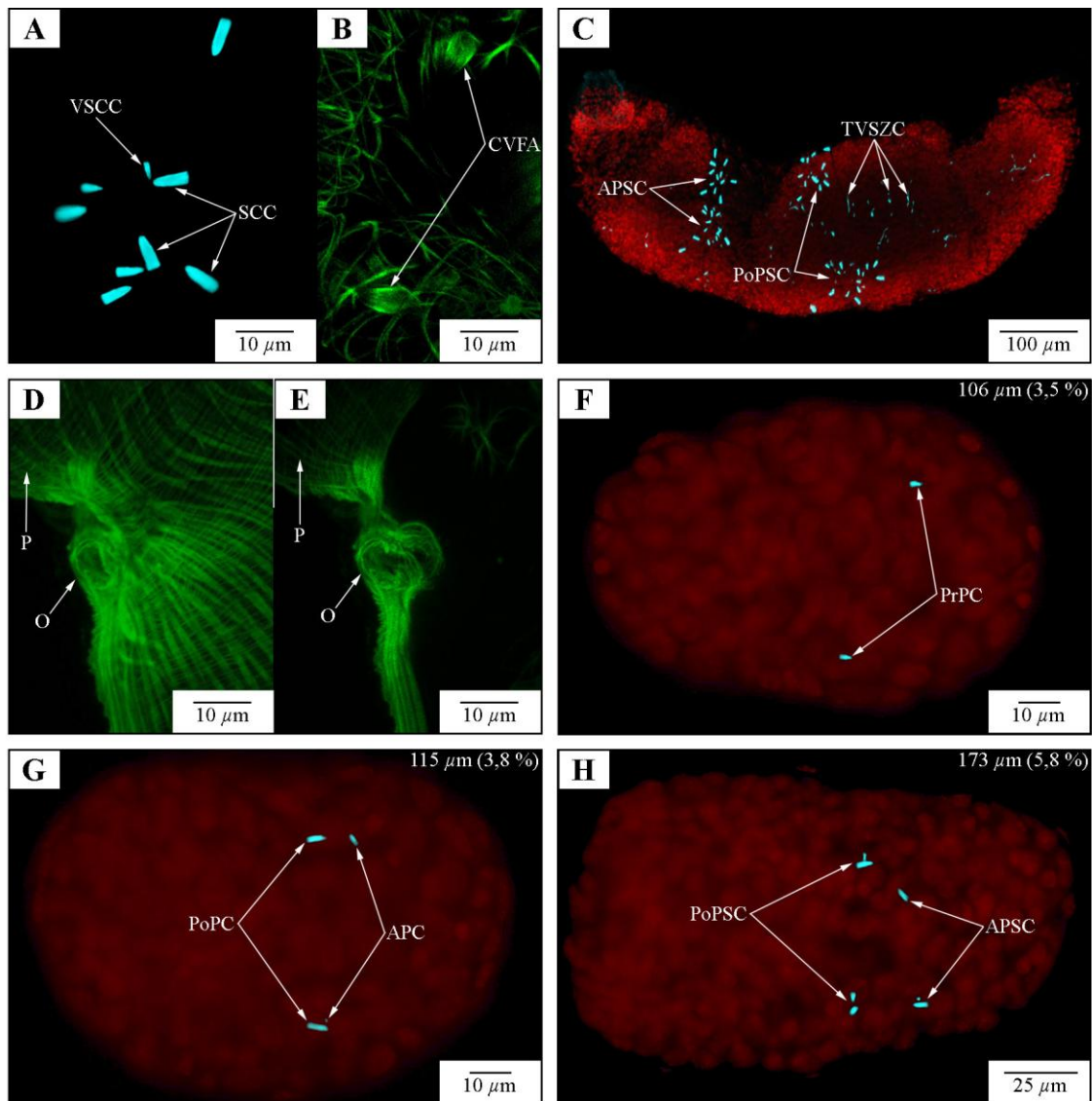
Svazek cilií cyrtocytu měl tvar kužele s velmi variabilní délkou pohybující se mezi 3 a 12 μm a šířkou základny 2 až 4 μm (Obr. 22A.). Po obvodu byl obklopen vzájemně propletenými cytoplazmatickými výběžky cyrtocytu a první kanálkové buňky tvořícími filtrační aparát. Díky přítomnosti aktinu je bylo možné pozorovat jako duté útvary o délce 4–8 μm a šířce 2,5–4,5 μm (Obr. 22B.). Jejich rozmístění v těle plně vyvinuté redie odpovídalo rozmístění cyrtocytů. Cyrtocyty byly uspořádány do 4 skupin ve 2 párech, z nichž každá obsahovala 14–16 zástupců tohoto typu buněk (počet byl variabilní i v rámci jednoho jedince) (Obr. 22C.). Skupiny cyrtocytů byly umístěny na boku těla, anteriorní pár na konci jeho první třetiny a posteriorní v jeho polovině. Vrcholy svazků cilií směřovaly většinou směrem k pomyslnému středu skupiny.

V jediném případě bylo u redie díky přítomnosti aktinu zaznamenáno nepárové trubicovité vyústění v tělní stěně anteriorně od prucuscula (Obr. 22D., 22E.). Délka trubice byla 8 μm , průměr vyústění 5 μm . Vnitřní stěna trubice byla podložena okružní svalovinou. Příslušnost tohoto otvoru k vylučovací soustavě bude diskutována v kapitole 6.4.

5.3.3.2. Morfogeneze vylučovací soustavy redie druhé generace

Vývoj uspořádání cyrtocytů redie *F. magna* měl velmi jednoduchý charakter. Na každé straně těla zárodku vznikl nejprve párový tubulární útvar, ze kterého se vyvinuly svazky cilií prvního páru cyrtocytů (106 μm , 3,5 %) (Obr. 22F.). Později se v jejich blízkosti diferencoval cyrtocyt druhého páru, čímž zároveň došlo k založení budoucích anteriorních a posteriorních skupin (115 μm , 3,8 %) (Obr. 22G.). Cilie nově se diferencujících cyrtocytů vznikaly vždy v kolmé orientaci a v těsné blízkosti ke svazku cilií již diferencovaných cyrtocytů (Obr. 22A.). Zatímco vzniklé dvojice prvních dvou párů rychle zanikly vzájemným oddálením, v dalším vývoji již zůstávaly cyrtocyty poblíž sebe, čímž docházelo k navyšování počtu cyrtocytů v rámci jednotlivých skupin.

Utváření cytoplazmatických výběžků cyrtocytu a první kanálkové buňky se nepodařilo pozorovat. Použitá metoda značení byla schopná tuto strukturu zachytit až po dosažení stupně vývoje, kdy se odlišovala od definitivní podoby pouze velikostí.



Obr. 22. Vylučovací soustava redie druhé generace a její morfogeneze. **A** – svazky cilií cyrtocytů, **B** – aktinový cytoskelet filtračního aparátu tvořeného propletenými cytoplazmatickými výběžky cyrtocytu a první kanálkové buňky, **C** – rozmístění 4 skupin cyrtocytů v těle redie, **D** a **E** – otvor neznámé funkce anteriorně od procruscul redie, **F** – prvně vzniklý pár cyrtocytů u zárodku délky 106 μm (3,5 %), **G** – založení anteriorního a posteriorního páru cyrtocytů u zárodku délky 115 μm (3,8 %), **H** – založení anteriorní a posteriorní skupiny cyrtocytů u zárodku délky 173 μm (5,8 %). Červeně jádra buněk (DAPI). APC – anteriorní pár cyrtocytů, APSC – anteriorní pár skupin cyrtocytů, CVFA – cytoplazmatické výběžky filtračního aparátu, O – otvor, P – procruscula, PoPC – posteriorní pár cyrtocytů, PoPSC – posteriorní pár skupin cyrtocytů, PrPC – první pár cyrtocytů, SCC – svazek cilií cyrtocytu, TVSZC – tubulin vylučovací soustavy zárodků cercárií, VSCC – vznikající svazek cilií cyrtocytu.

