

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra zoologie**



**Vývojová morfogeneze přichytných žláz a  
orgánů u nižších obratlovců**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Bc. Martin Minařík**

Vedoucí práce: Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha 2011

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Roberta Černého, Ph.D. a s použitím citované literatury.

V Praze dne 26.8.2011

.....

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli, Mgr. Robertu Černému, Ph.D., za veškeré užitečné rady týkající se diplomové práce i dalšího studia. Mé díky za pomoc a podnětné připomínky patří též známým a kolegům. Na závěr děkuji také rodičům a přítelkyni za trpělivost a podporu během mého studia.

## Abstrakt

Adhezivní orgány jsou mezi larvami obratlovců široce rozšířenými strukturami. Larvám umožňují přichycení k substrátu a tím prodloužení času nutného na vývoj úst či pohybového aparátu. Známý jsou také obdobné struktury u sumek, vršenek a dokonce u kopinatce. Nabízí se tedy myšlenka, že přítomnost určitého typu adhezivní žlázy by mohla být charakteristikou ancestrálního stavu larev strunatců. Zatímco však u většiny druhů jsou tyto žlázy odvozeny od ektodermu, u bichira, zástupce bazální skupiny paprskoploutvých ryb, byl již na počátku 20. století popsán jejich entodermální původ. Původní studie však od té doby téměř upadla v zapomnění a ani recentní práce na toto téma nepřicházejí s novými poznatky. Kvůli zásadnímu přínosu studia entodermálního adhezivního orgánu bichira pro pochopení vztahů mezi tímto typem struktur u strunatců obecně, jsem se rozhodl na tento problém zaměřit. Pro získání vhodných komparativních dat byla do této studie zahrnuta také embrya drápatky, piskoře a žebrovníka. Kombinací imunohistochemických a histologických technik byl prokázán entodermální původ cementových orgánů bichira a detailně popsána jejich morfogeneze. Výsledky také naznačují, že přes odlišný původ se orgány bichira vyvíjejí v podobném tkáňovém kontextu jako cementová žláza drápatky. Také je však evidentní, že jejich morfogeneze nápadně upomíná na formování faryngeálních výchlipek. Pro posouzení homologie těchto orgánů s adhezivními orgány jiných typů bude nutné získat další data, nicméně zásadní význam detailního komparativního poznání morfogeneze cementových orgánů pro tyto úvahy je zřejmý.

## Abstract

Adhesive organs are widespread structures among vertebrate larvae. They allow the larvae to attach to a substrate, so that the time for the development of mouth or motoric apparatus could be prolonged. Similar structures in ascidians, larvaceans and lancelets are known too. Thus, it might be hypothesized that the presence of some type of adhesive gland could indeed represent the ancestral state for chordate larvae. Interestingly, however, whilst in most species these glands take their developmental origin in ectodermal layer, in bichir, a member of a primitive actinopterygian lineage, their origin was suggested to be endodermal already at the beginning of 20<sup>th</sup> century. Since then, however, the former study has become almost forgotten and even recent analyses do not come with new findings on this topic. Because of the essential importance of study of bichir cement glands for understanding the relationship between these structures among chordates, I have decided to focus on this subject. To obtain appropriate comparative data Clawed frog, Weather loach and Ribbed newt embryos were included in this study as well. By using combination of immunohistochemical and histological techniques the endodermal origin of cement glands in bichir was proven and their morphogenesis was described in considerable details. The results also reveal similarities within the developmental context in bichir and *Xenopus* cement glands, despite of their dissimilar embryonic origin. On the other hand, similarities between developmental morphogenesis of bichir cement gland and of pharyngeal pouches is conspicuous. It is clear that in order to establish levels of homology of these organs to other types of adhesive glands more data will be necessary. Yet the essential contribution of detailed knowledge of comparative morphogenesis of cement glands for homology level assessment seems to be obvious.

# 1 Obsah

1	Obsah .....	9
2	Úvod .....	11
3	Dosavadní poznatky .....	14
3.1	Charakteristika adhezivních orgánů .....	14
3.2	Systematický přehled .....	16
3.2.1	Sekretorické žlázy kopinatce .....	16
3.2.2	Adhezivní papily sumek .....	17
3.2.3	Orální žlázy vršenek .....	18
3.2.4	Cementové orgány dvojdyšných .....	19
3.2.5	Balancery ocasatých obojživelníků .....	20
3.2.6	Cementové žlázy žab .....	21
3.2.7	Cementové orgány bazálních paprskoploutvých ryb .....	23
3.2.8	Cementové žlázy kostnatých .....	24
3.3	Genová regulace vzniku adhezivních žláz .....	26
4	Materiál a metody .....	31
4.1	Embrya .....	31
4.2	SEM .....	31
4.3	Extirpace ektodermu .....	32
4.4	Zpracování embryí na řezech .....	32
4.5	Imunohistochemie .....	33
4.6	PAS .....	34
4.7	Mikroskopická technika a zpracování dat .....	34
5	Výsledky .....	36
5.1	Povrchová morfologie (SEM) .....	36
5.1.1	Bichir <i>Polypterus senegalus</i> .....	36
5.1.2	Drápatka <i>Xenopus laevis</i> .....	37

---

5.1.3	Piskoř <i>Misgurnus fossilis</i> .....	37
5.1.4	Žebrovník <i>Pleurodeles waltl</i> .....	38
5.2	JB-4 histologie.....	39
5.2.1	Bichir <i>Polypterus senegalus</i> .....	39
5.2.2	Drápatka <i>Xenopus laevis</i> .....	40
5.2.3	Piskoř <i>Misgurnus fossilis</i> .....	41
5.3	Imunohistochemické značení fibronektinu .....	41
5.3.1	Bichir <i>Polypterus senegalus</i> .....	41
5.3.2	Drápatka <i>Xenopus laevis</i> .....	42
5.3.3	Piskoř <i>Misgurnus fossilis</i> .....	43
5.4	Značení mukopolysacharidů metodou PAS .....	43
5.4.1	Bichir <i>Polypterus senegalus</i> .....	43
5.4.2	Drápatka <i>Xenopus laevis</i> .....	44
5.4.3	Piskoř <i>Misgurnus fossilis</i> .....	44
6	Diskuse .....	46
6.1	Fylogenetika .....	46
6.2	Vnější morfologie.....	47
6.3	Histologie .....	50
6.4	Imunohistochemie .....	51
6.5	Barvení PAS.....	54
6.6	Teoretický rámec pro posouzení homologie .....	55
7	Závěr.....	59
8	Seznam použité literatury .....	62
8.1	Nepřímé citace.....	68
Přílohy.....		I
Seznam obrázků .....		I
Použité zkratky.....		II

## 2 Úvod

S různými typy adhezivních orgánů (také nazývaných cementové) se setkáváme u larválních stádií řady ve vodě se vyvíjejících obratlovců. Podobné struktury dokonce nacházíme u sumek (Ascidiacea, Tunicata; Sotgia et al., 1998; Katz, 1983), tedy sesterské skupiny obratlovců, kterým slouží k přichycení k podkladu na počátku metamorfózy, nebo larev kopinatců, u kterých se účastní příjmu potravy (Webb, 1969). V případě kopinatců jde sice o funkčně podobné orgány, avšak jejich případná homologie je zcela nejasná.

U larev obratlovců se obvykle jedná o naprosto zásadní larvální strukturu jak z hlediska funkce, tak z hlediska morfogeneze hlavy. Přichytné orgány slouží k přichycení larvy k podkladu brzy po vylíhnutí, čímž umožňují setrvání na bezpečném a dobře okysličeném místě, dokud není larva schopna plně koordinovaného pohybu (Britz et al., 2000). Proto musí být plně vyvinuté již před vylíhnutím a často tak jsou prvním komplexním orgánem, který komunikuje s vnějším prostředím (Thibaudeau a Altig, 1999; Agassiz, 1878, podle Balfour a Parker, 1882; Britz et al., 2000). V raných stádiích vývoje tedy značně ovlivňují morfogenezi hlavy, ať už jako dočasná překážka v tvorbě dalších hlavových struktur, nebo naopak aktivní struktura, přizpůsobující svému vývoji dynamiku zárodečných vrstev (Kerr, 1907), cévního zásobení a inervace (Sauka-Spengler et al., 2002).

Přichytné orgány byly studovány na celé řadě organismů od bazálních skupin kostnatých ryb (Kerr, 1907; Eycleshymer a Wilson, 1908), přes ryby paprskoploutvé (např. Britz et al., 2000; Gropelli et al., 2003) a dvojdyšné (Kerr, 1900; Budgett, 1901), až po ocasaté obojživelníky (Crawford a Wake, 1998) a žáby (např. Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005). Jedná se vždy o nápadně zvětšené, vertikálně protažené sekretorické buňky, uložené jednotlivě, ve shlucích, nebo uspořádané do různě komplexních orgánů (Britz et al., 2000). Není však jisté, zda tyto sdílené vlastnosti vypovídají o společném původu, nebo jsou pouze odrazem přizpůsobení buněk ke kontinuální produkci mukózního sekretu po dobu používání orgánu. Nabízí se srovnání s kožními mukózními žlázkami u ryb, které by mohly podobné vlastnosti také vykazovat, a z nichž by případně přichytné orgány mohly například u paprskoploutvých ryb vznikat nezávisle (Britz et al., 2000). Dále se zdá, že alespoň u některých skupin (kaproun *Amia calva*, bichíři (Polypteriformes) a jeseteři (Acipenseriformes)) vznikají cementové orgány z entodermu, nejprve jako váčky v jeho přední části, které se posléze oddělí a doputují na přední stranu



hlavy, kde se otevřou do vnějšího prostředí (Kerr, 1907; Eycleshymer a Wilson, 1908). To je v přímém kontrastu s tím, co víme o přichytných orgánech ostatních skupin, u kterých by měly vznikat specializací buněk ektodermu.

Přestože napříč různými skupinami obratlovců s vodními larvami plní tyto orgány obdobnou funkci v obdobné fázi larválního vývoje, otázka jejich homologie zůstává zcela nezodpovězena a autoři se k ní obvykle ani příliš nevyjadřují. Vzhledem k důležitosti cementových orgánů v embryonálním vývoji a jejich potenciálu stát se vhodným modelovým orgánem pro studium morfogeneze hlavových struktur (jak už se ostatně stalo v případě adhezivního orgánu drápatky (Picard, 1975a, b)) jsem se tedy rozhodl na problém zaměřit. Při známé variabilitě umístění a počtu přichytných orgánů, jejich rozdílném embryonálním původu (ektoderm vs. entoderm (Nieuwkoop a Faber, 1967; Kerr, 1907)) a odlišnostech v morfologii (Britz et al., 2000) se nakonec jeví jako zajímavý modelový orgán pro vlastní studium homologie, respektive jejich různých možných úrovní, ať už pomocí metod klasické morfologie a histologie, studia inervace a cévního zásobení, identifikace příspěvku zárodečných vrstev nebo odhalení vzorů genové exprese.

V této diplomové práci jsem se pokusil co nejdetailněji prostudovat a popsat morfogenezi přichytných orgánů u larev několika druhů obratlovců. Práce byla zaměřena především na morfogenezi entodermálních cementových orgánů bichira *Polypterus senegalus* a jejich vliv na ostatní hlavové struktury. Cementové orgány bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) popsal počátkem minulého století Kerr (1907). Od té doby se jimi však nikdo detailně nezabýval. Za srovnávací modelový organismus pak byla zvolena drápatka *Xenopus laevis*, u níž jsou zatím cementové žlázy prostudovány nejpodrobněji, jak z hlediska morfologie a morfogeneze (Nieuwkoop & Faber, 1967; van Evercooren & Picard, 1978), tak exprese genů (např. Dickinson & Sive, 2007). Přichytný orgán drápatky je však v rámci žab poněkud atypický a drápatka obecně vykazuje značně specializovanou morfologii (Nokhbatolfighahai a Downie, 2005). Do studie jsem tedy zahrnul také další druhy, aby bylo spektrum odlišných typů přichytných orgánů co nejširší a nejreprezentativnější. Jako materiál pro srovnání tedy posloužil další zástupce paprskoploutvých ryb, tentokrát kostnatých, piskoř *Misgurnus fossilis*, jehož cementová žláza představuje svou pozicí a morfologií odlišný typ adhezivního orgánu. Pro úplnost bylo nutné zahrnout také zástupce ocasatých obojživelníků, jejichž přichytné orgány, zvané balancery (Duellman a Trueb, 1986) se od přichytných struktur ostatních skupin značně liší. Použit byl tedy dostupný embryonální materiál žebrovníka *Pleurodeles waltl*.

Pro nedostatek vzorků však nebylo možné tento druh prozkoumat všemi dostupnými technikami.