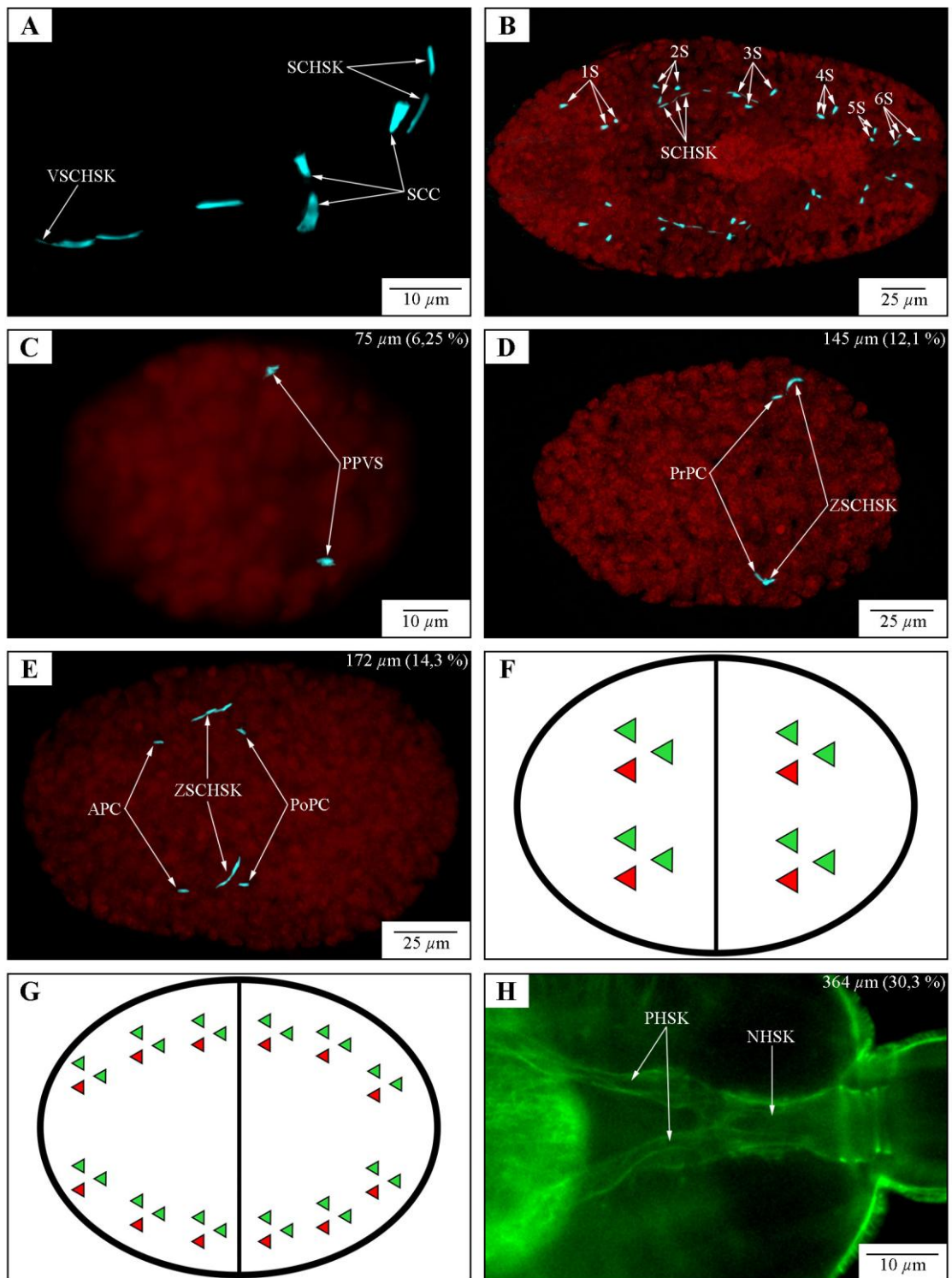
5.3.3.3. Vylučovací soustava cercárie

V cercárii byly jako součást exkreceční soustavy identifikovány dva typy tubulárních útvarů – svazky cilií cyrtocytů a svazky cilií vzestupných částí hlavních sběrných kanálků.

Svazek cilií cyrtocytu měl obvykle tvar kužele (Obr. 22A.). Méně často byl jeho tvar tyčinkovitý. Délka svazku se pohybovala mezi 4 a 6 μm , šířka základny byla 1–2 μm . Největší velikosti dosahovaly svazky páru cyrtocytů nejbližší anteriornímu konci tělní části. V posteriorní polovině těla se s výjimkou posledního páru nacházely spíše kratší svazky. Počet cyrtocytů se v průběhu vývoje ustálil na počtu 18 párů (Obr. 22B.). Na každé straně těla tvořily cyrtocyty 6 skupin rovnoměrně rozprostřených od konce ústní přísavky po konec tělní části cercárie. V ocásku cyrtocyty zaznamenány nebyly. Každá skupina byla tvořena 3 cyrtocyty, jejichž svazky cilií byly namířeny do jejího pomyslného středu (u jedince na Obr. 22B. není vyvinutý jeden pár cyrtocytů, který by měl být součástí 5. skupiny). Na základě tohoto znaku bylo možné jednotlivé skupiny snadno odlišit. Kolokalizovat svazky cilií s jádry cyrtocytů se nepodařilo.

Svazky cilií vzestupných částí hlavních sběrných kanálků byly pozorovány jako tyčinkovité útvary o délce 4 až 8 μm a šířce do 1 μm (Obr. 22A.). Byly uspořádány za sebou v párových řadách o 8 svazcích vedoucích od laterálních okrajů acetabula anteriorním směrem do poloviční vzdálenosti mezi acetabulem a ústní přísavkou (Obr. 22B.). Vzájemná vzdálenost svazků v rámci jedné řady se velmi lišila, v některých případech činila 23 μm , v jiných se sousední svazky dotýkaly svými konci. Všechny svazky obou řad se nacházely ve stejné, frontální rovině.

Posledními strukturami vylučovací soustavy cercárie byly exkreceční měchýř a sestupné části hlavních sběrných kanálků (Obr. 16H.). Obě tyto struktury bylo možné sledovat díky přítomnosti svaloviny v jejich stěně. Sestupné části sběrných kanálků byly pozorovatelné od okrajů acetabula, odkud se sbíhaly směrem ke kořenu ocásku. Ve dvou třetinách vzdálenosti mezi acetabulem a kořenem ocásku se napojovaly na exkreceční měchýř. Exkreceční měchýř byl protáhlého kuželovitého tvaru (s vrcholem namířeným anteriorním směrem), umístěný na samotném konci tělní části cercárie. U cercárie, jejíž tělní část měřila 445 μm , byla jeho délka 45 μm a šířka 25 μm . Vstup i výstup měchýře byl ohraničen svěrači tvořenými zesílenou okružní svalovinou.



Obr. 23. Vylučovací soustava cercárie a její morfogeneze. **A** – Svazky cílií cytotytů a vztupných částí hlavních sběrných kanálků, **B** – konečné uspořádání cytotytů a svazků cílií vztupných částí hlavních sběrných kanálků cercárie, třetí cytotyt 5. skupiny na pravé straně těla není u tohoto jedince cercárie vytvořen, **C** – založení primordia vylučovací soustavy u zárodka délky 75 μm (6,3 %), **D** – založení první vzniklého páru cytotytů a základu svazků cílií vztupných částí hlavních sběrných kanálků u zárodka délky 145 μm (12,1 %), **E** – založení anteriorního a posteriorního páru cytotytů, rozrůstání základu svazků cílií vztupných částí hlavních sběrných kanálků u zárodka délky 172 μm (14,3 %), **F** – schématické znázornění doplnění každého ze 4 původních cytotytů (červený trojúhelník) v průběhu vývoje 2 novými cytotyty (zelený trojúhelník), **G** – schématické znázornění doplnění každého z 12 původních cytotytů (červený trojúhelník) v průběhu vývoje o 2 nové cytotyty (zelený trojúhelník). **H** – oblast splnutí hlavních sběrných kanálků před vznikem exkrecního měchýře u zárodka délky 364 μm (30,3 %). Červeně jádra buněk (DAPI). 1S až 6S – skupiny cytotytů na pravé straně tělní části cercárie řazené směrem od anterioru k posterioru, APC – anteriorní pár cytotytů, NHSK – nepárový hlavní sběrný kanálek, PHSK – párový hlavní sběrný kanálek, PoPC – posteriorní pár cytotytů, PPVS – párové primordium vylučovací soustavy, PrPC – první pár cytotytů, SCHSK – shluk cílií hlavních sběrných kanálků, SSC – shluk cílií cytotytu, VSCHSK – vznikající shluk cílií hlavních sběrných kanálků, ZSCHSK – základ svazků cílií hlavních sběrných kanálků.

5.3.3.4. Morfogeneze vylučovací soustavy cercárie

Primordium vylučovací soustavy cercárie *F. magna* bylo poprvé pozorováno v podobě podlouhlých párových shluků cilií umístěných po stranách těla zárodka délky 75 μm (5,8 %) (Obr. 23C.). V dalším vývoji se tyto shluky rozdělily na dva tyčinkovité útvary (100 μm , 8,3 %) (Obr. 23D.). Jedním z nich byl svazek cilií prvního páru cyrtocytů o délce 5 μm a druhý svazek cilií vzestupné části hlavních sběrných kanálků (HSK) dlouhý 8 μm .

Další vývoj zárodka doprovázelo prodloužení a zesílení svazku cilií HSK a vznik druhého páru cyrtocytů (110 μm , 9,2 %) (Obr. 23E.). Orientace nově vznikajících cyrtocytů vůči cyrtocytům původní byla shodná jako u redií. Posteriovní pár cyrtocytů se po svém vzniku velmi rychle oddálil do zadní části zárodka. V okolí každého ze 4 cyrtocytů v dalším vývoji vznikly 2 další (Obr. 23F.). Výsledkem tedy byly 4 skupiny, každá složená ze 3 cyrtocytů, rozdělené na anteriorní a posteriovní pár. Podlouhlý útvar cilií HSK se mezitím rozdělil na 6 tyčinkovitých svazků uspořádaných v řadě za sebou (172 μm , 14,3 %). Závěr vývoje vylučovací soustavy cercárie spočíval opět ve vzniku 2 nových cyrtocytů v okolí každého z původních 12 (Obr. 23B., 23G.). Rychlost vývoje každé z těchto skupin byla různá a to i v rámci jednoho páru. Výsledkem bylo finální uspořádání 36 cyrtocytů rovnoměrně rozdělných do 12 skupin v 6 párech. Počet svazků cilií v obou větvích HSK se navýšil na 8 (480 μm , 40 %) (Obr. 23B.). I v tomto případě probíhalo jejich „množení“ jednotným způsobem. Z anteriorního nebo posteriovního konce již zralého svazku začal vyrůstat tenký základ svazku nového (Obr. 23A.). Po dosažení délky srovnatelné s původním svazkem se navzájem oddělily a zařadily za sebe. Nový svazek poté postupně nabyl stejné tloušťky jako svazek původní.

Sestupné části HSK byly poprvé zaznamenány na základě přítomnosti svalových vláken v jejich stěně u zárodka délky 337 μm (28 %). Směřovaly od okrajů acetabula směrem ke kořeni ocásku a v první třetině této vzdálenosti splývaly v jedinou, nepárovou část HSK (Obr. 23H.). V tomto stádiu vývoje byla ve stěně HSK pozorována pouze podélná svalová vlákna. U zárodka o délce 605 μm (50,4 %) bylo zaznamenán vznik svěračů ohraničujících anteriorní a posteriovní konce nepárového HSK zesílením okružní svaloviny (mechanismus vzniku okružní svaloviny nebyl pozorován), čímž došlo k založení exkrecečního měchýře (Obr. 16H.).

6. Diskuze

6.1. Rozmnožování motolice *F. magna* v meziphostitelském plži

Současní autoři, ale i mnozí autoři starších prací, se shodují na vzniku „zárodečných“ buněk plynulým procesem diferenciaci z buněk, které jsou dnes označovány jako kmenové. Rozdělením „zárodečné“ buňky posléze vzniká v těle mateřského jedince zárodek sporocysty, redie, nebo cercárie (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Přítomnost buněk odpovídajících svou morfologií kmenovým a „zárodečných“ buňkám byla zaznamenána i u motolice *F. magna* v tělní dutině miracidii a redií první a druhé generace. „Zárodečné“ buňky byly na první pohled snadno rozpoznatelné díky svému velkému jádru s řídkým zastoupením heterochromatinu. Kmenové buňky byly výrazně menší a vyznačovaly se kompaktním kulatým jádrem s vysokým zastoupením heterochromatinu obklopeným úzkým proužkem cytoplazmy. V miracidiu a v rediích byly kromě buněk na konci či na začátku diferenciaci zároveň pozorovány i buňky nacházející se v některém z mezistupňů tohoto procesu. Že se opravdu jedná o plynulý děj, nasvědčovaly nálezy buněk v plné škále přechodných velikostí s různou hustotou zastoupení heterochromatinu v jádře.

V tělní dutině miracidia se kromě volných kmenových a „zárodečných“ buněk nacházel i nevýrazně ohraničený, volný buněčný shluk představující pravděpodobně zárodek redie první generace. Že se opravdu jedná o zárodek a nikoliv o uspořádaný shluk diferencujících se „zárodečných“ buněk, naznačuje rychlý vývoj redie první generace v prvních třech dnech po infekci. Za pouhých 48 hodin po penetraci miracidia dosahoval nejvyspělejší zárodek v těle sporocysty délky 95 μm a 72 hodin po infekci byly v těle plže nacházeny první redie, které tělo sporocysty opustily. Vývoj ostatních zárodků v těle sporocysty, které se pravděpodobně zakládají ze samostatných buněk pozorovaných v miracidiu, je výrazně pomalejší. Redie první generace, jejichž stav vývoje odpovídal nejvyspělejšímu zárodku 3. den po infekci, byly v těle plže nacházeny ještě 12. den. Výrazně rychlejší vývoj jednoho ze zárodků redií byl pozorován i dalšími autory ve

sporocystách motolic *F. magna* a *F. gigantica* (Swales, 1935; Dinnik a Dinnik, 1956; Erhardová-Kotrlá, 1971). Zárodek redie v těle miracidia byl zaznamenán také u motolice *Echinostoma paraensei* (Ataev a kol., 2001). Rozvolnění buněk zárodku mohlo být způsobeno smrštěním jejich cytoplazmy během fixace miracidii. Naznačují to zejména tvary buněk, které do sebe přesně zapadají. Podobné rozestoupení buněk (označovaných autory jako „zárodečné“) je patrné i na fotografiích miracidii motolice *Echinostoma paraensei*. V našem i v jejich případě byl k fixaci použit Bouinův roztok (Ataev a kol., 2001).

Čeď Fasciolidae je řazena podobně jako například čeďi Paramphistomidae nebo Heterophyidae mezi motolice, v jejichž sporocystách a rediích nejsou přítomné zárodečné masy – specializované reprodukční orgány, ve kterých dochází k dělení kmenových buněk a jejich diferenciaci v „zárodečné“ buňky (Cable, 1934; Ameel a kol., 1950; Van der Woude, 1954; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). „Zárodečné“ buňky samotné se za účelem svého zmnožení dělit nedokáží, proto je veškerá reprodukce sporocyst a redií těchto čeďí omezena na dělení kmenových buněk v jejich embryonální vývoji (Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Pozorování provedená na rediích *F. magna* přítomnost zárodečné masy jednoznačně vyloučit nemohou. V rediích střední a velké velikosti nebyl zaznamenán shluk buněk, který by mohl být na základě vysokého zastoupení kmenových buněk a diferencujících se „zárodečných“ buněk s jistotou považován za zárodečnou masu. U redií malé velikosti mohla být přítomnost zárodečné masy přehlédnuta. Jejich tělní dutina byla zcela vyplněna zárodky na nízkém stupni vývoje, volnými „zárodečnými“, kmenovými buňkami a buňkami těla redie. Hranice mezi těmito strukturami se nepodařilo pozorovat. Přesto ani v rediích malé velikosti nebyly zaznamenány výraznější shluky kmenových buněk, které by přítomnost zárodečné masy naznačovaly.

Absenci zárodečných mas u *F. magna* napovídá i nízká reprodukční schopnost sporocyst (nejvyšší odhadovaný počet vyvíjejících se zárodků ve sporocystě byl 5), ztráta reprodukčních schopností velkých redií první a druhé generace doprovázená postupným vymizením zárodků na nejnižším stupni vývoje a přítomnost volných kmenových buněk v tělech redií, které by v opačném případě měly být uzavřené uvnitř zárodečných mas (Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Existuje však také možnost, že se nejednalo o kmenové buňky účastnící se zárodečného vývoje, ale o kmenové buňky určené k regeneraci tkání (neoblasty) popsané u volně žijících zástupců Platyhelminthes a

dospělců motolice *Schistosoma mansoni* (Ladurner a kol., 2000; Collins a kol., 2013).

Raná embryogeneze sporocyst, redií a cercárií byla studována u mnoha čeledí motolic (Brooks, 1930; Chen, 1937; Pieper, 1953; Van der Woude, 1954; Ciordia, 1956; Guilford, 1958). Autoři těchto prací se shodují na vzniku zárodků nerovnoměrným dělením („unequal division“) „zárodečné“ buňky, jehož výsledkem jsou dvě buňky o rozdílné velikosti. Jedna z buněk připomíná svým vzhledem „zárodečnou“ buňku a liší se tak od druhé buňky, která má menší velikost a hustší uspořádání heterochromatinu v jádře. Vzájemné přichycení těchto dvou buněk je zobrazováno buď jako volné (Pieper, 1953; Guilford, 1958; Podvyaznaya a Galaktionov, 2008), nebo naopak jako pevný svazek dvou buněk, jejichž jádra jsou vlivem vzájemného tlaku v místě kontaktu zploštěná (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937). Dvoubuněčné struktury, které by mohly být zárodkem redie druhé generace, nebo cercárie tvořeným 2 blastomery s rozdílně velkým jádrem, byly pozorovány i v rediích motolice *F. magna*. Jejich vzhled byl však od popisů výše uvedených autorů mírně odlišný. Hranice mezi cytoplazmou obou buněk nebylo možné rozeznat. Zdálo se, jako by se jádro „zárodečné“ buňky rozdělilo, ale k rozdělení cytoplazmy nedošlo. Obě jádra k sobě byla pevně přimknuta, což asi vedlo k jejich znatelnému zploštění v místě styku. Přestože se navzájem vždy lišila svou velikostí, nebyl zaznamenán případ, kdy by se odlišovaly i vzhledem jádérka nebo uspořádáním heterochromatinu. Ve většině případů odpovídal vzhled jader obou těchto buněk jádru „zárodečných“ buněk. Byly však pozorovány i dvoubuněčné struktury, u kterých byl heterochromatin v jádrech uspořádán hustěji, než je pro „zárodečné“ buňky typické.