Sesbíraná embrya jsem zpracoval pomocí histologických, imunohistochemických a mikroskopických technik s cílem co nejpřesněji popsat morfologii, morfogenezi a histologii orgánů v kontextu hlavových struktur a inervace a připravit tak půdu pro následující experimentální práci. Již na základě takto získaných dat by bylo možné se k otázce homologie orgánů vyjadřovat, nicméně vzhledem ke komplikovanosti celého konceptu homologie bude pro důkladnější vhléd do problému nutné zavedení dalších experimentálních a molekulárně-biologických technik. Cílem této komparativní studie bylo tedy především odhalení společných a rozdílných charakteristik přichytných orgánů u zvolených organismů a vyslovení prvních možných argumentů pro i proti homologii těchto struktur, případně formulování dalších hypotéz hodných posouzení v práci následující.

Pro lepší orientaci v textu je na tomto místě také třeba objasnit používanou terminologii. Pro adhezivní orgány strunatců, respektive obratlovců, se vžila celá řada termínů, používaných s různou frekvencí v závislosti na skupině popisovaných organismů. Tato práce si neklade za cíl názvosloví sjednocovat už jen proto, že odráží zřetelnou rozmanitost těchto struktur. Nicméně při popisu byly voleny obvykle termíny v dané skupině nejvíce zažitě. U sumek je tak užíváno označení adhezivní papila (např. Sotgia et al., 1998), u žab cementová žláza (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005), u bichira a ostatních paprskoploutvých pak cementový orgán (Kerr, 1907). U ocasatých obojživelníků je užíván anglický termín balancer (Duellman a Trueb, 1986), který na rozdíl od českého termínu „Rusconiho háčky“ (např. Zwach, 2009) mylně neodkazuje na dříve předpokládaný mechanismus uchycení k substrátu (Fox, 1985). Obecně je pak pojednáváno o adhezivních orgánech, případně žlázách. Za zmínku stojí také další hlavové žlázy řady larev obratlovců, tzv. „hatching gland“. Ty slouží k rozrušení vaječných obalů během líhnutí (Drysdale & Elinson, 1993). Jedná se tedy o odlišné orgány a tato práce se jimi nezabývá.

### 3 Dosavadní poznatky

#### 3.1 Charakteristika adhezivních orgánů

Vodní larvy mnoha skupin obratlovců se po vylíhnutí z vajíčka vyznačují schopností adheze k substrátu, vodním rostlinám či vodní hladině. Často si tak zajišťují setrvání v bezpečném úkrytu, v okysličené vodě, nebo získávají čas k dokončení vývoje složitějších orgánů, například končetin a trávicí soustavy (Britz et al., 2000). Za tímto účelem jim slouží rozmanité adhezivní orgány (jindy nazývané také cementové orgány či žlázy), jejichž základním charakteristikám u jednotlivých skupin obratlovců se bude věnovat obsah této kapitoly (podrobný přehled viz také bakalářská práce Minařík, 2009).

Jak vyplývá z dalšího textu, adhezivní orgány není snadné definovat. Důvodem je jejich značná morfologická rozmanitost a především ne zcela jasná homologie v rámci strunatců, případně obratlovců. Orgány se mezi sebou často liší polohou, počtem nebo složitostí vnitřního uspořádání (Britz et al., 2000, Gropelli et al., 2003). Zásadní problém představuje také jejich nejednotný embryonální původ. Zatímco sekretorické buňky cementové žlázy drápatky mají původ ve svrchní vrstvě dvouvrstevného ektodermu (Nieuwkoop & Faber, 1967), odpovídající buňky u cichlidy *Pterophyllum scalare* vznikají ve vrstvě spodní (Gropelli et al., 2003) a cementové orgány bichira a některých dalších bazálních paprskoploutvých jsou dokonce entodermální (Kerr, 1907; Eycleshymer & Wilson, 1908). Vždy se však jedná o struktury čistě larvální, které v dalším vývoji jedince zanikají. Jejich působnost je obvykle omezena na nejranější larvální stádia a vzhledem k tomu, že k adhezi dochází záhy po vylíhnutí, orgány musí být touto dobou již plně funkční. Z tohoto důvodu se zakládají v embryonálním vývoji poměrně brzy a u řady druhů se jedná o nejnápadnější a nejkompexnější útvary na hlavě embrya (Thibaudeau & Altig, 1999; Britz et al., 2000).

Většina společných charakteristik vyplývá ze samotné funkce orgánu, kterou je produkce adhezivního mukózního sekretu (Gropelli et al., 2003). Zvýšená sekretorická aktivita, zajišťovaná drsným endoplazmatickým retikulem, má za důsledek zatlačení jádra k bázi buňky. Produkty určené k sekreci se v cylindrických buňkách hromadí pod apikální membránou v četných váčcích (Benneman & Pietzsch-Rohrschneider, 1978). Zásadním předpokladem úspěšné adheze je samozřejmě také distribuce sekretu na co největší plochu adhezivního orgánu, případně hlavy pro zlepšení přilnavosti k podkladu. Tomu slouží různé modifikace povrchu buď samotných sekretorických, nebo různých

podpůrných buněk, které mohou být součástí orgánu. Může se jednat o cilie, starající se o distribuci mukózního sekretu (Pennati et al., 2000), dále různé typy hrbolků, výběžků a vrásnění povrchu, které slouží především ke zvětšení plochy určené k adhezi (Britz et al., 2000). U některých druhů (např. u cichlidy *Tilapia mariae* (Arnold et al., 1968)) dochází v rámci orgánu k další specializaci, část buněk sekretuje běžný typ adhezivního sekretu, jiné buňky se pak starají o produkci nosného vlákna, pomocí něhož se vylíhlé larvy zavěšují na vegetaci nebo vodní hladinu.

Stejně jako v celkovém uspořádání orgánu, i v modifikacích povrchu a specializaci jednotlivých částí adhezivních žláz tedy vidíme značnou variabilitu. Ze samotných cytologických charakteristik sekretujících buněk není možné usuzovat na homologii těchto orgánů, jelikož stavba buněk jednoduše odpovídá jejich sekretorické aktivitě a o společném původu nevypovídá. Podobně je tomu s inervací adhezivních orgánů, kterou se ve svých studiích zabývá řada autorů (např. Roberts & Blight, 1975; Crawford a Wake, 1998; GropPELLI et al., 2003). U mnohých druhů byla prokázána inervace větví trigeminálního nervu, která zajišťuje senzorickou funkci orgánů. Ta je nutná k zajištění takzvané „stopping response“ (Roberts & Blight, 1975; Pottin et al., 2010), tedy zastavení pohybu larvy po kontaktu se substrátem. Nicméně vzhledem k pozici orgánů se dá trigeminální inervace předpokládat jednoduše proto, že tento nerv inervuje většinu pokožky v přední části hlavy. Navíc se mezi jednotlivými druhy vždy nejedná o odpovídající větev nervu, což naznačuje, že orgán projevuje v průběhu vývoje obecnou schopnost atrahovat senzorická nervová vlákna, která mu leží nejbližší (Pottin et al., 2010).

Jedinou zcela zřejmou společnou charakteristikou adhezivních orgánů tak zůstává, že se jedná o přechodné larvální orgány, sloužící k adhezi pomocí mukózního sekretu. Posouzení vypovídací hodnoty ostatních společných znaků, stejně jako nalezení dalších náznaků homologického či analogického původu těchto struktur, je jedním z cílů této práce. V následujících podkapitolách uvádím přehled současných poznatků o adhezivních orgánech jednotlivých skupin strunatců, který je nutný k vyjevení rozmanitosti těchto orgánů.

## 3.2 Systematický přehled

### 3.2.1 Sekretorické žlázy kopinatce

Přestože vztah larválních sekretorických žláz kopinatce k adhezivním orgánům obratlovců je ještě méně jasný, než je tomu v jiných případech, je nezbytné je v tomto přehledu zmínit. Obecně se má za to, že sekretorické žlázy na přední straně těla se podílí na zachytávání a transportu částeczek potravy do trávicí trubice (Webb, 1969). Nicméně ne u všech je tato potravní role obecně přijímána. Na rostrálním konci larvy kopinatce nalezneme podobné žlázy hned čtyři. Preorální orgán (u dospělce nazývaný Hatschekova jamka), považovaný za homolog obratlovčí hypofýzy (Nozaki & Gorbmann, 1992), se u larev i dospělců prokazatelně podílí na zachytávání potravy pomocí sítě mukózních vláken (Lacalli, 2008), formovaných za pomoci obrvených buněk, jež jsou součástí orgánu. Shodnou úlohu má také endostyl. Podobná je role dalšího orgánu, v anglické literatuře snad pro jeho kyjovitý tvar nazývaného „club-shaped gland“. Žlázu tvoří dutá trubice, otevírající se na jedné straně do vnějšího prostředí, na druhé ústící do faryngu za oblastí, v níž je endostylem produkována mukózní síť k transportu potravy (Lacalli, 2008). Žláza tak přispívá svými produkty k dalšímu transportu potravy (Holland et al., 2009), případně napomáhá ke stabilizaci mukózní sítě vyrovnáváním tlaku vody, vstupující ústy (Lacalli, 2008). Důležité je, že v tomto případě se již jedná o čistě larvální orgán, který v průběhu metamorfózy zaniká (Holland et al., 2009). Zajímavá je především poslední, takzvaná rostrální sekretorická žláza. Ta je tvořena eliptickým zesílením epidermis na pravé ventrální straně rostrálního konce larvy kopinatce a sestává z typicky sekretorických, cylindrických buněk opatřených brvami (Stach, 2000). Vzhledem k pozici (na druhé straně hlavy vzhledem k ústům) je potravní role žlázy nepravděpodobná (Lacalli, 2008; srov. ale s Webb, 1969), nicméně ani adheze k substrátu příliš v úvahu nepřipadá, neboť larvy kopinatce tráví většinu života planktonně (Stokes, 1997; podle Stach, 2000). Poslední larvální strukturou, která bývá v souvislosti s adhezivními orgány zmiňována, je takzvaná orální papila (Stach, 2000), která však postrádá charakteristiky sekretorického epitelu (Andersson & Olsson, 1988).

Zatímco endostyl a kyjovitá žláza jsou entodermálního původu, Hatschekova jamka a rostrální sekretorická žláza jsou ektodermální. Druhá jmenovaná přitom byla často homologizována s adhezivními papilami sumek (viz níže) nebo dokonce cementovými orgány dvojdyšných a žab (Frankenberger, 1927). V tomto směru je

zajímavá taktéž přítomnost inervace rostrální sekretorické žlázy, kterou uvádí Lacalli (2008) a naznačuje možnost nervové kontroly sekretorické funkce. Naproti tomu Garstang (1928) v souvislosti s obdobnými strukturami u ostatních strunatců zmiňuje pouze kyjovitou žlázu (club shaped gland; viz níže).

### 3.2.2 Adhezivní papily sumek

Zatímco funkce některých larválních žláz kopinatce zůstává stále záhadou, o úloze adhezivních žláz sumek není pochyb. Tyto takzvané adhezivní papily jsou dobře známým orgánem, pomocí něhož se larva s počátkem metamorfózy přichytí ke zvolenému substrátu, aby na něm strávila zbytek života jako trvale přisedlý dospělec. Počet papil je mezi jednotlivými druhy variabilní (Sotgia et al., 1998).

Podrobně byly popsány například papily sumky *Phallusia mammilata*, které se skládají ze dvou typů buněk – periferních sekretorických a centrálních sensorických. V případě druhých zmiňovaných se zřejmě jedná o primární sensorické neurony, z nichž jsou vzruchy dále vedeny příslušnou větví papilárního nervu do mozkového ganglia. Sensorická funkce papil pravděpodobně hraje roli při výběru substrátu pro metamorfózu a při následné regulaci sekrece. Volba substrátu může být pro sumku zcela zásadní, neboť dospělí jedinci postrádají jakoukoli možnost pohybu. Stavba sekretorických buněk je v souladu s obecnými rysy platnými pro adhezivní orgány – buňky jsou protáhlé a apikální části vyplněné rozvinutým drsným endoplazmatickým retikulem. Celý orgán zůstává po většinu larválního života překryt tunikou, pod kterou se před metamorfózou hromadí mukózní sekret. Rozrušením tuniky na počátku metamorfózy dochází k uvolnění sekretu a adhezi larvy (Sotgia et al., 1998).

Otázkou homologie adhezivních papil s adhezivními orgány obratlovců se zabývala řada autorů (např. Frankenberger, 1927; Garstang, 1928; de Bernardi & Fascio, 1994, citováno podle Sive & Bradley, 1996). Celková morfologie a umístění svádí především k homologizaci s cementovými žlázami svaloploutvých (především žab a dvojdyšných), které se nachází v obdobné pozici ventrálně od úst. Z této skupiny je nejpečlivěji prostudována cementová žláza drápatky *Xenopus laevis*, která kromě pozice jeví další zajímavé podobnosti jako je sensorická funkce (Roberts & Blight, 1975) a původ ve svrchní vrstvě ektodermu (Dickinson & Sive, 2007). Veeman et al. (2010) ve své studii porovnávají morfogenezi orální oblasti sumky *Ciona savignyi* právě se situací

u drápatky. Výsledky ukazují, že buňky vznikajících adhezivních papil mají původ v anteriorní části neurální ploténky (konkurenční hypotéza předpokládala, že z této populace vzniká neurohypofýza, nikoli adhezivní orgán). Konkrétně se jedná o populaci ležící anteriorně od neuroporu, ze kterého záhy vzniká ústní otvor (Veeman et al., 2010). Kontinuita neuroporu a ústního otvoru u drápatky chybí, nicméně pozice vznikajících úst dle autorů ukazuje na shodný embryonální původ úst sumky a drápatky v místě anteriorního rozhraní neurální trubice a povrchového ektodermu. Na základě těchto zjištění pak Veeman et al. konstruuje hypotetický model „prastrunatce“, s ústy tvořícími se dorzálně od adhezivních papil (cementového orgánu), na styku s neurální trubicí.

### 3.2.3 Orální žlázy vršenek

Závěrem přehledu struktur bazálních strunatců, připomínajících adhezivní žlázy obratlovců, je nutné zmínit tzv. orální žlázy (oral glands) vršenek (Appendicularia). Jejich homologizací s adhezivními papilami sumek, ale i cementovými orgány bazálních paprskoploutvých se podrobně zabývá Garstang (1928). Jedná se o drobné párové, pravděpodobně jednobuněčné žlázy, které vykazují spojitost s bioluminiscencí schránky, již vršenky budují (Galt & Fenaux, 1990; podle Nishida, 2008). Garstang upozorňuje především na jejich entodermální původ a na tomto základě staví srovnání s cementovými orgány bichira. Taktéž však uvádí názory dalších autorů, kteří naznačují souvislost s adhezivními papilami sumek. V tomto případě elegantně vysvětluje nesouhlasný počet žláz u sumek opuštěním původního párového uspořádání orgánu a upozorňuje na práci, ve které Grave a Woodbridge (1924; podle Garstang, 1928) ukazují, že ventrální papila je inervována namísto vlastního nervu krátkou větví nervu papily pravé.

V souvislosti s úvahami o entodermálním původu orálních žláz vršenek a cementových orgánů bichira připomíná Garstang také výše zmiňovanou kyjovitou žlázu kopinatce, kterou pozdější práce do diskuze o adhezivních orgánech obvykle nezahrnují. Uvádí, že všechny tyto orgány by mohly mít společný původ z epikardií sumek, tedy divertikul spodní stěny faryngu, vznikajících posteriorně od endostylu. Jako další variantu pro bichira a kopinatce uvádí vznik modifikací žaberních štěrbin. V případě homologie všech typů adhezivních orgánů (zde uvažuje papily sumek, orální žlázy vršenek, cementové orgány bazálních paprskoploutvých a žlázy dvojdyšných a obojživelníků) navrhuje jako ancestrální stav popsany u bichira. Ektodermální adhezivní žlázy pak

vysvětluje ztrátou příspěvku entodermu do výsledné struktury. U vršenek naopak poukazuje na zachování ancestrální morfologie při ztrátě vlastní adhezivní funkce žláz. Autor se podivuje nad komplikovaností morfogeneze cementových orgánů bazálních paprskoploutvých, jež využívají entoderm v situaci, ve které ostatním skupinám slouží jednoduše modifikovaný ektoderm. Považuje za nepravděpodobné, že by tato skupina ryb za účelem adheze k substrátu vytvářela obvykle ektodermální cementový orgán z entodermu, a upřednostňuje spíše opačný scénář, tedy zjednodušení morfogeneze orgánu u ostatních skupin.

### 3.2.4 Cementové orgány dvojdyšných

Stav znalostí o adhezivních orgánech dvojdyšných je mnohem méně uspokojivý. Jejich vývoj byl sice do jisté míry popsán v rámci studia larválního vývoje druhu *Protopterus annectens* (Budgett, 1901), současné práce se však tomuto tématu zatím vyhýbají a chybí tak poznatky získané s využitím modernějších metod. Kromě afrického rodu *Protopterus* nacházíme cementové orgány také u amerického *Lepidosiren paradoxa*. U zbývajících druhů, australského *Neoceratodus forsteri*, adhezivní orgány nejsou známy.

Adheze larvám bahníků umožňuje uvnitř dospělci budovaného hnízda setrávat v lépe okysličených horních vrstvách vody (Budgett, 1901). Vnější morfologie orgánů je nápadně podobná cementovým žlázám některých druhů žab, například ropuchy obecné (*Bufo bufo*, viz Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). V obou případech se jedná o hluboký žlábek ve tvaru písmene V s hrotem směřujícím kaudálně. K sekreci dochází uvnitř tohoto žlábků a mukózní produkt je poté distribuován na okraje valu, kde dochází ke kontaktu se substrátem. Právě na základě obdobné funkce, vývoje i morfologie usuzuje Kerr (1900) na homologii mezi těmito strukturami u dvojdyšných a žab. U bahníků se žlázy v embryonálním vývoji zakládají později, přibližně ve stejné době jako žaberní oblouky, u žab je naproti tomu specializující se populace buněk patrná již před skončením neurulace (Sive a Bradley, 1996). Tyto rozdíly však mohou být důsledkem heterochronií, vyplývajících ze vzniku specializovaného larválního stádia žab. Detailní morfogeneze cementového orgánu bahníků zatím v dostupné literatuře prezentována nebyla, není tedy ani jisté, zda sekretorický epitel vzniká z vnější vrstvy ektodermu, jako je tomu u žab, nebo z vrstvy vnitřní, jako u některých skupin paprskoploutvých ryb.



### 3.2.5 Balancery ocasatých obojživelníků

Zcela výjimečné postavení mezi adhezivními orgány obratlovců zauímají tyčinkovité balancery ocasatých obojživelníků, v české literatuře známé jako Rusconiho háčky (Zwach, 2009). Jejich výskyt je určován především ekologickými nároky larev a omezuje se na ty skupiny, jež se rozmnožují ve stojatých vodách. Jedná se tedy o jednu z charakteristik larvy jezerního typu, vyznačující se též rozložitými vnějšími žábami a pomalejším vývojem končetin v důsledku méně zásobených vajíček. Larvy se líhnou beznohé, a jakmile začnou přijímat potravu, potřebnou oporu jim poskytnou právě balancery (Crawford & Wake, 1998). Vajíčka rheofilních druhů jsou naopak opatřena velkým množstvím žloutku, larvy se tedy líhnou s vyvinutými končetinami a dodatečnou podporu nevyžadují. Balancery dále chybí u bazální čeledi Sirenidae, ačkoli se rozmnožuje ve stojatých vodách. Na základě toho Crawford a Wake soudí, že balancer je evoluční novinkou pokročilejších čeledí a v průběhu evoluce u některých pokročilejších skupin došlo k jeho druhotné ztrátě. Zajímavou otázkou zůstává, jaký je vztah samotného sekretorického epitelu k cementovým žlázám žab, dvojdyšných, případně dalších obratlovců.

Vlastní kyjovitá adhezivní žláza je nesena dlouhou tyčinkou, vznikající v ektodermu posteroventrálně od oka (Brunelli et al., 2007). Její osu tvoří kolagenní vlákna, která zřejmě slouží k zajištění opory orgánu (Crawford & Wake, 1998). Buňky vnější vrstvy pokožky na koncích tyčinky vykazují znaky sekretorických buněk, vynikají rozvinutým drsným endoplazmatickým retikulem a Golgiho komplexem. Kromě sekretorických váčků se v cytoplazmě nacházejí také tuková a žloutková granula. Povrch buněk je pak oproti nesekretujícím částem balanceru nápadně specializovaný, zvrásněný a opatřený kuželovitými sekretorickými výběžky (Brunelli et al., 2007). Ty se s počátkem sekrece pokrývají mukózní vrstvou připravenou k adhezi.

Důležité je opět zmínit inervaci, které se různí autoři věnují v souvislosti s předpokládanou senzoricou funkcí balanceru (Crawford a Wake, 1998). Stejně jako u ostatních sledovaných skupin je zajišťována větví trigeminálního nervu – v tomto případě větví mandibulární (Fox, 1985). Inervace by mohla hrát roli při takzvané „stopping response“ popisované u drápatky (viz níže), uvažována je však také funkce chemoreceptivní (Crawford a Wake, 1998; Brunelli et al., 2007).

Vzhledem k atypické morfologii balancerů je homologizace s klasickými adhezivními orgány problematická. Noble (1931; podle Crawford a Wake, 1998) jako

argument pro homologii s cementovými žlázami žab uvádí shodnou inervaci. Sauka-Spengler et al. (2002) ukazují, že morfogeneze orgánu je v obou případech řízena mimo jiné genem *otx5*, avšak uvažují, že tento gen mohl být rekrutován nezávisle. Atrakce téhož nervu pak může být pouze druhotným důsledkem činnosti genu. K myšlence, že se jedná o evoluční novinku ocasatých, se přiklání také Crawford a Wake (1998), kteří uvádí, že zatímco balancery vznikají v ektodermu asociovaném s mandibulárním obloukem, cementové žlázy žab se zakládají v ektodermu hyoidního oblouku (Lieberkind, 1937; podle Crawford a Wake, 1998). Zde je však nutné poznamenat, že ve stádiu, kdy se adhezivní orgány u obou skupin zakládají, ústa nejsou morfologicky definována (Dickinson & Sive, 2007), podobné úvahy tak zřejmě vycházejí ze situace u pozdějších stádií, která však v tomto směru postrádají výpovědní hodnotu.

### 3.2.6 Cementové žlázy žab

Žáby jsou, pokud jde o adhezivní orgány larev, nejlépe probádanou skupinou. Cementová žláza drápatky (*Xenopus laevis*) je dobře zavedeným modelovým orgánem pro studium morfogeneze orální oblasti a diferenciaci zárodečných vrstev (Picard, 1975a, b). Pozdější práce se zaměřovaly také na studium genové regulace vyvíjející se cementové žlázy a její využití jako zjednodušeného modelu pro diferenciaci nervové tkáně (Bradley et al., 1996). Díky tomu je známa nejen detailní morfologie a morfogeneze, ale také mechanismy, které za touto morfogenezi stojí.

V rámci skupiny existuje poměrně značná variabilita v uspořádání cementových žláz. Jejich výsledný tvar je pak do jisté míry typický pro jednotlivé čeledi (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). U drápatky vzniká z eliptického základu postupně jediný centrálně ležící kužel, tvořený nápadně prodlouženými sekretorickými buňkami (Sive & Bradley, 1996), a připomínající tak svým uspořádáním adhezivní papily sumek. Nutno však poznamenat, že tento model není u žab právě typický. U řady druhů se původně jediný základ žlázy během vývoje rozděluje na žlázy dvě, případně tvoří útvar ve tvaru širokého srpku nebo písmene V, podobný cementovým orgánům bahníků. Vlastní sekretorický epitel je přitom obvykle zahloben pod úroveň okolní pokožky a obklopen nápadným valem (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). U řady druhů také cementová žláza zcela chybí. Jedná se především o druhy s přímým vývojem (např. *Eleutherodactylus coqui*, Fang & Elinson, 1996) a často druhy, líhnoucí se v pozdějších

stádiích (Duellman & Trueb, 1986; Budgett, 1899). Další skupinou, jež tyto orgány často postrádá, jsou tzv. druhy endotrofické (Thibaudeau & Altig, 1999), tedy ty, které dosáhnou metamorfózy, aniž by přijímaly potravu z vnějšího prostředí.

Pokud jde o mikroskopickou stavbu orgánu, prostudována je opět nejlépe u drápatky. Sekretorické buňky jsou svými apikálními částmi poněkud soustředěny k centru orgánu a tvoří tak výrazný kužel, jehož báze je zčásti pokryta pokožkou. Buňky mají původ ve svrchní vrstvě ektodermu a vykazují všechny dříve uváděné rysy sekretorických buněk, jako jsou bazálně uložená jádra, rozvinuté drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát a zásoby sekretorických váčků s mukopolysacharidy (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Nápadná jsou také melaninová granula, která chrání jádra buněk v době, kdy larva setrvává zavěšena v blízkosti vodní hladiny (Pennati et al., 2000). Bázi orgánu ohraničuje populace buněk odvozená z vnitřní vrstvy ektodermu. U některých druhů je pak sekretující epitel obklopen obrvenými okrajovými buňkami, které pokrývají okolí orgánu, případně valy, jsou-li vytvořeny (Pennati et al., 2000; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Tyto buňky se pak starají o distribuci sekretu po povrchu orgánu. Plně vyvinutá žláza drápatky je rozdělena na dvě části – mohutnější a aktivněji sekretující kraniální a menší kaudální (van Evercooren & Picard, 1978). V rámci orgánu lze pozorovat také buňky bez nahromaděných sekretorických granulí, což naznačuje, že k sekreci nedochází kontinuálně (Perry a Waddington, 1966).