Autoři, kteří se věnovali studiu raného embryonálního vývoje motolic, zastávají názor, že se průběh rané embryogeneze zárodků redií a cercárií stejného druhu neliší (Chen, 1937; Galaktionov a Dobrovolskij, 1987, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003). Tato pozorování jsou v souladu se skutečností, že nebyl ve stádiu zárodečné koule zaznamenán žádný rozdíl v buněčném složení zárodků redií druhé generace a cercárií motolice *F. magna*. Poměrně v nedávné době začaly být blastomery zárodků v raných fázích vývoje klasifikovány podle velikosti, nejčastěji na tři skupiny – makromery, mesomery a mirkomery (Haight a kol., 1977a; Haight a kol., 1977b; Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). O mechanismech specializace těchto buněk na linie vedoucí k jednotlivým tělním soustavám nebyla dosud vypracována žádná práce. Existují však přesvědčivé důkazy, že velikost a hustota chromatinu jádra blastomer souvisí spíše s fází buněčného cyklu, než s buněčnou specializací (Haight a kol.,

1977a; Haight a kol., 1977b). Přítomnost blatomer, které bylo možné na základě velikosti jádra klasifikovat na makromery, mesomery a mikromery, byl zaznamenán v zárodcích redií i cercárií *F. magna*. Vzhled makromer díky světlému jádru a velkému jádérku nápadně připomínal vzhled volných „zárodečných“ buněk. Tato podobnost byla potvrzena i na úrovni ultrastruktury u motolice *Prosohynchoides borealis* (Bucephalidae) (Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). Mikromery svým vzhledem vzdáleně připomínaly kmenové buňky. Jejich malé jádro s vysokou hustotou heterochromatinu však nemělo natolik kulatý, kompaktní tvar. Toto neplatilo pro mikromery zárodka redie přítomném v miracidiu, které byly s volnými kmenovými buňkami morfologicky identické. Problém byl i s klasifikací buněk tohoto zárodka do velikostních skupin, přechody v jejich velikosti se totiž zdály být plynulé.

V popisech rané embryogeneze redií, sporocyst a cercárií se jejich autoři zmiňují o plochých buňkách na povrchu zárodka, které svými cytoplazmatickými výběžky utvářejí okolo zárodka syncytiální obal nazývaný primitivní epitel (Brooks, 1930; Cable, 1934; Chen, 1937; Žďárská, 1995; Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). Jeho funkcí je udržení integrity zárodka, jeho ochrana a zprostředkování živin z tělní dutiny mateřského organismu (Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). Přítomnost primitivního epitelu byla zaznamenávána i u zárodků redií druhé generace a cercárií *F. magna* ve stádiu zárodečné koule. U zárodka redie první generace přítomnému v miracidiu však ploché buňky na povrchu ani povrchové syncytium pozorováno nebylo. Tato skutečnost možná také vedla k výše zmíněnému intenzivnímu rozvolnění zárodka během fixace.

U některých druhů motolic (například čeledi Gymnophallidae, Microphallidae či Schistosomatidae) neplavou zárodky volně v tělní dutině mateřského jedince, ale jsou uchyceny cytoplazmatickými výběžky parenchymatických buněk k jeho stěně (Meuleman a kol., 1980; Galaktionov, 1993, cit. dle Dobrovolskij a Galaktionov, 2003; Irwin a kol., 2003). Obalení zárodků redií a cercárií *F. magna* cytoplazmatickými výběžky parenchymatických buněk bylo dobře pozorovatelné zejména po rozvolnění tělní dutiny. Cytoplazmatické výběžky parenchymatických buněk mířily obvykle do dvou, protichůdných směrů. V jednom směru se přichycovaly k tělní stěně a ve druhém obtáčely zárodek. Toto uspořádání naznačuje, že by se mohly kromě ochranné a fixační funkce podílet i na zprostředkování transportu živin z tegumentu mateřského organismu. To podkládají někteří autoři domněnkou, že pokud by parenchymatické buňky výživu zárodka nezajistily, spíše by jej od živin přítomných v tekutině vyplňující tělní dutinu izolovaly

(Dobrovolskij a Galaktionov, 2003).

Během růstu redií motolice *F. magna* docházelo k rozvolňování jejich tělní dutiny a vzniku volných prostor mezi jednotlivými zárodky. Ty se během svého postupného vývoje posouvaly ze spleti cytoplazmatických výběžků parenchymatických buněk v zadní části těla mateřského jedince anteriorním směrem, dokud se z nich zcela nevymanily. Takové zárodky se pak volně pohybovaly v tělní dutině. Stejný proces byl detailně popsán u redií motolice *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae) (Cable, 1934).

V tělní dutině plně vyspělých redií obou generací byly v blízkosti tělní stěny nacházeny volné buňky (buňky, které nejsou součástí zárodku), u kterých byla specifickými metodami značení prokázána jejich schopnost proliferace. Jádra, která se značila v mitotické fázi buněčného cyklu nebo po krátkých inkubacích v bromdeoxyuridinu patřila buňkám, které se právě připravovaly k dělení. Tyto buňky je možné rozdělit na dvě skupiny. První skupinu představují buňky účastnící se procesu vzniku zárodků následující generace. V tomto případě se mohlo jednat o kmenovou buňku – prekursor „zárodečné“ buňky, připravující se k dělení, nebo o „zárodečnou“ buňku připravující se dát svým rozdělením vzniknout dvoubuněčnému zárodku. Mezi proliferující buňky, které naopak nejsou součástí procesu reprodukce, patří kmenové buňky podílející se na regeneraci a výstavbě těla (neoblasty) známé zejména z volně žijících druhů skupiny Platyhelminthes (Ladurner a Rieger, 2000; Newmark a Alvarado, 2000). V nedávné době však byly popsány i u dospělců *Schistosoma mansoni* (Collins a kol., 2013). Dlouhé inkubace redií v roztoku bromdeoxyuridinu (v řádu dní) mohly kromě těchto buněk vést ke značení jader diferencovaných buněk, které zdědily DNA obsahující bromdeoxyuridin ze své mateřské buňky. Jejich lokalizace v okolí tělní stěny by naznačovala, že se může jednat o buňky parenchymatické, nebo subtegumentální. Ke zjištění pravé povahy proliferujících buněk v tělní dutině redií bude nezbytné provedení dalších, podrobnějších analýz.

Inkubace redií v roztoku kolchicinu ukázaly, že se v zárodcích redií a cercárií zvyšuje zastoupení jader blastomer v mitotické fázi pouze během prvních 3 hodin. Počet jader blastomer zárodků zvyšuje pouze během prvních 3 hodin po začátku inkubace. Tato skutečnost má možné vysvětlení v zastavení vývojových procesů zárodku.

Méně zřejmé je zdůvodnění nízké frekvence mitoticky aktivních buněk volně se vyskytujících v tělní dutině redie při inkubacích trvajících 12 a 48 hodin. Snižování zastoupení jader blastomer zárodků v mitotické fázi při dlouhotrvajících inkubacích ukazuje, že po uplynutí určitého časového úseku přestává být fosforylovaný histon H3

v jádrech buněk detekovatelný. Pokud by byl tento časový úsek srovnatelný s dobou buněčného cyklu volných proliferujících buněk, nemohlo by ke zvyšování počtu značených jader docházet, neboť by spolu s nově zachycenými buňkami zároveň přestávaly být detekovatelné buňky původní.

Za účelem další analýzy volných proliferujících buněk a blastomer zárodků byly vyzkoušeny dvě metody disociace tkání redií a zárodků na jednotlivé buňky. Aplikace žádné z těchto metod nebyla úspěšná. Je pravděpodobné, že přítomnost syncytia na povrchu redií (tegument) a zárodků (primitivní epitel) udržuje jejich tělo kompaktní i po narušení buněčných spojů.

6.2. Morfogeneze svalové soustavy redií druhé generace a cercárií *F. magna*

Zakládání a vývoj svaloviny je oblast vývojové biologie, které se v rámci parazitické skupiny Neodermata nikdo podrobněji nevěnoval. Práce zabývající se myogenezí u volně žijících zástupců Platyhelminthes se zaměřují především na zakládání a vývoj svaloviny tělní stěny (Rieger a kol., 1991, 1994; Reiter a kol., 1996; Bolaños a Litvaitis, 2009; Semmler a Wanninger, 2010). V experimentální části diplomové práce byla použita stejně jako v těchto studiích metoda značení F-aktinu celých jedinců („whole mount“) fluorescenční sondou tvořenou faloidinem konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Metoda značení svaloviny na tlustých tkáňových řezech (25 μm) určených pro konfokální mikroskopii nebyla úspěšná. Je možné, že agar, ve kterém byla tkáň uzavřena, v průběhu odvodňovacích kroků ztratil svou dřívější propustnost, která již nebyla jeho zavodněním plně navrácena. Tuto možnost naznačuje dlouhá doba (48 hodin) průniku molekul DAPI k jádrům buněk značené tkáně.

Základní schéma vývoje svaloviny tělní stěny redií a cercárií *F. magna* odpovídá vývoji u volně žijících zástupců skupin Macrostomorpha a Polycladida (Platyhelminthes) (Rieger a kol., 1991, 1994; Reiter a kol., 1996; Bolaños a Litvaitis, 2009; Semmler a Wanninger, 2010). Svalovina tělní stěny vzniká z krátkých, tenkých, neorientovaných vláken roztroušených pod povrchem zárodku. Jejich uspořádáním a příčnou či podélnou orientací se formují první okružní a podélná svalová vlákna (tato fáze vývoje nebyla

zachycena u cercárií, ale u redií je zřetelně patrná). Formování okružní svaloviny probíhá rychleji než formování svaloviny podélné a to přesto, že se objevují v těle zárodku prakticky současně. Poslední fáze vývoje vede u volně žijících zástupců Platyhelminthes k doplnění hrubého ortogonu okružních a podélných svalových vláken o vlákna nová, která pomohou vytvořit jemnou mřížku svaloviny dospělého. U redií a cercárií motolice *F. magna* je tato fáze výrazně pozměněná.

Hrubý ortogon svalových vláken je v průběhu vývoje cercárie doplňován pouze o svalová vlákna okružní. Podélná svalová vlákna se seskupují do úzkých podélných provazců procházejících celým tělem zárodku. Jedná se o jakousi embryonální formu podélné svaloviny. Během závěrečných fází embryonálního vývoje tyto provazce zřejmě již přestávají plnit svojí původní úlohu, neboť postupně zanikají a v jejich okolí se objevují zcela nová krátká vlákna podélné svaloviny, ze kterých se vytvoří budoucí jemná mřížka popsaná u vyvinuté cercárie. Funkci embryonální podélné svaloviny se nepodařilo odhalit. U zárodků, které jí disponují, nebyl dosud zaznamenán pohyb, je tedy možné, že její hlavní funkce spočívá ve zpevnění těla.

Ve vývoji redií ke vzniku hrubé mřížky ortogonu podélných a příčných svalových vláken vůbec nedochází. U zárodků, kde jsou početná okružní vlákna již rovnoměrně rozprostřená po celé délce těla, je podélná svalovina dosud tvořena pouze krátkými volně uspořádanými vlákny. K prodloužení podélných svalových vláken dojde až u zárodků, u kterých je vývoj okružní svaloviny dokončen.

Ve vývoji svaloviny redií a cercárií byla kromě tělní stěny věnována zvýšená pozornost i formování trávicí soustavy. Těmito orgány se práce zabývající se raným embryonálním vývojem volně žijících zástupců Platyhelminthes blíže nevěnují. U redií i cercárií motolice *F. magna* byl první svalovou strukturou trávicí soustavy hltan. Jeho ústí bylo po celou dobu morfogeneze místem s největší koncentrací aktinových vláken. Primordium hltanu se zakládalo v přední části těl zárodků a po svém vzniku nebylo v kontaktu s povrchem. K propojení hltanu s ústním otvorem docházelo u redií a cercárií odlišným způsobem. Hltan redií se v průběhu vývoje posouval anteriorním směrem až se přiblížil k přednímu konci těla a napojil se na nově prolomený ústní otvor. Hltan cercárií naopak zůstával ve stejné pozici a směrem od ústního otvoru se k němu přiblížila a nakonec jej obklopila nově vzniklá část trávicí trubice.

Detaily utváření střeva a jícnu se nepodařilo zachytit. Vlákna, která je tvořila, byla natolik jemná, že je metoda značení faloidinem dokázala zaznamenat až v jejich konečné

podobě.

U zárodků i plně vyvinutých cercáriích byly (na rozdíl od redií) zachyceny dva typy aktinových struktur, jejichž povaha není zcela jasná. Útvary ve tvaru malých kroužků o průměru 3–6 μm by mohly představovat aktin obkružující vývody žláz ústící na povrch těla. Takto byly interpretovány struktury podobného vzhledu popsané u ploštěnky *Martigrella crozieri* patřící do skupiny Polycladida (Bolaños a Litvaitis, 2009). Druhá aktinová struktura pozorovaná u cercárií byla podlouhlého vřetenovitého tvaru délky 7–14 μm . Takovýmto tvarem disponovaly diferencující se myocyty popsané u ploštěnky *Girardia tigrina* (Cebrià a kol., 1997). Správná interpretace těchto struktur však bude potřebovat další, podrobnější studie.

6.3. Morfogeneze nervové soustavy redií druhé generace a cercárií *F. magna*

Raná morfogeneze nervové soustavy byla podrobně studována pouze u dvou zástupců parazitické skupiny Neodermata – tasemnice *Echinococcus multilocularis* a motolice *Diplostomum pseudospathaceum* (Niewiadomska a kol., 1996; Koziol a kol., 2013). Většina současných znalostí o utváření nervové soustavy v embryonálním vývoji zástupců skupiny Platyhelminthes byla získána studiem volně žijících druhů skupin Macrostomorpha, Polycladida, Rhabdocoela, Tricladida a Temnocephalida (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001; Morris a kol., 2004; Cardona a kol., 2005).

V průběhu experimentální části diplomové práce byly vyzkoušeny 3 různé imunohistochemické metody značení nervové soustavy. Dvě využívaly protilátkové detekce významných excitačních složek nervového systému – serotoninu a FMRFamidu (Pan a kol., 1994; Mair a kol., 2000; Money Penny a kol., 2001). Třetí metodou, která byla použita autory prací věnujících se neurogenezi volně žijících zástupců Platyhelminthes, byla detekce acetylovaného α -tubulinu v axonech vyztužených tubulinovými vlákny (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001). Nejvhodnější z těchto 3 metod se ukázalo značení serotoninu a acetylovaného α -tubulinu. Serotonin byl přítomný v neuropile a všech podélných

nervových provazcích cercárie *F. magna*. V nervové soustavě redie byl zastoupen opět v neuropile a v axonech probíhajících celým tělem redie. Značení nervové soustavy prostřednictvím protilátek namířených proti neuropeptidu FMRFamidu ukázalo jeho přítomnost pouze v neuropile, ventrálních nervových provazcích a jednom páru těl neuronů cercárií, proto nebyl pro studium morfogeneze nervové soustavy využíván. Neúspěšnost jeho detekce v jiných částech nervové soustavy mohla být způsobena jeho nízkým zastoupením. Acetylovaný α -tubulin byl zaznamenán v sensorických cílích redií i cercárií a v axonech vyskytujících se v jejich blízkosti. U redie se jednalo o axony vedoucí po obvodu hltanu a u cercárie o axony v blízkosti ústní přísavky a v nervových provazcích ocásku. U mnohých z těchto axonů bylo prokázáno jejich přímé napojení na sensorické cíle.

Sledování přítomnosti serotoninu se ukázalo jako metoda, která je vhodná pro posouzení základní stavby nervové soustavy cercárie a redie *F. magna*, ale nikoliv pro sledování jejího vzniku a rané morfogeneze. Studium embryonálního vývoje cercárie motolice *D. pseudospathaceum* (detekce cholinesterázy) a volně žijících zástupců Platyhelminthes (detekce acetylovaného α -tubulinu) ukázalo, že prvně vzniklou strukturou nervové soustavy je primordium hlavového ganglia tvořené z vnější části těla neuronů (kortex) a z vnitřní jejich propletenými axony (neuropile). Až později z něho vychází první axony podélných nervových provazců (Niewiadomska a kol., 1996; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001). Axony neuropile obsahující neuropřenašeč serotonin byly poprvé zaznamenány až v samém závěru výstavby serotonergní soustavy redií a cercárií *F. magna*. U redie se neuropile poprvé objevilo u vývojového stádia, kdy již vznikly všechny páry serotonergních neuronů vzájemně propojených podélnými axony. Neuropile cercárií bylo poprvé pozorováno u zárodků, které měly již vytvořené ventrální i dorzální nervové provazce tělní části a ocásku a všechny těla neuronů s výjimkou jediného páru (pár těl neuronů v okolí inervace trávicí trubice) dosáhly definitivního uspořádání.

U redií i cercárií vznikaly první serotonergní neurony ve středu těla zárodku, odkud začaly vytvářet v anteriorním a posteriorním směru podélné axony (u cercárií byly tyto prvně vzniklé axony součástí ventrálních nervových provazců). Následoval rychlý vznik zbylých těl neuronů a dokončení systému serotonergní nervové soustavy tvorbou nových axonů.

Pro nově diferencované neurony redií a cercárií *F. magna* bylo typické jejich méně

výrazné značení ukazující na nižší zastoupení serotoninu. Díky tomu je bylo možné snadno odlišit od těl neuronů, které byly již plně diferencované. Podobně jako u vylučovací soustavy (a na rozdíl od soustavy svalové) byl i u nervové soustavy redií a cercárií zaznamenán rozdíl v rychlosti vývoje na obou stranách těla. Vývoj pravé a levé strany bilaterálně symetrického těla motolic tedy není pevně svázaný.

V některých případech byl u redií a cercárií *F. magna* pozorován nepárový neuron, který nebyl typickou součástí serotonergní soustavy. Serotonin jsou tedy zřejmě schopny produkovat i neurony, které obvykle využívají jiné neurotransmitery.

Zakládání neuropile a tvorba podélných a příčných nervových provazců byla u volně žijících zástupců Platyhelminthes sledována prostřednictvím acetylovaného α -tubulinu přítomného v axonech (Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2001). V raném embryonálním vývoji nervové soustavy redií a cercárií *F. magna* nebyl výskyt acetylovaného α -tubulinu zaznamenán, proto tato metoda nemohla být při studiu morfogeneze širěji uplatněna. Relativně časný vznik svazků axonů obsahujících tubulinová vlákna na obvodu hlitanu redií a v okolí ústní přísavky cercárií poukázal na opožděný vývoj a nízké zastoupení axonů serotonergních neuronů v těchto oblastech.