Inervace směřuje z maxilární větve trigeminálního nervu především do kaudální části žlázy. Nervová vlákna vstupují mezi sekretorické buňky a jsou zakončena zesíleným terminálním rozvětvením (Roberts a Blight, 1975). Larvě inervace zajišťuje takzvanou „stopping response“, tedy zastavení pohybu po kontaktu se substrátem. Roberts a Blight dále uvádějí, že zakončení jsou excitována také tahem, larva tedy setrvává v klidu i v době, kdy je zavěšena na žlázou produkovaném vlákně. V průběhu adheze jsou utlumeny také reakce na některé vnější podněty. Larvy zůstávají přichyceny do dokončení vývoje úst a ocasu, který umožní efektivnější pohyb (Thibaudeau & Altig, 1999). Po otevření úst začíná žláza postupně degenerovat (Groppelli et al., 2003).

Nad podobností cementové žlázy žab s adhezivními strukturami u jiných skupin obratlovců, respektive strunatců, se zamýšlí řada autorů (viz např. Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005; Pennati et al., 2000). Pennati et al. uvažuje, že se ancestrální adhezivní orgány jako homologické struktury mohly zachovat u těch linií, u nichž existovalo pro podobný orgán využití, a u ostatních zaniknout. Jiní autoři si všímají značné podobnosti s adhezivními papilami sumek (Sive & Bradley, 1996) a Veeman et al. (2010) ve své

práci poukazují na obdobný embryonální původ a morfogenezi obou struktur, z čehož usuzují na přítomnost adhezivní žlázy u hypotetického společného předka obratlovců a pláštěnců.

### 3.2.7 Cementové orgány bazálních paprskoploutvých ryb

Z důvodu specifík cementových orgánů bazálních paprskoploutvých ryb budou tyto skupiny (konkrétně se jedná o řády Polypteriformes, Acipenseriformes, Amiiformes a Lepisosteiformes) pojednány odděleně od ryb kostnatých (Teleostei). Přes veškeré zásadní odlišnosti a tedy zajímavé otázky, které nad cementovými orgány těchto ryb vyvstávají, se jedná o skupiny v tomto směru velmi málo probádané. Většina prací pochází z počátku 20. století a zabývá se pouze morfologií v rámci popisu larválního vývoje. Detailnější histologické studie zaměřené přímo na cementové orgány jsou k dispozici pro bichira *Polypterus senegalus* (Kerr, 1907) a kaprouna *Amia calva* (Eycleshymer & Wilson, 1908). U jeseterů naopak není z literatury zřejmé, zda se u popisovaného cementového orgánu skutečně jedná o adhezivní žlázu (srov. Frankenberger, 1927 vs. Bolker, 2004), avšak soudí se, že v průběhu vývoje dává struktura vznik hmatovým vousům (viz níže). U veslonosů (Polyodontidae) z téhož řádu cementové orgány nejsou známy vůbec, naproti tomu hmatové vousy vyvinuty jsou (Fox, 1999; Ballard & Needham, 1964).

Typická pro popisované skupiny, na rozdíl od všech předchozích, je pozice adhezivních žláz dorzálně od úst, ačkoliv charakterizovat takto místo jejich vzniku již zdaleka není tak snadné, především u druhů, kde se ústa zakládají později. U bichira a kostlína dle zmiňovaných studií vznikají cementové orgány jako párové vychlípeniny anteriorního entodermu, které se záhy odškrcují, splývají s pokožkou a otevírají do vnějšího prostředí – u bichira jako hluboké pohárky s širokým ústím, u kaprouna jako plošný sekretorický epitel rozdělený do většího množství podkovovitě uspořádaných disků. Podobná je situace u jesetera (Frankenberger, 1927). U kostlína rodu *Lepisosteus* (řád Lepisosteiformes) popisují adhezivní žlázy Balfour a Parker (1882) a soudí, že vznikají ze spodní vrstvy epidermis. Autoři také prokazují sekretorickou aktivitu studovaných buněk. Vyvinutý orgán má podobu podkovovitěho terče a zaujímá značnou plochu nad horní čelistí. S růstem larvy a prodlužováním čelistí se adhezivní plošky koncentrují na rostrum a celá plocha se zmenšuje, až nakonec zcela zaniká (Long a

Ballard, 2001). Na druhou stranu Lindahl (1944; citováno podle Diedhiou & Bartsch, 2009) uvádí, že orgán vzniká za přispění entodermu. Eycleshymer a Wilson (1908) zmiňují studii von Kupfera (1893), který se zabýval adhezivními orgány jesetera a popsal jejich vznik z původně jediného základu, následné podélné a příčné rozdělení na čtyři papily a jejich postupnou transformaci ve smyslové vousky dospělců. V pozdějších pracích je však o základech vousů pojednáváno jako o „hatching gland“, tedy žláze, která slouží k rozrušení vaječných obalů během líhnutí (např. Bolker, 2004; Zeiske et al., 2003).

O inervaci orgánů u většiny zástupců informace chybí. Pouze u sporného cementového orgánu jesetera uvádí Kuratani et al. (2000) inervaci mandibulární větvi nervu trigeminu, tedy shodnou jako u žab (autor se nicméně k povaze orgánu nevyjadřuje, informace o inervaci se vztahuje obecně k oblasti vznikajících hmatových vousků). Homologizace adhezivních orgánů bichira a kaprouna s orgány ostatních skupin je vzhledem k jejich naprosto odlišnému původu značně problematická. Pochopitelně ovšem mohou být homologizovány mezi sebou. Phelps Allis (1926) však za homologické považuje také adhezivní žlázy kostlína a jesetera. Eycleshymer a Wilson (1908) se pak vyjadřují k otázce homologizace entodermálních žláz kaprouna a bichira s ektodermálními žlázami ostatních skupin jako značně nepravděpodobné, právě vzhledem k odlišnému embryonálnímu původu.

### 3.2.8 Cementové žlázy kostnatých

V nepřehledném druhovém bohatství nadřádu Teleostei nalezneme řadu skupin, jejichž larvy se po vylíhnutí přichycují k podkladu pomocí adhezivních orgánů. Struktury tohoto typu byly popsány u zástupců řádů Osteoglossiformes (Kerr, 1907), Cypriniformes, Characiformes, Characiformes, Gymnotiformes (Britz et al., 2000), Esociformes (Merron et al., 1990; Braum et al., 1996), Synbranchiformes (Taylor, 1913), Tetraodontiformes a Perciformes (Britz et al., 2000). Téměř výhradně se přitom jedná o sladkovodní druhy. Jedinou výjimkou je druh *Pholidichthys leucotaenia* z řádu Perciformes (Wirtz, 1994; podle Britz et al., 2000), který obývá mělké pobřežní vody západního Pacifiku. Absenci žláz pozorujeme taktéž u skupin s pokročilou rodičovskou péčí, konkrétně u cichlid, jejichž vývoj probíhá v tlamě rodičů (jako příklad lze uvést rudimentární žlázy u cichlidy *Tilapia nilotica*, Arnold et al., 1968). Larvy těchto druhů

opouštějí rodná ústa až tehdy, když jsou schopné volného pohybu, adhezivní orgány tedy nepotřebují (Groppelli et al., 2003). Na druhou stranu u druhů, které hlídají vylíhlé larvy mimo ústa mohou adhezivní žlázy umožňovat bezpečné setrvání na místě líhnutí (Britz et al., 2000). Zajímavé vysvětlení pro adhezi k vodní hladině podávají Rétaux a Pottin (2011) při popisu cementové žlázy jeskynní formy tetry *Astyanax mexicanus*: v uzavřeném jeskynním prostředí se takto čerstvě vylíhlé larvy brání před predací dospělými příslušníky vlastního druhu, kteří potravu přijímají výlučně ze dna. U několika druhů byla popsána tvorba přichytných vláken, podobných vláknům tvořeným larvami drápatek (Kerr, 1907; Bennemann & Pietzsch-Rohrschneider, 1987; Arnold et al., 1968). Poslední jmenovaný autor popisuje diferenciaci buněk cementového orgánu cichlidy *Tilapia mariae* na bazální, produkující vlákno, a periferní, opatřující jej adhezivním sekretem.

V rámci skupiny existuje mezi adhezivními žlázami značná morfologická variabilita. Pokud jde o umístění, situace je stejná jako u bazálních paprskoploutvých. Plně vyvinuté žlázy se nacházejí dorzálně od úst, avšak u řady druhů se neomezují na jejich nejbližší okolí a často se tvoří daleko od nich na dorzální straně hlavy (Pottin et al., 2010; Britz et al., 2000). Odlišná je také úroveň organizace sekretorického epitelu. Zatímco u cichlid (například u skaláry *Pterophyllum scalare*) vznikají útvary ne nepodobné poměrně komplexním cementovým orgánům bichirů (Groppelli et al., 2003), zástupci řádu Gymnotiformes jsou vybaveni pouze jednotlivými sekretorickými buňkami volně rozptýlenými v pokožce dorzální strany hlavy (Britz et al., 2000).

Cementové orgány skaláry sestávají ze tří párů kráterovitých žláz. První dva se nachází na dorzální straně hlavy, třetí nad čichovými jamkami. Sekretorickou aktivitu vykazují nejprve žlázy dorzální, až poté anteriorní („ventrální“, Groppelli et al., 2003), čímž je zřejmě docíleno prodloužení doby, po kterou je larva schopná adheze. Epiteliální buňky kolem ústí žlázy vykazují typické zvrásnění povrchu (Bennemann a Pietzsch-Rohrschneider, 1978). Podobnou adaptaci nalezneme taktéž u cichlid a nahohřbetých (Gymnotiformes). U rodu *Apteronotus* jsou navíc epitheliální buňky v „adhezivní oblasti“ hlavy opatřeny zvrásněnými kuželovitými výběžky (Britz et al., 2000). Vlastní sekretorické buňky se nijak neliší od obecného rozvrhu popsaného v úvodní části kapitoly. Inervace byla studována u skaláry *Pterophyllum scalare*, kde je zajištěna větví trigeminálního nervu (Groppelli et al., 2003), stejně jako u dalšího ze studovaných druhů, tetry *Astyanax mexicanus* (Pottin et al., 2010).

K homologii s adhezivními orgány ostatních skupin se vyjadřuje například Gropelli et al. (2003), kteří soudí, že adhezivní orgány skaláry přes všechny morfologické a funkční odlišnosti odpovídají cementovým žlázám žab a adhezivním papilám sumek. Tři páry cementových orgánů larvám skalár umožňují díky postupnému zapojování sekrece prodloužit celkovou dobu adheze. Zajímavou hypotézu přináší Britz et al. (2000). Ti ve výčtu podobných orgánů uvádějí jak cementové orgány bazálních paprskoploutvých, žab a dvojdyšných, tak balancery ocasatých obojživelníků a upozorňují na značnou variabilitu adhezivních orgánů Teleostei. Následně navrhují, že cementové orgány Teleostei by mohly vzniknout specializací pohárkových buněk (goblet cells), tedy sekretorických buněk, které se běžně vyskytují v pokožce ryb.

### 3.3 Genová regulace vzniku adhezivních žláz

Genové regulační mechanismy, řídící vznik adhezivních struktur, jsou opět prostudovány nejpodrobněji na příkladu drápatky *Xenopus laevis*. Cementovou žlázu drápatky nejprve prosazoval J. J. Picard (např. 1975a, b) jako model diferenciaci zárodečných tkání. V rámci své práce testoval mimo jiné možnosti indukce vzniku žlázy pomocí chloridu amonného. Později byl tento orgán úspěšně zaveden jako model studia diferenciaci anteriorní oblasti embrya, zejména nervové tkáně. Některé regulační mechanismy totiž oba typy tkání sdílejí, přičemž vznik cementové žlázy je regulován jednodušeji, a tedy umožňuje snazší pochopení studovaných interakcí (Sive a Bradley, 1996). Od poloviny devadesátých let byla popsána celá řada genů, účastnících se indukce cementové žlázy drápatky, čímž celá regulační síť získala konkrétnější obrysy. Nicméně mezidruhovým srovnáním genové exprese v oblasti vznikajících adhezivních žláz se zatím mnoho studií nezabývalo. Zatím tak chybí potřebné argumenty pro, případně proti homologizaci cementové žlázy drápatky s obdobnými strukturami jiných obratlovců.