6.4. Morfogeneze vylučovací soustavy redií druhé generace a cercárií *F. magna*

Studie zabývající se vznikem a vývojem vylučovací soustavy motolic se dosud omezovaly na metody světelné a méně často i transmisní elektronové mikroskopie (Kuntz, 1950, 1951, 1952; Powell, 1973). Jejich hlavním cílem bylo získat morfologické údaje potřebné k vyhodnocení vzájemné fylogenetické příbuznosti čeledí motolic v rámci skupiny Digenea (La Rue, 1957). K tomuto účelu měla sloužit podrobná znalost změn uspořádání cyrtocytů, kanálků vylučovací soustavy a utváření močového měchýře v embryonálním vývoji cercárií (Faust, 1932; La Rue, 1957). Vývoj vylučovací soustavy redií, které nezískaly pro fylogenetiku motolic větší význam zůstal opomenutý.

Moderní metody značení cyrtocytů a kanálků vylučovací soustavy prostřednictvím protilátek namířených proti tubulinovým vláknům (acetylovaný α -tubulin) byly úspěšně

aplikovány při studiu morfogeneze vylučovací soustavy volně žijících zástupců skupiny Platyhelminthes (Hartenstein a Ehlers, 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2000; Cardona a kol., 2005). Stejné metody byly použity i v experimentální části diplomové práce pro studium vzniku a utváření vylučovací soustavy redií a cercárií motolice *F. magna*. Na rozdíl od volně žijících zástupců, u kterých bylo od počátku zakládání vylučovací soustavy možné pozorovat formování systému kanálků díky přítomnosti tubulinu v buňkách jeho primordia, u redií a cercárií *F. magna* byl tubulin zaznamenán pouze ve svazcích cilií cyrtocytů (redie a cercárie) a svazcích cilií vzestupných částí hlavních sběrných kanálků (cercárie). Na základě orientace a uspořádání cyrtocytů bylo však možné přítomnost kanálků nepřímo odvozovat. K tomuto účelu částečně dopomohlo i úspěšné značení exkrecečního měchýře a sestupných částí hlavních sběrných kanálků cercárií pomocí fluorescenční sondy namířené proti F-aktinu přítomnému v jejich stěnách.

Tubulinové struktury vylučovací soustavy redií a cercárií *F. magna* byly poprvé zaznamenány v podobě podlouhlých párových útvarů po stranách těla. Zatímco u redií se z těchto útvarů přímo vyvinuly svazky cilií prvního páru cyrtocytů, u cercárií došlo nejprve k jeho rozdělení na 2 části. První představovala stejně jako u redií cilie prvního páru cyrtocytů, zatímco druhá byla základem budoucích svazků cilií hlavních sběrných kanálků. Zakládání vylučovací soustavy v jediném párovém primordiu koresponduje s výsledky studií provedených na cercáriích motolic a na volně žijících zástupcích skupiny Platyhelminthes. Pozorování zárodků cercárií motolic pomocí světelné mikroskopie ukázalo, že se jejich vylučovací soustava zakládá v podobě 1 páru cyrtocytů umístěných na konci krátkých primordií budoucích hlavních sběrných kanálků. Ta se v dalším vývoji prodlužují posteriorním směrem, až vyústí na povrchu těla v oblasti budoucího ocásku (Hussey, 1943; Kuntz 1950, 1951, 1957). Podobný vývoj lze předpokládat i u redií motolic čeledi Fasciolidae, u kterých bylo (po dokončení morfogeneze) pozorováno vyústění páru hlavních sběrných kanálků po stranách zadní části těla. Hlavní sběrné kanálky u nich nesplývají, ani nevstupují do exkrecečního měchýře (Barlow, 1925). U ploštěnek skupin Rhabdocoela a Polycladida bylo pozorováno primordium kanálku vylučovací soustavy v podobě párových dutých útvarů po stranách těla vzniklých z prekurozorových buněk, původně rozptýlených v těle zárodku (Hartenstein a Ehlers, 2000; Younossi-Hartenstein a Hartenstein, 2000; Younossi-Hartenstein a kol., 2000).

Další vývoj redií a cercárií spočíval ve vzniku cilií druhého páru cyrtocytů v kolmé

orientaci na pár původní a jejich vzájemné oddálení v anteroposteriorní ose. Z pozorování jiných autorů vyplývá, že se jedná o rozdvojení terminální části „hlavního sběrného kanálku“ na anteriorní a posteriorní větev „sběrných kanálků“ (Obr. 9A.). Oddálení cyrtocytů v podélné ose odpovídá růstu sběrných kanálků, na jejichž konci jsou cyrtocyty umístěny (Kuntz, 1957; Hussey, 1943). Na základě práce Kuntz (1957) provedené na blízkce příbuzné motolici *Fasciola gigantica* bylo možné ve vývoji cercárie *F. magna* sledovat místo bifurkace hlavního sběrného kanálku v podobě posteriorního konce řady svazků cilií jeho vzestupných částí.

Pozdější fáze vývoje vylučovací soustavy probíhala u cercárií a redií *F. magna* mírně odlišně. U redií docházelo ke vzniku nových cyrtocytů pouze v blízkém okolí konce anteriorních a posteriorních sběrných kanálků. Z uspořádání svazků cilií nově vzniklých cyrtocytů je možné usuzovat, že se konce sběrných kanálků dále větví, dokud okolo sebe nevytvoří trs 14–16 krátkých kanálků zakončených cyrtocyty.

U cercárií se postupně vytváří 6 párů skupin po třech cyrtocytech. Z průběhu změn v jejich uspořádání ve vývoji cercárie bylo odvozeno, že se každý ze 4 sběrných kanálků rozděluje na 3 nové větve a ty posléze opět na 3 další krátké kanálky, na jejichž konci jsou cyrtocyty umístěny a které zároveň představují výše zmíněné skupiny.

Ke vzniku exkrecečního měchýře cercárií motolic dochází rozšířením nepárového kanálku v zadní části těla. Tento kanálek představují větve hlavního sběrného kanálku, které v průběhu vývoje cercárie v této části těla splývají (Kuntz, 1950, 1951). Ve vývoji cercárie *F. magna* byl díky přítomnosti podélných svalových vláken ve stěně sestupných částí hlavních sběrných kanálků zaznamenán stav, kdy hlavní sběrné kanálky již splynuly, ale exkreceční měchýř nebyl dosud vytvořen. V souladu s pozorováními u jiných druhů motolic se nepárový kanálek v pozdějším stádiu vývoje rozšířil (Kuntz, 1950, 1951). V jeho stěně vznikla okružní svalová vlákna, která se v místě splnutí a v blízkosti konce tělní části cercárie vyvinula do podoby svěračů. Zřejmě od tohoto okamžiku mohl nepárový hlavní sběrný kanálek začít plnit funkci exkrecečního měchýře.

V jediném případě vyvinuté dceřiné redie byl zaznamenán otvor v tělní stěně ležící mírně anteriorně od procruscul s okružní svalovinou vytvořenou po jeho obvodu. Příslušnost tohoto otvoru k vylučovací soustavě byla zvažována jako možné vyústění hlavních sběrných kanálků pozorované v párové podobě u redie motolice *Fasciolopsis buski* (Barlow, 1925). Posléze bylo usouzeno, že se o vyústění vylučovací soustavy spíše nejedná. Svědčí o tom zejména nepárové uspořádání a absence u jiných jedinců dceřiných

redí. Povaha této struktury není zřejmá, mohlo by se však jednat například o defekt během vývoje tělní stěny.

7. Závěr

Tato práce popisuje mechanismy rozmnožování motolice *Fascioloides magna* v mezihostitelském plži a na příkladu svalové, nervové a vylučovací soustavy sleduje embryonální vývoj redií a cercárií – životních stádií, které během procesu rozmnožování vznikají.

Dosažené výsledky

Rozmnožování motolice *F. magna* v mezihostitelském plži

1. V miracidiích a rediích byla zaznamenána přítomnost buněk, které svou morfologií odpovídají kmenovým a „zárodečným“ buňkám zodpovědným za rozmnožování motolic v mezihostitelském plži.
2. V rediích nebyla potvrzena přítomnost zárodečné hmoty.
3. V zadní části těla redie byly nalezeny dvoubuněčné útvary, které pravděpodobně představují zárodek po prvním nerovnoměrném („unequal“) dělení „zárodečné“ buňky.
4. Metody specifického značení proliferujících buněk zachytily jádra volně uložená v blízkosti tělní stěny plně vyvinutých dceřiných redií. V závislosti na metodice značení se mohlo se jednat: 1) o kmenové buňky zodpovědné za reprodukci redie, „zárodečné“ buňky a kmenové buňky podílející se na regeneraci a výstavbě tkání (neoblasty), nebo 2) o všechny zmíněné typy buněk a navíc somatické buňky redie vzniklé buněčným dělením a následnou diferenciací v průběhu doby, kdy bylo značení prováděno.

Morfogeneze svalové, nervové a vylučovací soustavy redií a cercárií *F. magna*

1. Vývoj svalové soustavy redií a cercárií je charakteristický opožděným vývojem podélné svaloviny tělní stěny ve srovnání se svalovinou okružní.
2. Ve vývoji vylučovací soustavy redií a cercárií byl pozorován vznik nových svazků cílií cyrtocytů v těsné blízkosti svazků již přítomných. Tato skutečnost zřejmě reflektuje rozdělení terminální části kanálku na 2 nové větve.
3. Serotonergní nervová soustava redií a cercárií se zakládá po stranách těla zárodka v podobě těl neuronů vysílajících axony anteriorním a posteriorním směrem.

Publikace vzniklé v průběhu vypracování diplomové práce:

- Kašný M, Beran L, Siegelová V, Siegel T, Leontovyč R, Beránková K, Pankrác J, Košťáková M, Horák P. 2012.** Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Veterinary Medicine*, **57**: 101–109.
- Leontovyč R, Košťáková M, Siegelová V, Melounová K, Pankrác J, Vrbová K, Horák P, Kašný M. 2014.** Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC Veterinary Research*, **10**: 1–7.
- Novobilský A, Kašný M, Pankrác J, Rondelaud D, Engström A, Höglund J. 2012.** *Lymnaea fusca* (Pfeiffer, 1821) as a potential intermediate host of *Fascioloides magna* in Europe. *Experimental Parasitology*, **132**: 282–286.
- Rondelaud D, Novobilský A, Höglund J, Kašný M, Pankrác J, Vignoles P, Dreyfuss G. 2013.** Growth rate of the intermediate snail host *Galba truncatula* influences redial development of the trematode *Fascioloides magna*. *Journal of Helminthology*, **28**: 1–7.
- Sanabria R, Mouzet R, Pankrác J, Teukeng FFD, Courtioux B, Novobilský A, Höglund J, Kašný M, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D, Romero J. 2013.** *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix*, potential intermediate hosts for *Fascioloides magna*. *Journal of Helminthology*, **87**: 494–500.
- Siegelová V, Pankrác J, Košťáková M, Melounová K, Siegel T, Leontovyč R, Kašný, M. 2012.** Nález motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u skotu a zhodnocení rizik fascioloidózy v České republice. *Veterinářství*, **7**: 440–443.
- Vignoles P, Novobilský A, Höglund J, Kašný M, Pankrác J, Dreyfuss G, Pointier JP, Rondelaud D. 2014.** *Lymnaea cubensis*, an experimental intermediate host for *Fascioloides magna*. *Folia Parasitologica*, v tisku.

Seznam použité literatury

- Ameel DJ, Cort WW, Van der Woude A. 1950.** Germinal development in the heterophyid, *Euryhelmis monorchis* Ameel, 1938. *The Journal of Parasitology*, **36**: 427–432.
- Arendt D, Nubler-Jung K. 1999.** Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development*, **126**: 2309–2325.
- Ataev GL, Dobrovolskij AA, Avanesian AV, Loker ES. 2001.** Germinal elements and their development in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma paraensei* (Trematoda) miracidia. *Journal of Parasitology*, **87**: 1160–1164.
- Barlow CH. 1925.** Life cycle of the human intestinal fluke *Fasciolopsis buski* (Lankester). *American Journal of Hygiene*, Monograph Series No. **4**: 1–98.
- Bartolomaeus T, Ax P. 1992.** Protonephridia and metanephridia-their relation within the Bilateria. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **30**: 21–45.
- Bolaños DM, Litvaitis MK. 2009.** Embryonic muscle development in direct and indirect developing marine flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). *Evolution and Development*, **11**: 290–301.
- Brooks FG. 1930.** Studies on the germ cell cycle of trematodes. *American Journal of Hygiene*, **12**: 299–340.
- Cable RM. 1934.** Studies on the germ-cell cycle of *Cryptocotyle lingua*. II. Germinal development in the larval stages. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **76**: 573–614.
- Cardell RR. 1962.** Observations on the ultrastructure of the body of the cercaria of *Himasthla quissetensis* (Miller and Northup, 1926). *Transactions of the American Microscopical Society*, **81**: 124–131.
- Cardona A, Hartenstein V, Romero R. 2005.** The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. *Development Genes and Evolution*, **215**: 109–131.
- Cebrià F, Vispo M, Newmark P, Bueno D, Romero R. 1997.** Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Development Genes and Evolution* **207**: 306–316.
- Chen PD. 1937.** The germ cell cycle in the trematode, *Paragonimus kellicotti* Ward. *Transactions of the American Microscopical Society*, **56**: 208–236.

- Ciordia H. 1956.** Cytological studies of the germ cell cycle of the trematode family Bucephalidae. *Transactions of the American Microscopical Society*, **75**: 103–116.
- Clark WC. 1974.** Interpretation of life history pattern in the Digenea. *International Journal for Parasitology*, **4**: 115–123.
- Coil WH. 1977.** The penetration of *Fascioloides magna* miracidia into the snail host *Fossaria bulimoides*. A scanning electron microscope study. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **52**: 53–59.
- Coil WH. 1981.** Miracidial penetration in *Fascioloides magna* (Trematoda). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **65**: 299–307.
- Collins JJ, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. 2011.** An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS neglected tropical diseases*, **5**: e1009.
- Collins JJ, Wang B, Lambrus BG, Tharp ME, Iyer H., Newmark PA. 2013.** Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature*, **494**: 476–479.
- Cook CE, Jiménez E, Akam M, Saló E. 2004.** The Hox gene complement of acoel flatworms, a basal bilaterian clade. *Evolution and Development*, **6**: 154–163.
- Cort WW. 1917.** Homologies of the excretory system of the forked-tailed cercariae: A Preliminary Report. *The Journal of Parasitology*, **4**: 49–57.
- Cort WW, Ameel DJ, Van der Woude A. 1954.** Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes. *Experimental Parasitology*, **3**: 185–225.
- Czubaj A, Niewiadomska K. 1996.** Structure and TEM ultrastructure of the excretory system of the cercaria and daughter sporocyst of *Diplastomum pseudospathaceum* Niew., 1984 (Digenea, Diplostomidae). *Acta Parasitologica*, **41**: 167–181.
- Dinnik JA, Dinnik NN. 1956.** Observations on the succession of redial generations of *Fasciola gigantica* Cobbold in a snail host. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, **7**: 397–419.
- Dobrovolskij AA, Galaktionov KV. 2003.** The biology and evolution of trematodes. Dordrecht, Boston, London; Kluwer Academic Publisher.
- Erhardová-Kotrlá B. 1971.** The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Prague; Academia.
- Extavour CG, Akam M. 2003.** Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, **130**: 5869–5884.

- Faltýnková A, Horáčková E, Hirtová L, Novobilský A, Modrý D, Scholz T. 2006.** Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica*, **51**: 87–90.
- Faust EC. 1918.** Studies on Illinois cercariae. *The Journal of Parasitology*, **4**: 93–110.
- Faust EC. 1932.** The excretory system as a method of classification of digenetic trematodes. *The Quarterly Review of Biology*, **7**: 458–468.
- Foreyt WJ, Leathers CW. 1980.** Experimental infection of domestic goats with *Fascioloides magna*. *American Journal of Veterinary Research*, **41**: 883–884.
- Galaktionov KV. 1993.** Life cycles of trematodes as components of ecosystems. Apatity; Kola scientific centre of the russian academy of sciences publisher.* (rusky)
- Galaktionov KV, Dobrovolskij AA. 1987.** Hermafroditic generation of trematodes. Leningrad; Nauka.* (rusky)
- Gibson DI. 1987.** Questions in digenean systematics and evolution. *Parasitology*, **95**: 429–460.
- Griffiths HJ. 1959.** *Stagnicola (Hinckleyia) caperata* (Say), a natural intermediate host for *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), in Minnesota. *Journal of Parasitology*, **45**: 146.
- Guilford HG. 1958.** Observations on the development of the miracidium and the germ cell cycle in *Heronimus chelydrae* MacCallum (Trematoda). *The Journal of Parasitology*, **44**: 64–74.
- Haight M, Davidson D, Pasternak J. 1977a.** Relationship between nuclear morphology and the phases of the cell cycle during cercarial development of the digenetic trematode *Trichobilharzia ocellata*. *The Journal of Parasitology*, **63**: 267–273.
- Haight M, Davidson D, Pasternak J. 1977b.** Cell cycle analysis in developing cercariae of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae). *The Journal of Parasitology*, **63**: 274–281.
- Halton DW, Maule AG. 2004.** Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Canadian Journal of Zoology*, **82**: 316–333.
- Hartenstein V, Ehlers U. 2000.** The embryonic development of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma lingua* (Abildgaard, 1789). *Development Genes and Evolution*, **210**: 399–415.
- Hussey KL. 1941.** Comparative embryological development of the excretory system in digenetic trematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, **60**: 171–210.