Přehled faktorů, podílejících se na diferenciaci sekretorického epitelu, uvádí například Sive a Bradley (1996). Na prvotní indukci orgánu se podílí geny exprimované v notochordu (*noggin*, *folistatin* a *chordin*), *xnr3* a geny rodiny *hedgehog*. Všechny zmiňované faktory umožňují *in vitro* indukci cementové žlázy v ektodermu animálního pólu. Inhibice lze naopak dosáhnout zvýšením exprese *bmp4* a *wnt8*. Na samotné fungování žlázy má bezprostřední vliv gen *xcg* (nazývaný také *agr2*; Pottin et al., 2010), jehož produktem je mucinu podobný glykosylovaný protein, který je základem

adhezivního sekretu. *Xcg* je exprimován výlučně v cementové žláze. Naproti tomu další zmiňovaný gen, *xag*, je sdílen se žlázou, umožňující rozrušení vaječných obalů během líhnutí (hatching gland). Cementová žláza drápatky je také typická rozdělením na anteriorní a posteriorní část, které se liší sekretorickou aktivitou a inervací (viz kapitolu 4.2.6). Pouze na posteriorní část žlázy je omezen gen *xa*, naopak anteriorní část se vyznačuje přítomností homeotických genů *xdll3* a *xdll4*. Sive a Bradley (1996) uvádí, že rozdíly v expresi zřejmě napomáhají směřovat růst axonů do posteriorní části žlázy. Od nervové tkáně se žláza odlišuje expresí *xnotch1*.

Klíčové pro diferenciaci žlázy je působení *otx2*, genu homologického s *otd* octomilky (gen octomilky stále vykazuje schopnost působit na embrya drápatky shodně s *otx2* (Lunardi a Vignali, 2006)). Ten je nicméně exprimován také v oblasti předního a středního mozku, přesná lokalizace cementové žlázy musí tedy podléhat další regulaci (viz níže). *Otx2* je aktivován faktory *noggin* a *chordin* a cílem jeho působení je přímo gen *xcg*, přičemž *otx2* spouští jeho expresi vazbou na promotor. *Xag* je naopak zřejmě regulován nepřímou. Na indukci je citlivá pouze anteriorní oblast ventrolaterálního ektodermu ve stádiu střední gastruly, tedy v době, kdy je definitivně vymezena anteriorní a posteriorní oblast embrya. *Otx2* je však exprimován již dříve v dorzálním ektodermu, předčasnou indukci žlázy tak musí být zřejmě bráněno specifickým inhibítozem, případně absencí potřebného kofaktoru. Ve stádiu střední gastruly *otx2* spouští ve vznikající cementové žláze expresi *xcg*, *xag* a endogenního *otx2* (Gamill a Sive, 1997).

Vzhledem k expresi *otx2* v dorzálněji ležícím neuroektodermu je pro lokalizaci nutný kofaktor, který by omezoval vznik žlázy na oblast ležící více ventrálně. Ve své další práci Gamill a Sive (2000) ukazují na vliv *bmp4*, který je exprimovaný ve ventrálních tkáních a dorzálně inhibovaný faktory *noggin* a *chordin*, ale také samotným *otx2*. Pro úspěšnou indukci cementové žlázy je však nutná koexprese *bmp4* a *otx2*. K překryvu nejspíše dochází v oblasti, kde koncentrace faktorů *noggin* a *chordin* stále umožňuje aktivaci *otx2*, avšak už nestačí na inhibici *bmp4*. Taktéž *otx2* musí být v buňkách zakládající se cementové žlázy produkovan pouze v takové koncentraci, která by koexpresi *bmp4* umožnila (Gamill a Sive, 2000). Na druhou stranu zvýšená koncentrace *bmp4* má za následek inhibici žlázy a zřejmě je klíčová pro zabránění jejímu vzniku ve ventrálním ektodermu (Sive a Bradley, 1996). Zdá se tedy, že v místě překryvu jsou nutné nižší koncentrace obou zmiňovaných faktorů. V indukci cementové žlázy se uplatňuje také *otx5*, paralog *otx2*, který je také schopen *in vitro* indukce cementové žlázy. Jeho přesná role však není doposud známa.



Tkáňovým kontextem celého procesu vzniku žlázy se zabývají především Sive a Bradley (1996) a Bradley et al. (1996). Autoři první práce dochází k závěru, že neexistuje žádný specifický faktor, ani jednoduchý překryv exprese více genů, který by byl omezen na anteriorní oblast hlavy, ve které se orgán zakládá. Uvažují, že tkáň reaguje na sníženou expresi faktorů, které ve vyšší koncentraci vedou k diferenciaci na nervovou tkáň. Bradley et al. (1996) definuje oblast vzniku žlázy jako rozhraní dorzálního a ventrálního ektodermu v nejanteriornější části embrya. Primární specifikace základů orgánu nastává již na počátku gastrulace, týká se však pouze spodní vrstvy ektodermu, ze které sekretorický epitel nevzniká. Ve stádiu pozdní gastruly je již indukce doložena expresí *xcg* a *xag*, u časných neurul se pak v posteriorní části žlázy přidává *xa*. Ke konci gastrulace se celá oblast dostává do kontaktu s dorzoanteriorním entodermem, který zřejmě v regulaci diferenciaci žlázy hraje důležitou roli. Ventrální entoderm pak naopak vzniku žlázy brání. Bezprostřední regulace vzniku žlázy je pravděpodobně zajištěna interakcí dříve indukované spodní vrstvy ektodermu a vrstvy vnější. Ta zřejmě zároveň inhibuje diferenciaci žlázy ve spodní vrstvě. Zajímavé experimenty v tomto směru prováděli Fang a Elinson (1996), kteří pomocí mezidruhových transplantací mezi drápatkou a *Eleutherodactylus coqui* ukázali, že ektoderm *E. coqui* v důsledku terestrického přímého vývoje ztratil schopnost reagovat na indukční signály z dorzoanteriorního entodermu. Entoderm však v transplantátu z *X. laevis* vznik žlázy indukuje. Ke ztrátě adhezivního orgánu tak došlo změnami v expresi genů, které určují schopnost ektodermu reagovat na indukční faktory.

Lokalizaci oblasti, ve které se žláza zakládá, rozpracovávají Wardle et al. (2002). Definuje ji jako průnik tří domén: anterodorzální (AD), ventrolaterální (VL) a vnější vrstvy ektodermu (EO); tedy  $CG=AD+VL+OE$ . Toto schéma pak Wardle a Sive (2003) prosazují jako alternativu k hypotéze o lokalizaci žlázy pomocí středních koncentrací exprese *bmp4* (Gamill a Sive, 2000; viz výše). Anterodorzální doména je definována expresí *otx2* a vzniká z ní nejen cementová žláza s přilehlým meso- a entodermem, ale také přední mozek. Doménu ventrolaterální definuje exprese *bmp4* a *vent2*. Expresní charakteristiky vnější a vnitřní vrstvy ektodermu ve výše zmíněných pracích specifikovány nejsou. Je však zřejmé, že odlišnost těchto vrstev hraje v indukci žlázy zásadní roli.

Léta výzkumu signalizace v anteriorní oblasti embrya, vzniku cementové žlázy a indukce úst později shrnují Dickinson a Sive (2007). V této práci na základě předchozích studií definují extrémně anteriorní oblast embrya drápatky jako zcela samostatnou

doménu, vymezenou především přímým kontaktem anteriorního entodermu s ektodermem. Jedná se tedy o oblast bez jakékoli přímé účasti mesodermu. U drápatky postupně dává vznik cementové žláze, ústům a adenohipofýze. Část, ze které vznikají ústa a adenohipofýza pak dle autorů vykazuje plakodální rysy, včetně exprese genů rodiny *pitx*. V cementové žláze jsou přitom exprimovány pouze geny *pitx1* a *pitx2c*, zatímco ve zbytku popisované domény se k nim přidávají také *pitx2b* a *pitx3* (Schweickert et al., 2001). Druhá zmiňovaná dvojice se však omezuje pouze na vnitřní vrstvu ektodermu, na rozdíl od prvních dvou genů, exprimovaných v obou vrstvách. *Pitx1* a *pitx2c* umožňují ektopickou indukci cementové žlázy a zároveň jejich blokování za použití morfolino antisense oligonukleotidů dokáže zabránit vzniku ektopické žlázy, která byla nejprve indukována pomocí *otx2*. Kromě zásadní role těchto faktorů poukazují autoři také na geny *xag*, *xcg* a *gob4*, jejichž produkty jsou muciny a protein, regulující sekretorickou funkci. Práce také upřesňuje, že samotný anteriorní entoderm nepostačuje pro indukci vzniku žlázy a nutná je účast anteriorního neuroektodermu a anterodorzálního mesodermu. Dále zdůrazňuje inhibiční vlastnosti ventrálního ektodermu, nicméně opět předpokládá permisivní funkci ventrolaterální domény, exprimující *bmp*. Vzniklý protein poté difunduje do dorzálněji ležících tkání za vzniku gradientu. Permisivní pro vznik žláz je pak oblast se střední koncentrací morfogenu, v níž je umožněna exprese *otx2* (Dickinson a Sive, 2007).

V souvislosti s cementovými orgány byly ve studiích na jiných skupinách organismů zmiňovány především paralogy *otx*. U žebrovníka *Pleurodeles waltl* byla prokázána exprese *otx5*, podílejícího se na regulaci vzniku balancerů. Sauka-Spengler et al. (2002) uvádějí, že změny v jeho expresi mohou být zodpovědné za ztrátu balancerů u některých skupin ocaatých. Expese *otx2* v balancerech prokázána nebyla, což komplikuje posouzení případné homologie orgánu s cementovou žlázou drápatky. Avšak samotný gen *otx5* naznačuje, že regulační mechanismy budou u obou struktur alespoň do určité míry podobné. U bichira rodu *Polypterus* byly v cementových orgánech prokázány geny oba. *Otx2* je exprimován především v oblasti středního mozku, v cementových orgánech pak v menší míře. Naproti tomu *otx5* se omezuje pouze na cementové orgány a epifýzu. Z dalších paralogů *otx* byla v adhezivních žlázách pozorována exprese *otx1* (Suda et al., 2009). Pottin et al. (2010) se věnují vývoji cementové žlázy tetry *Astyanax mexicanus*. Práce zmiňuje expresi *bmp4* v kaudální části dorzálně ležícího orgánu, a to jak v bazálních, tak sekretorických buňkách. Dále uvádí obdobnou, avšak pouze na bazální buňky omezenou expresi *pitx1* a *pitx2*. Další zásadní gen, *agr2* (tedy *xcg*) byl

však prokázán pouze v rostrální části embrya, v oblasti, kde se vyvíjí tzv. „hatching gland“. V samotné cementové žláze exprese *agr2* chybí.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Embrya

Vajíčka bichira (*Polypterus senegalus*) byla získána zčásti z chovů p. Tichého z Kravař u Opavy. Další část, stejně jako vajíčka drápatky (*Xenopus laevis*), pocházela z chovů Katedry zoologie PřF UK. Vajíčka a larvy piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*) a jeseterů (*Acipenser sp.*) ochotně poskytli RNDr. Bořek Drozd a Ing. David Gela, PhD., z chovů Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity. Několik embryí a larev žebrovníka (*Pleurodeles waltl*) jsem získal od Roberta Černého, Ph.D. z katedry zoologie. Živá embrya byla odchována do požadovaných stádií v podmínkách, které dané druhy vyžadovaly. Vybraná stádia byla anestetizována v roztoku MS-222 (Serva), fixována v 4% PFA a poté skladována ve 4°C.

Pro určení stádií bichira byla, vzhledem k nejpodrobnějšímu rozpracování stádií, během nichž se vyvíjí cementové orgány, použita nepublikovaná stádiovací tabulka kolegy M. Král'oviče. Pro srovnání s publikovanou tabulkou Diedhiou & Bartsch (2009) přibližně platí následující převod (jako první vždy uvedeno stádium dle M. Král'oviče): st. 20=23, st. 21=24, st. 22=24/25, st. 23=25a, st. 24=26/27, st. 25=28, st. 26=29, st. 27=30. Stáří embryí drápatky bylo určováno na základě tabulky Nieuwkoop a Faber (1967), embrya piskoře podle tabulky Kostomarova (1991) a embrya žebrovníka podle Shi & Boucaut (1995).

### 4.2 SEM

Embrya pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) byla postfixována v Karnovského fixativu (2% roztok glutaraldehydu v PFA) po dobu minimálně 12 hodin ve 4°C. Po promytí v 0,1M PBS byla následně plynule odvodněna vzestupnou ethanolovou řadou a převedena do 100% acetonu. Takto ošetřené vzorky byly v Laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK vysušeny metodou CPD (Critical Point Drying) v aparatuře Bal-Tec CPD 030 a rozmístěny na vrstvě pryskyřice (Tempfix kit) na hliníkové terčíky. K manipulaci s křehkými embryi byla použita řasa, připevněná na vhodném držáku. Preparáty byly poté pokryty vrstvou zlata v naprašovačce Bal-Tec SCD 050 a pozorovány pod skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV.

Embrya bichira byla za účelem frontálního pozorování před odvodněním přeříznuta transversálně ve střední části žloutku a po vysušení v CPD usazena na terčíky na plošku, vytvořenou řezem tak, aby rostrální část směřovala vzhůru.

### 4.3 Extirpace ektodermu

Pro účely extirpace hlavového ektodermu byla embrya z Karnovského fixativu promyta v 0,1M PBS a poté na 10 minut převedena do 0,01M PBS pro lepší oddělení epitelů v důsledku osmotických změn. Následně byla vzestupnou ethanolovou řadou převedena do 70% EtOH a přemístěna do Petriho misky s plastelínou, kde byla usazena do předem připravených důlků a upevněna v požadované poloze. Extirpace byla provedena pod binokulární lupou Olympus SZX12 pomocí wolframových jehel. Ektoderm byl odstraňován v hlavové oblasti mezi oblastí vzniku úst a základy vnějších žaber. Zpracovaná embrya byla následně transversálně přeříznuta ve střední části žloutku a dále připravena pro SEM dle výše uvedeného postupu.

### 4.4 Zpracování embryí na řezech

Vzorky pro klasickou histologii byly odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou a převedeny na 12 hodin do roztoku složek A + C pryskyřice JB-4 (Polysciences). Následující den byla embrya zalita do formy v roztoku A + B + C, který bez přístupu vzduchu polymeruje na pevnou pryskyřici. V případě nevhodné orientace embryí byly vzniklé bločky vhodně seříznuty a znovu zality ve vyhovující poloze. Poté byly nařezány na mikrotomu Leica RM 2155 na tloušťku cca 5-8  $\mu\text{m}$ . Řezy byly přeneseny na podložní sklíčka a po vysušení barveny roztokem histologických barviv Azure B/Eozin (Serva). Poté byly řezy zality pryskyřicí DPX (Fluka), přikryty krycími sklíčky a skladovány ve vodorovné poloze. Po zatvrdnutí DPX byly vzorky analyzovány pod mikroskopem Olympus BX 51.

Embrya pro zpracování v kryostatu Leica CM 3050S byla nejprve promyta 3x10 minut v 0,1M PBS na promývače, aby byl odstraněn veškerý PFA. Následovala infiltrace 7,5% a 15% roztokem sacharózy po 2,5 hodinách ve 4°C a poté inkubace v řadě roztoků 15% sacharózy se stoupající koncentrací želatiny (7,5%, 15% a 20%) po 12 hodinách při 37°C ve vodní lázni. Takto připravená embrya byla ve 20% želatině zalita

do silikonové formy (Polysciences) a zmrazena na  $-25^{\circ}\text{C}$  v komoře kryostatu. Bločky byly upevněny na terčíky roztokem Tissue Freezing Medium (Jung) a krájeny na tloušťku 7-10  $\mu\text{m}$ . Nanášeny byly na nahřátá podložní sklíčka, která byla následně do aplikace protilátek skladována ve vlhké komůrce ve  $4^{\circ}\text{C}$ . Před vlastním značením byly řezy odželatinizovány opakovaným ponořením sklíčka do  $37^{\circ}\text{C}$  teplého odželatinizovacího roztoku a následným omytím v destilované vodě.

Pro zalití do parafínu byla embrya nejprve odvodněna vzestupnou ethanolovou řadou, poté následovaly dvě lázně v xylenu. V poslední lázni byly vzorky přeneseny do inkubátoru, kde se zahřály na teplotu  $60^{\circ}\text{C}$ . V této teplotě byly převedeny do parafínu a v něm ponechány 2x 30 minut. Pomocí pinzety pak byla embrya přenesena do předehřátých petriho misek s tekutým parafínem. Ty pak byly po správném usazení embryí ochlazeny do zatuhnutí parafínu. Embrya byla v bločcích požadované velikosti vykrajována pomocí zahřátého skalpelu a roztaveným parafínem upevněna na dřevěnou kostku. Po uchycení do držáku mikrotomu Leica RM 2155 byly zhotoveny řezy o tloušťce cca 5-7  $\mu\text{m}$ . Řetízky řezů byly roztaženy na vodní hladině a z ní přeneseny na sklíčko. Po zaschnutí byla sklíčka uskladněna nebo ihned odparafínována a dále zpracována. Odparafínování bylo provedeno v roztoku Histochoice (Sigma). Před barvením byly řezy rehydratovány sestupnou ethanolovou řadou, zakončenou dvěma lázněmi 0,1M PBS.

## 4.5 Imunohistochemie

Na kryostatové řezy byla, po promytí PBS a ošetření 1% roztokem BSA po dobu 10 minut, aplikována primární protilátka (fibronectin, rabbit anti-human (Dako, ředění 1:100)). Sklíčka byla ponechána přes noc ve vlhké komůrce ve  $4^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí uvedené doby byly řezy opláchnuty PBS a dále promývány v PBS 3x po 10 minutách. Jako sekundární protilátka byla použita goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500), umožňující vizualizaci fibronektinu pomocí fluorescence. Inkubována byla opět cca 12 hodin ve  $4^{\circ}\text{C}$ , poté byla přebytečná protilátka vypláchnuta PBS a sklíčka byla zalita pomocí Vectashield Mounting Medium Hard Set (Vector), obsahujícím fluorescenční značku DAPI pro vizualizaci DNA v jádrech, a přikryta krycími sklíčky. Skladována byla ve  $4^{\circ}\text{C}$ .

Jako alternativa k fluorescenčnímu značení byl používán Vectastain Elite ABC Kit (Vector), který umožňuje vizualizaci protilátky ve viditelném světle pomocí křenové peroxidázy (HRP), čímž zvyšuje kompatibilitu s některými dalšími metodami (PAS, Nomarského kontrast – viz níže). V tomto případě byl celý proces zkrácen a primární protilátka inkubována pouze 1,5-2 hodiny při pokojové teplotě. Po promytí 3x10 minut v PBS následovala sekundární protilátka (součást kitu), po 30 minutách opět promytí v PBS, inkubace 30 minut v roztoku ABC a další promytí v PBS. Značka byla vyvíjena v roztoku diaminobenzidinu, dokud nebyla zřetelně viditelná (cca 1 minutu). Poté byly řezy zality pod Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) pod krycími sklíčky a skladovány ve 4°C.

## 4.6 PAS

Pro selektivní značení cementových orgánů bylo použito barvení PAS (Periodic Acid-Schiff Kit, Sigma), vizualizující mukopolysacharidy reakcí kyseliny jodisté s glukózou a následnou barevnou reakcí produktů s Schiffovým činidlem. Metoda byla použita jak na kryostatové, tak na parafinové řezy, přičemž tyto varianty se lišily délkou aplikace Schiffova činidla. Na kryostatové, případně rehydratované parafinové řezy byla po provlhčení sklíček destilovanou vodou nanесena kyselina jodistá na dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po několikanásobném opláchnutí destilovanou vodou bylo aplikováno Schiffovo činidlo.

Doba barvení u kryostatových řezů se pohybovala v rozmezí 30 sekund až 5 minut dle studovaného živočišného druhu. Intenzitu zabarvení bylo nutné průběžně sledovat a reakci včas zastavit promytím sklíček v destilované vodě, aby nedošlo k oslabení signálu neselektivním barvením pozadí. V případě parafinových řezů neselektivní barvení problém nepředstavovalo a embrya bylo možno barvit ve shodě s návodem uvedeným v kitu, tedy 15 minut. Metoda PAS se ukázala jako kompatibilní s imunohistochemickými metodami a úspěšně byla používána na vzorcích značených pomocí Vectastain Elite ABC Kit.

## 4.7 Mikroskopická technika a zpracování dat

Histologické a imunohistochemické preparáty byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX51, který umožňuje také použití fluorescenční mikroskopie

díky integrované UV lampě. Obrázky byly snímány kamerou Spot. Část preparátů byla snímána pod mikroskopem Olympus AX70 kamerou Olympus DP72 za použití Nomarského kontrastu, který umožňuje vizuální rozlišení buněk a tkání bez použití histologického barvení. Extirpace ektodermu a pozorování embryí před krájením probíhalo pod binokulární lupou Olympus SZX 12 s kamerou Olympus a možností skládání obrazu z více nasnímaných vrstev (Deep Focus) pomocí softwaru QuickPHOTO MICRO (Promicra). Technika použitá pro SEM je podrobně zmiňována výše. Obrázky z fluorescenčního mikroskopu byly upravovány a skládány do vícebarevné podoby v programu Spot Advanced (Diagnostic Instruments). Finální úpravy a tvorba obrazových tabulí byly provedeny v programu Corel Photo-Paint. Schémata byla zhotovena pomocí vektorové grafiky v programu Corel Draw.



## 5 Výsledky

### 5.1 Povrchová morfologie (SEM)

#### 5.1.1 Bichir *Polypterus senegalus*

Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu odkrývají morfologické detaily průběhu vývoje a otevírání cementového orgánu bichira. Orgány se na povrchu zakládají jako dvě mohutné výdutě po bocích předního konce hlavy a přibližně do stádia 22 jsou pokryty pokožkou nijak se nelišící od zbytku tělního pokryvu (obr. 2A). Buňky mají tvar nepravidelných konvexních mnohoúhelníků o variabilním průměru (cca 10-25  $\mu\text{m}$ ). V pokožce jsou ve víceméně pravidelných intervalech rozmístěny také buňky opatřené dlouhými brvami. Ve stádiu 23 se ve střední části výdutí objevuje nápadná rýha, tvořená deformací pokožkových buněk (obr. 2B<sup>‘‘</sup>, 3B), která se ve stádiu 24 začíná rozestupovat (obr. 2C<sup>‘‘</sup>, 3C). Mezi jednotlivými jedinci však existuje určitá variabilita, určení stádia, ve kterém dochází k perforaci pokožky, tedy není absolutní. V průběhu stádia 24 a zčásti 25 pokračuje rozevírání pokožky. Z nepravidelné štěrbiny se postupně stává kruhový otvor, obklopující vynořující se cementový orgán (pro detaily otevírání orgánu viz obr. 3). Během ústupu pokožky nejsou patrné žádné známky odumírání nebo odlučování buněk. Vynořující se cementový orgán je tvořen zřetelně odlišnou populací buněk o nápadně menším průměru (cca 5  $\mu\text{m}$ , obr. 2D<sup>‘‘</sup>), představující dle mých výsledků (viz níže) derivát anteriorního entodermu (obr. 3). V době rozestoupení pokožky je ve stěně žlázy obvykle již patrný otvor, kterým bude v pozdějších stádiích vystupovat adhezivní sekret (obr. 2C<sup>‘‘</sup>). Přejít mezi pokožkou a orgánem je zpočátku dobře patrný, kolem stádia 27 se rozhraní vyhlazuje a jediným rozlišovacím znakem mezi oběma populacemi je velikost buněk (obr. 2F<sup>‘‘</sup>, 3F). V témže stádiu se objevují také známky aktivní sekrece a v ústí orgánů jsou často zachyceny částičky nečistot (obr. 2D<sup>‘‘</sup>, F<sup>‘‘</sup>).

V rámci studia morfogeneze cementového orgánu byly provedeny také extirpace ektodermu za účelem vizualizace napojení vyvíjejícího se orgánu na anteriorní entoderm. Během testování metody však vyvstala řada technických problémů, které znemožnily tento přístup úspěšně aplikovat. Místo napojení na entoderm leží poměrně hluboko uvnitř hlavy embrya a po odstranění ektodermu je kryto silnou vrstvou mezenchymu, který kvůli jeho nespojitému charakteru není možné jednoduše odpreparovat wolframovými jehlami.

Další problém představovala žlutková granula, která se uvolňovala z poškozených buněk – především na žloutek bohatého entodermu – a ulpívala na sledovaných tkáních. Pouze na několika snímcích bylo patrné protažení kaudální části entodermálního váčku, tvořícího orgán. Není však zřejmé, zda byla zachycena fáze napojení na prvostřevo, nebo již úplné oddělení váčku. Na řadě snímků je patrný dvouvrstevný dlaždicový epitel, pokrývající výdutě budoucích cementových orgánů, což naznačuje, že orgán nevzniká z žádné z vrstev ektodermu, ale právě z migrujícího entodermálního váčku.