- Hussey KL. 1943.** Further studies on the comparative embryological development of the excretory system in digenetic trematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, **62**: 271–279.
- Irwin SWB, Galaktionov KV, Malkova II, Saville DH, Fitzpatrick SM. 2003.** An ultrastructural study of reproduction in the parthenogenetic metacercariae of *Cercaria margaritensis* Ching, 1982 (Digenea: Gymnophallidae). *Parasitology*, **126**: 261–271.
- Jacob MH. 1984.** Neurogenesis in *Aplysia californica* resembles nervous system formation in vertebrates. *The Journal of Neuroscience*, **4**: 1225–1239.
- James BL, Bowers EA. 1967.** Reproduction in the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Bucephalidae) and *Cercaria dichotoma* Lebour, 1911 (non Müller) (Gymnophallidae). *Parasitology*, **57**: 607–625.
- Khalil GM, Cable RM. 1968.** Germinal development in *Philophthalmus megalurus* (Cort, 1914) (Trematoda: Digenea). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **31**: 211–231.
- Koziol U, Krohne G, Brehm K. 2013.** Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. *Frontiers in Zoology*, **10**: 24.
- Krull WH. 1933.** A new intermediate host for *Fascioloides magna* (Bassi, 1873) Ward, 1917. *Science*, **78**: 508–509.
- Krull WH. 1934.** The intermediate hosts of *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in the United States. *North American Veterinary*, **15**: 13–17.
- Kuntz RE. 1950.** Embryonic development of the excretory system in fork-tailed cercariae of the schistosomes and in a blunt-tailed brachylaemid cercaria. *Transactions of the American Microscopical Society*, **69**: 1–20.
- Kuntz RE. 1951.** Embryonic development of the excretory system in a psilostome cercaria, a gymnocephalous (Fasciolid) cercaria and in three monostome cercariae. *Transactions of the American Microscopical Society*, **70**: 95–118.
- Kuntz RE. 1952.** Embryonic development of the excretory system in a pleurolophocercous (acanthostomatid) cercaria, three stylet cercariae (a microcercous cercaria, a brevicaudate, and a longicaudate dicrocoeliid cercaria) and in a microcaudate eucotyloid cercaria. *Transactions of the American Microscopical Society*, **71**: 45–81.
- Kuntz RE. 1957.** Development of the cercaria of *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855, with emphasis on the excretory system. *Transactions of the American Microscopical Society*, **76**: 269–274.

- La Rue GR. 1957.** The classification of digenetic Trematoda: a review and a new system. *Experimental Parasitology*, **6**: 306–349.
- Ladurner P, Rieger R. 2000.** Embryonic muscle development of *Convoluta pulchra* (Turbellaria-Acoelomorpha, Platyhelminthes). *Developmental Biology*, **222**: 359–375.
- Ladurner P, Rieger R, Bagnà J. 2000.** Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine Platyhelminth *Macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. *Developmental biology*, **226**: 231–241.
- Laursen JR, Yoshino TP. 1999.** *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports in vitro miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology*, **118**: 187–194.
- Leontovyč R, Košťáková M, Siegelová V, Melounová K, Pankrác J, Vrbová K, Horák P, Kašný M. 2014.** Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC veterinary research*, **10**: 41.
- Mair GR, Maule AG, Day TA, Halton DW. 2000.** A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **121**: 163–170.
- Meuleman EA, Holzmann PJ, Peet RC. 1980.** The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **61**: 201–212.
- Meyer NP, Seaver EC. 2009.** Neurogenesis in an annelid: Characterization of brain neural precursors in the polychaete *Capitella* sp. I. *Developmental Biology*, **335**: 237–252.
- Money Penny CG, Kreshchenko N, Moffett CL, Halton DW, Day TA, Maule AG. 2001.** Physiological effects of FMRFamide-related peptides and classical transmitters on dispersed muscle fibres of the turbellarian, *Procerodes littoralis*. *Parasitology*, **122**: 447–455.
- Morris J, Nallur R, Ladurner P, Egger B, Rieger R, Hartenstein V. 2004.** The embryonic development of the flatworm *Macrostomum* sp. *Development Genes and Evolution*, **214**: 220–239.
- Newmark PA, Alvarado AS. 2000.** Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental Biology*, **220**: 142–153.
- Niewiadomska K, Czubaj A, Moczon T. 1996.** Cholinergic and aminergic nervous systems in developing cercariae and metacercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Digenea). *International Journal for Parasitology*, **26**: 161–168.

- Odening K. 1963.** Das Exkretorssystem monostomer Cercarien (Trematoda: Notocotyliidae) aus Gewässern von Berlin und Umgebung. *Limnologica*, **1**: 366–373.*
(německy)
- Pan JZ, Halton DW, Shaw C, Maule AG, Johnston CF. 1994.** Serotonin and neuropeptide immunoreactivities in the intramolluscan stages of three marine trematode parasites. *Parasitology research*, **80**: 388–395.
- Pearson JC. 1972.** A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea. *Advances in Parasitology*, **10**: 153–189.
- Pieper MB. 1953.** The life history and germ cell cycle of *Spirorchis artericola* (Ward, 1921). *The Journal of Parasitology*, **39**: 310–325.
- Podvyaznaya IM. 2007.** An ultrastructural study of reproduction in the sporocysts of *Prosohrhynchoides gracilescens* (Digenea: Bucephalidae). *Parasitology Research*, **101**: 35–42.
- Podvyaznaya IM, Galaktionov KV. 2008.** An ultrastructural study of the early cercarial development in *Prosohrhynchoides borealis* (Digenea: Bucephalidae) with special reference to formation of the primitive epithelium. *Journal of Helminthology*, **82**: 101–108.
- Podvyaznaya IM, Galaktionov KV. 2014.** Trematode reproduction in the molluscan host: an ultrastructural study of the germinal mass in the rediae of *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology Research*, **113**: 1215–1224.
- Powell EC. 1973.** Studies on the excretory “bladder” and caudal ducts of the supposed anepitheliocystid cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **43**: 43–52.
- Pullin RSV. 1971.** Composition of the haemolymph of *Lymnaea truncatula*, the snail host of *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **40**: 617–626.
- Reiter D, Ladurner P, Mair G, Salvenmoser W, Rieger R, Boyer B. 1996.** Differentiation of the body wall musculature in *Macrostomum hystricinum marinum* and *Hoploplana inquilina* (Plathelminthes), as models for muscle development in lower Spiralia. *Roux's Archives of Developmental Biology*, **205**: 410–423.
- Reuter M, Kreshchenko N. 2004.** Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Canadian Journal of Zoology*, **82**: 334–356.

- Reuter M, Mäntylä K, Gustafsson MK. 1998.** Organization of the orthogon–main and minor nerve cords. *Hydrobiologia*, **383**: 175–182.
- Rieger RM, Salvenmoser W, Legniti A, Reindl S, Adam H, Simonsberger P, Tyler S. 1991.** Organization and differentiation of the body-wall musculature in *Macrostomum* (Turbellaria, Macrostomidae). *Hydrobiologia*, **227**: 119–129.
- Rieger RM, Salvenmoser W, Legniti A, Tyler S. 1994.** Phalloidin-rhodamine preparations of *Macrostomum hystricinum marinum* (Plathelminthes): morphology and postembryonic development of the musculature. *Zoomorphology*, **114**: 133–147.
- Ruiz-Trillo I, Paps J, Loukota M, Ribera C, Jondelius U, Baguñà J, Riutort M. 2002.** A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 11246–11251.
- Saffman EE, Lasko P. 1999.** Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**: 1141–1163.
- Semmler H, Wanninger, A. 2010.** Myogenesis in two polyclad platyhelminths with indirect development, *Pseudoceros canadensis* and *Stylostomum sanjuania*. *Evolution and Development*, **12**: 210–221.
- Southgate VR. 1970.** Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **61**: 177–90.
- Stollewerk A, Chipman AD. 2006.** Neurogenesis in myriapods and chelicerates and its importance for understanding arthropod relationships. *Integrative and Comparative Biology*, **46**: 195–206.
- Swales WE. 1935.** The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants, in Canada, with observation on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. *Canadian Journal of Research*, **12**: 177–215.
- Swales WE. 1936.** Further studies on *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917, as a parasite of ruminants. *Canadian Journal of Research*, **14**: 83–95.
- Tyler S, Hooge M. 2004.** Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes). *Canadian Journal of Zoology*, **82**: 194–210.
- Vacek Z. 1988.** Histologie a histologická technika. Praha; Avicenum.

- Van der Woude A. 1954.** Germ cell cycle of *Megalodiscus temperatus* (Stafford, 1905) Harwood, 1932 (Paramphistomidae: Trematoda). *American Midland Naturalist*, **51**: 172–202.
- Vignoles P, Novobilský A, Rondelaud D, Bellet V, Treuil P, Koudela B, Dreyfuss G. 2006.** Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasitology Research*, **98**: 462–467.
- Whitfield PJ, Evans NA. 1983.** Parthenogenesis and asexual multiplication among parasitic platyhelminths. *Parasitology*, **86**: 121–160.
- Wilson RA, Pullin R, Denison J. 1971.** An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* **63**: 491–506.
- Wilson RA, Webster LA. 1974.** Protonephridia. *Biological Reviews*, **49**: 127–160.
- Younossi-Hartenstein A, Ehlers U, Hartenstein V. 2000.** Embryonic development of the nervous system of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma lingua* (Abildgaard, 1789). *Journal of Comparative Neurology*, **416**: 461–474.
- Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V. 2000.** The embryonic development of the polyclad flatworm *Imogine mcgrathi*. *Development Genes and Evolution*, **210**: 383–398.
- Younossi-Hartenstein A, Jones M, Hartenstein V. 2001.** Embryonic development of the nervous system of the temnocephalid flatworm *Craspedella pedum*. *Journal of Comparative Neurology*, **434**: 56–68.
- Žďárská Z. 1995.** Ultrastructure of the primitive epithelium of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) cercaria. *Folia Parasitologica*, **42**: 266–268.

*sekundární citace