### 5.1.2 Drápatka *Xenopus laevis*

Cementová žláza drápatky se nejprve zakládá jako pigmentovaná oblast anteroventrálního ektodermu ve stádiu 17 (Nieuwkoop & Faber, 1967). Okolní pokožka vykazuje podobné znaky, jaké byly popsány u bichira, včetně pravidelného výskytu obrvených buněk (obr. 5). Diferencující se sekretorické buňky se ve stádiu 26 již zřetelně odlišují od okolního epitelu nápadně menším průměrem povrchu apikálních částí, komunikujících s vnějším prostředím (obr. 5A<sup>‘‘</sup>). V následujících stádiích se sekretorické buňky dále protahují a tvoří nápadnou kuželovitou vyvýšeninu (obr. 5B<sup>‘</sup>, 5C<sup>‘</sup>), jejíž bázi pokrývá dlaždicovitý epitel pokožky. Povrch buněk se pokrývá vrstvou adhezivního sekretu, především v kraniální části orgánu, která vykazuje nejvyšší sekretorickou aktivitu (obr. 5C<sup>‘‘</sup>). Od stádia 26 počíná nad dorzálním okrajem orgánu invaginace stomodea (obr. 5A), která je v st. 39-40 završena otevřením ústního otvoru (obr. 5D<sup>‘</sup>). Brzy poté, zhruba ve stádiu 45 začíná být patrná postupná degradace orgánu, který ustupuje expandujícím strukturám orální oblasti.

### 5.1.3 Piskoř *Misgurnus fossilis*

Pro podrobné studium morfogeneze cementové žlázy piskoře pruhovaného se bohužel během první sezóny nepodařilo zajistit kompletní sérii vývojových stádií. V nejranějším zkoumaném stádiu (st. 37 dle Kostomarov, 1991) je již žláza vytvořena v téměř finální podobě (obr. 7A<sup>‘‘</sup>, 8A<sup>‘</sup>). Embryo má značné zásoby žloutku v protaženém žlutkovém vaku, který je nejmohutnější v přední části, na níž spočívá vyvíjející se hlava (obr. 7A). Cementový orgán se formuje jako rostrálně lokalizovaný okrsek specializovaného epitelu, dorzálně nad budoucími ústy. Na rozdíl od předchozích dvou

druhů však sekretorické buňky nejsou od okolní pokožky nápadně oddělené a určit přesnou hranici orgánu je tak obtížné (obr. 8A<sup>''</sup>, B<sup>''</sup>, C<sup>''</sup>). Opět je možno pozorovat poněkud menší průměr jednotlivých buněk, k jeho zmenšování však dochází plynule od periferie do centra orgánu (obr. 8A<sup>''</sup>, B<sup>''</sup>, C<sup>''</sup>). Některé buňky jsou opatřeny nepravidelnými kuželovitými výběžky, jež jsou patrné zejména z laterálního pohledu (obr. 1C<sup>'</sup>). Viditelné roztržení povrchu těchto výběžků může být důsledkem přípravy preparátu pro SEM. Vyskytuje se ovšem pouze na buňkách adhezivní žlázy, vyplývá tedy zřejmě z vlastností sekretorických buněk. V následujících stádiích kuželovité výběžky mizí, nicméně buňky jsou nadále odlišitelné menším průměrem apikálních membrán. Ve stádiu 39 jsou již pod adhezivní žlázou otevřena ústa a vyvíjejí se hmatové vousy (obr. 7C, C<sup>'</sup>). V dalším vývoji se pak vzhledem rozvoji orálních struktur zmenšuje relativní velikost cementového orgánu, až ve stádiu 40 zcela mizí.

#### 5.1.4 Žebrovník *Pleurodeles waltl*

Balancery žebrovníka se zakládají ve stádiu 29 jako podlouhlé vyvýšeniny v oblasti maxilomandibulární kondenzace. Kaudálně od nich vznikají vnější žábry – od společného základu se oddělí nejdříve první a posléze i druhá a třetí větev (obr. 9A). Ve stádiu 30 je rozdělené žaber kompletní, pouze poslední větev zatím zůstává nediferencovaná. Po stranách hlavy tedy pozorujeme tři krátké cylindrické výběžky (obr. 9B, B<sup>'</sup>). O stádium později je řada doplněna poslední větví žaber a všechny výběžky se prodlužují. Budoucí balancer leží nejvíce anteriorně a od vznikajících žaber je oddělen mezerou, zatímco jednotlivé větve žaber k sobě těsně přiléhají (obr. 9C, C<sup>'</sup>). Řada buněk balancerů i žaber vykazuje menší průměr apikálních membrán než buňky přilehlých oblastí pokožky, rozdíl však není tak zřejmý jako u předchozích druhů. Obrvené buňky, rozptýlené v pokožce, přecházejí zčásti i na základy jak dýchacích, tak adhezivních orgánů. Od stádia 32 se ovšem na balancerech omezují pouze na nejbazálnější oblast, zatímco na vnějších žábrách zůstávají přítomny i nadále. V tomto stádiu je také poprvé možné povšimnout si odlišné morfologie vnějších žaber, jejichž větve se laterálně zplošťují a zašpičatují (obr. 9D). Ve stádiu 33 dochází k diferenciaci sekretorického epitelu na konci balanceru. Buňky začínají vytvářet typické kuželovité výběžky popsané i u jiných druhů (např. Britz et al., 2000) a u části jedinců lze pozorovat shluky adhezivního sekretu a nečistot, zachycené na sekretorické části orgánu. Vnější žábry se

v tomto stádiu začínají sekundárně větvit (obr. 9E). Ve stádiu 34 se dále zvětšuje podíl sekretorické oblasti na délce balanceru a až na ojedinělé výjimky mají všechny sekretující buňky vytvořeny nápadné kuželovité výběžky (obr. 9F'). Adhezivní sekret u části jedinců pokrývá celou délku balanceru.

## 5.2 JB-4 histologie

### 5.2.1 Bichir *Polypterus senegalus*

Nejranějším stádiem bichira, pozorovaným na histologických řezech barvených kombinací Azure B/Eosin bylo stádium 22, ve kterém dochází k odškrcování váčků cementových orgánů od anteriorního entodermu. V souladu s extirpačními pokusy bylo pozorováno kapkovité protažení váčků během a těsně po odškrcení. Na sagitálních řezech lze pozorovat odpovídající protažení anteriorního konce faryngeálního entodermu, od něhož se váček odškrtil. Entoderm je poměrně zřetelně rozpoznatelný podle značného obsahu žlutkových granulí (obr. 4E). Avšak v oblasti odškrcování původně kompaktní epitel jeví známky rozrušování a hranice zárodečných vrstev není tak patrná. Taktéž malý průměr oblasti přerušující se entodermální stopky mezi orgánem a faryngem může přispívat ke stírání rozdílů mezi tkáněmi, a to kvůli vyšší pravděpodobnosti vedení řezu po rovině tečné k povrchu stopky. Ektoderm v tomto stádiu je již v těsném kontaktu s entodermálním váčkem a vnitřní vrstvu ektodermu již u většiny jedinců není možné pozorovat (vyj. obr. 4F). Je tedy pravděpodobné, že již došlo k jejímu rozrušení, následovanému otevíráním vrstvy vnější.

Ve stádiu 23 lze pozorovat kompletní oddělení cementových orgánů, které již zřetelně prominují před ostatními strukturami hlavy. Na předním konci embrya se vytváří nápadné polokulovité výstupky vyplněné kromě samotných orgánů také značným množstvím mezenchymu. Na většině vzorků lze pozorovat stále neporušenou svrchní vrstvu ektodermu, avšak vlastní entodermální žláza se už na anteriorním konci pohárkovitě rozevívá. Pod apikálními membránami sekretorických buněk je, stejně jako v předchozím popisovaném stádiu (obr. 4F), možné pozorovat vysoké množství pigmentových granulí. Stále je také patrný vysoký obsah žloutku.

V následujícím stádiu již dochází ke kompletnímu otevření žláz do vnějšího prostředí. Orgány zaujímají zcela anteriorní pozici, dopředu namířený sekretorický epitel ze stran ohraničuje ektoderm a při bázi orgánů opět pozorujeme množství

mezenchymatických buněk. Na základě některých řezů se přitom zdá, že v přímém laterálním kontaktu se sekretorickými buňkami je pouze jediná vrstva ektodermu. Dvouvrstevná pokožka se objevuje až v oblasti báze sekretorického epitelu. Zajímavé je srovnání jednotlivých řezů cementovými orgány. Zatímco při okrajích žlázy jsou sekretorické buňky rozvinuté do plochy a jejich apikální membrány tvoří pouze mírně konkávní povrch (viz totéž u stádia 26 na obr. 4F'), v mediánní rovině orgánu je patrný značný rozdíl ve velikosti buněk. Centrální buňky jsou nápadně nižší než periferní a dochází tak k nápadnému zahloubení centrální oblasti žlázy. Lumen orgánu tak na průřezu připomíná tvar písmene V, bazální lamina pak tvar U (srov. obr. 4D).

### 5.2.2 Drápatka *Xenopus laevis*

U drápatky je na histologických preparátech patrný ektodermální původ cementové žlázy a tedy výrazně jednodušší morfogeneze celé anteriorní oblasti hlavy. Ve stádiu 26 je již patrná pokročilá diferenciacie buněk budoucího sekretorického epitelu. Ten se zakládá v oblasti přímého kontaktu anteriorního entodermu s ektodermem. Dorzálně se pak vytváří mozek (obr. 6A', 10B). Po celou dobu diferenciacie orgánu je v dané oblasti patrná kontinuita entodermální i ektodermální zárodečné vrstvy, jakýkoli příspěvek entodermu do adhezivního epitelu se tedy zdá být vyloučen. Jakmile je orgán plně vyvinutý, počínají se dorzálně od něj (tedy mezi cementovou žlázou a mozkiem) vyvíjet ústa (srov. obr. 6D se značením bazální laminy). V tomto stádiu (st. 35/36) tedy v oblasti vznikajících úst dochází k zásadním změnám struktury epitelů. Ektoderm a entoderm dorzálně od cementové žlázy na řezech splývají v souvislou masu nediferencovaných buněk (obr. 6B'), která se v následujících stádiích ztenčuje a ve stádiu 40 dochází k protržení úst. Proces otevírání úst dorzálně od cementové žlázy má za důsledek její vzdalování od vznikajícího mozku, pod kterým se původně zakládala. Na vznik cementové žlázy však tyto změny vliv zcela jistě nemají, neboť cementová žláza je plně diferencována již před započítím tohoto procesu. Na samotné stavbě žlázy je nápadné značné vyklenutí jejího povrchu, a to jak vnějšího, tak vnitřního. Báze sekretorického epitelu tak neleží v jedné rovině s okolními buňkami, ale prohýbá se směrem dovnitř (obr. 6A').

### 5.2.3 Piskoř *Misgurnus fossilis*

Pro studium morfogeneze cementové žlázy piskoře (jak pro SEM, tak pro JB-4 histologii) bohužel nebyla k dispozici kompletní řada stádií, chybí tak data především pro nejranější fáze vývoje. Nicméně zdá se, že žláza se zakládá více dorzálně než u bichira či drápatky. Přestože u raných stádií adhezivní epitel směřuje ventrálně, nejedná se zřejmě o oblast pozdějšího vzniku úst, jako je tomu u předchozích dvou druhů, ani oblast styku ektodermu a entodermu neboť pod bazální vrstvou ektodermu se v oblasti vzniku žlázy již nachází mohutně rozvinutá mozková tkáň (obr. 8A', 10C). Sekretorické buňky vznikají ve svrchní vrstvě ektodermu, avšak nedochází u nich k tak extrémní elongaci jako u buněk. Taktéž bazální vrstva buněk pod orgánem není během jeho vývoje a fungování nijak zahloubena a plynule navazuje na bazální vrstvu pokožky (obr. 8A'). Ve stádiu 38 dochází k maximálnímu rozvoji cementové žlázy. Centrální buňky orgánu vykazují nápadnější elongaci a vystupují tedy výše vzhledem k okolní pokožce. Celý orgán tak získává mírně kuželovitý tvar. Lze také pozorovat zmenšování průměru apikálních membrán sekretorických buněk směrem k centru žlázy, což je v souladu s daty ze skenovacího elektronového mikroskopu (obr. 8B').

V popisovaném stádiu je taktéž patrný kontext, ve kterém se žláza nachází. Jak již bylo uvedeno, pod samotnou žlázou se nachází anteriorní mozková tkáň, báze orgánu tak není v kontaktu s entodermem. Ventrálně od žlázy se nachází malý okrsek pokožky, překrývající mezenchymatické buňky, na samotném rozhraní hlavy a žloutkového váčku jsou pak patrné známky otevírání úst (obr. 8B).

## 5.3 Imunohistochemické značení fibronektinu

### 5.3.1 Bichir *Polypterus senegalus*

Pomocí této metody byla studována raná stádia morfogeneze cementových orgánů s cílem prokázat a zřetelně vizualizovat propojení cementových orgánů s entodermem na počátku jejich diferenciaci. Zatímco při histologickém barvení Azure B/Eozin v klíčových partiích vznikajících orgánů rozhraní jednotlivých vrstev poněkud splývají, značení fibronektinu umožňuje selektivně obarvit bazální laminu epitelů (je-li přítomna).

Ve stádiu 20 jsou v anteriorním entodermu patrné dvě laterálně ležící výchlipky. Značený fibronektin vykresluje na bazální lamině entodermu (tedy z „vnější“ strany vrstvy) nápadnou linku. Ta pokračuje také na frontální stěnu vznikajících cementových orgánů, nicméně je patrné, že již dochází k jejímu rozrušování, které předchází spojení entodermálních váčků s ektodermem (obr. 4A). Laterálně od orgánů vymezuje fibronektin oblast, v níž se nachází buňky mezodermu. Na řadě preparátů je patrný dvojrstevný ektoderm, který kryje vznikající orgány. Avšak vrstvy nejsou rozlišeny imunohistochemickou značkou a na některých řezech jsou vysledovatelné obtížně. Je tedy možné, že v místě nejtěsnějšího kontaktu váčků s pokožkou již dochází k redukci spodní vrstvy. Farynx je v místě vzniku orgánů rozestoupený ve zřetelnou dutinu a v jeho ventrální části jsou patrné velké buňky žloutkového váčku. Na horizontálních řezech dorzálními partiemi orgánů je mezi jednotlivými váčky patrná anteriorní oblast mozku. Na řezech, na nichž jsou cementové orgány zachyceny v úrovni blízké tečné rovině k jejich povrchu, je bazální lamina nezřetelná.

Taktéž ve stádiu 21 lumen cementových orgánů udržuje kontakt s faryngem (obr. 4B). Na řezech vedených centrální oblastí váčků je však již zřejmá absence bazální laminy, oddělující entodermální epitel od ektodermu. Ve stádiu následujícím pak chybí již téměř na polovině obvodu cementového orgánu, lamina zbylé části orgánu pak plynule navazuje na bazální laminu pokožky (obr. 4C). Váčky jsou v tomto stádiu již uzavřené a s ektodermem je spojuje pouze kuželovitá stopka, vybíhající z anteriorního entodermu. Při bázi orgánů se začínají objevovat pravděpodobně mezenchymatické buňky, vyznačující se přítomností imunohistochemické značky po celém obvodu buněčné membrány. Po otevření cementové žlázy v následujících stádiích tyto buňky již vykazují typicky mezenchymatický fenotyp.

### 5.3.2 Drápatka *Xenopus laevis*

U drápatky byla, kvůli komplikacím se souběžným barvením reakcí PAS, touto technikou úspěšně značena pouze stadia 25 a 35/36. Nicméně jedná se o stadia, zachycující klíčové fáze diferenciací anteriorních epitelů. Cementová žláza se nachází v anteroventrální oblasti a její báze je vyznačena imunohistochemickou značkou (obr. 6C). Zároveň je na některých řezech možné pozorovat, že bazální lamina neohraničuje samotný sekretorický epitel, ale až pod ním ležící vnitřní vrstvu ektodermu. Ve shodě

s histologickými preparáty je tedy zřejmé, že orgán vzniká z vrstvy vnější. Dorzálně nad žlázou je patrný okrsek tkáně mezi vnějším ektodermem a entodermem, který představuje základ stomodea a adenohipofýzy (Dickinson & Sive, 2007). Ve stádiu 35/36 je již patrné rozrušení bazální laminy přibližně v dorzální třetině až polovině žlázy, související s obdobnými pochody, odehrávajícími se v oblasti stomodea (obr. 6D). Tento stav je známkou probíhající morfogeneze úst. Dorzálně od této oblasti se opět nachází zřetelné bazální laminy pokožky a dorzální stěny faryngu, které ohraničují tyto zárodečné vrstvy od vyvíjejícího se mozku. Na spodní straně mozku se pak vytváří adenohipofýza.

### 5.3.3 Piskoř *Misgurnus fossilis*

U piskoře se nepodařilo fibronektin požadovaným způsobem vizualizovat. Na značených řezech je velmi slabá značka patrná pouze místy, a to ve ventrální oblasti hlavy, přiléhající ke žlutkovému váčku, v malé míře pak také ventrálně od cementové žlázy. Příčina těchto komplikací prozatím zůstává nejasná, v další práci bude nutné testovat závislost síly značky na použitém stádiu, technice krájení, případně tloušťce řezu. Zajímavé jsou v tomto směru snímky preparátů, na něž byla aplikována fluorescenční sekundární protilátka. Pod fluorescenčním mikroskopem emituje cementová žláza a dorzální pokožka hlavy nápadný zelený signál. Není však jisté, zda jde o vizualizaci fluorescenční značky. Stejně tak je totiž možné, že jde o autofluorescenci omezenou na pokožku embrya, která potlačuje slabý signál protilátky, pokud vůbec došlo k jejímu navázání.

## 5.4 Značení mukopolysacharidů metodou PAS

### 5.4.1 Bichir *Polypterus senegalus*

První známky selektivního značení sekretorického epitelu cementových orgánů bichira reakcí PAS se objevují na jediném kryostatovém řezu embryem ve stádiu 21 (tedy výrazně dříve, než prokázali Diedhiou & Bartsch (2009), uvádějící st. 28, ekviv. st. 25 dle M. Král'oviče). Jedná se však o neostrou, jemně narůžovělou oblast na vnitřní straně dorzální stěny orgánu. Pravidelně se růžová značka objevuje až ve stádiu následujícím, kdy se zřetelně barví úzká apikální zóna u všech buněk sekretorického epitelu (obr. 4C,



pravý cementový orgán). Tato oblast taktéž obsahuje značné množství pigmentových granulí. Ta však zasahují hlouběji do cytoplasmy, než značené mukopolysacharidy. V dalších stádiích je patrné hromadění sekretorických produktů v buňkách. U zcela otevřených cementových orgánů pak největší obsah mukopolysacharidů vykazují periferní buňky orgánu, které sekretují přímo do vnějšího prostředí a oproti buňkám centrálním, sekretujícím do lumen pohárkovitého orgánu, jsou také více protáhlé. Na řezech značených PAS je ve stádiu 27 patrné větší množství cév, které svědčí o počínající degradaci orgánu (Kerr, 1907). Použitím metody na parafinové řezy dochází ke větší specifitě značení a eliminaci růžového pozadí (obr. 3D', E', F'). Tento postup však bude třeba v budoucí práci zavést především pro embrya drápatky. Míra nespecifického značení tkání je u kryostatových řezů embryi bichira mnohem menší a obvykle nepředstavuje závažný problém.

#### 5.4.2 Drápatka *Xenopus laevis*

Na kryostatových řezech embryi drápatky vykazuje metoda značnou tendenci barvit intenzivně a neselektivně všechny tkáně. Při kratších barvicích časech však lze tento problém eliminovat a umožnit tak i souběžné značení PAS preparátů protilátkami značenými křenovou peroxidázou (HRP). Po aplikaci PAS na řezy cementovými orgány je v sekretorických buňkách patrný gradient koncentrace mukopolysacharidů, klesající směrem od apikální membrány k membráně bazální (obr. 1B'', 7D). Aplikace metody na parafinové řezy do značné míry řeší nespecifické značení (obr. 1B''). Pokud jde o vlastní cementový orgán, zjištění zůstávají v souladu s pozorovanými kryostatovými řezy. Vyšší kontrast signálu na parafinových řezech však umožňuje detekci ojedinělých PAS pozitivních buněk, rozmístěných ve značných rozestupech v pokožce embrya (obr. 1E). Jedná se o buňky, produkující zřejmě mukózní sekrety, chránící pokožku larvy. Granula s mukopolysacharidy jsou u těchto buněk zřetelně uspořádána těsně pod apikální membránou.

#### 5.4.3 Piskoř *Misgurnus fossilis*

Cementové orgány a obecně tkáně piskoře se ukázaly být k metodě značně nesenzitivní. K viditelnému obarvení sekretorického epitelu je nutný desetkrát až

patnáctkrát delší barvicí čas než u embrya bichira (cca 1 vs. 10-15 min). Zároveň se zdá, že signál stejné intenzity nalezneme kromě předpokládaného sekretorického epitelu taktéž v celé pokožce hlavy embrya (obr. 1C‘‘). Specifikem vlastní cementové žlázy je pak omezení signálu na apikální části protažených buněk. Mimo to byly v pokožce dorzálně i ventrálně od žlázy pozorovány osamocené buňky se shluky PAS pozitivních váčků (obr. 1E‘), zřejmě opět tzv. pohárkové buňky, produkující ochranný mukózní sekret.

## 6 Diskuse

Předchozí kapitola shrnovala data, získaná studiem několika zvolených druhů obratlovců, u jejichž larev nalézáme adhezivní orgány. V následujícím textu budou shrnuty přednosti a nedostatky jednotlivých použitých technik a na základě získaných dat se pokusím naznačit, které přístupy nám mohou být užitečné při posuzování vzájemné homologie adhezivních orgánů, a které výsledky jsou naopak zavádějící.

### 6.1 Fylogenetika

Podíváme-li se na výskyt adhezivních orgánů v rámci strunatců, snadno si povšimneme, že se jedná o struktury značně rozšířené. U skupin, u nichž se nevyskytují, lze navíc při bližším zkoumání obvykle absenci poměrně snadno vysvětlit. Nejjednodušší je situace u amniot, primárně terestrických obratlovců, u nichž se mláďata po vylíhnutí nebo narození více či méně podobají dospělcům, chybí tedy jakékoli stádium podobné larvě, a tak i potřeba vytvářet přechodné orgány, umožňující prodloužit larvální vývoj adhezí k substrátu (viz Groppelli et al., 2003). Základním předpokladem pro výskyt přechodných larválních orgánů jakéhokoli typu je jednoduše existence larvy. Obdobně lze argumentovat u další velké skupiny obratlovců – paryb. Ty se variabilitou reprodukčních strategií v lecčem vyrovnají amniotům (pro přehled viz Musick & Ellis, 2005). U živorodých druhů se vyvinulo široké spektrum způsobů výživy zárodku a čerstvě narozená mláďata se už ve všech směrech podobají dospělým. Obdobně je tomu u oviparních druhů - některá mláďata po narození či vylíhnutí setrvávají určitý čas na dně, kde tráví zbytky žloutku, v žádném případě se však nejedná o larvy. Podobný je stav u latimérie, mořského zástupce svaloploutvých (Sarcopterygii), která taktéž rodí živá, plně vyvinutá mláďata.

Složitější je situace u červorů. Adhezivní orgány jim chybí jako jedinému řádu obojživelníků (Duellman & Trueb, 1986). Nutno však zdůraznit, že se opět jedná o skupinu s velmi odvozeným způsobem rozmnožování a řada druhů prodělává typický přímý vývoj. U části druhů se však setkáváme s larvami, a to včetně značně rozvinutých vnějších žaber, které jsou typickým larválním orgánem. Tyto larvy se vyvíjejí ve vodě nebo zahrabány v bahně, kde je pro ně získávání kyslíku zcela zásadní. K líhnutí však dochází ve značně pokročilém stádiu, larvy jsou tedy plně pohyblivé a adheze k vegetaci

či vodní hladině zde tedy již zřejmě není zapotřebí (Duellman & Trueb, 1986). Poslední velkou skupinou bez adhezivních orgánů zůstávají kruhoústí. Sliznatky (*Myxini*) prodělávají přímý vývoj (Gaisler & Zima, 2007), absence adhezivních struktur je tedy pochopitelná. Jinak tomu je u mihulí (*Petromyzontida*), u nichž nejenže nacházíme typickou larvu, ale tato se navíc živí podobným způsobem jako kopinotec, u nějž bylo kandidátních sekretorických orgánů popsáno hned několik. Přesto adhezivní orgány u mihulí známy nejsou.

Po tomto fylogenetickém exkurzu lze tedy dojít k závěru, že přítomnost adhezivních struktur představuje u obratlovců ancestrální stav. U všech skupin, v nichž tyto orgány nenacházíme, lze pro jejich absenci přednést logické argumenty. Ty lze rozdělit na vývojové (absence larvy, tedy stádia nutného pro expresi larválních znaků) a ekologické (specifický způsob života larvy, při němž se adhezivní orgán neuplatní). Také uvnitř výše zmiňovaných taxonů nacházíme srovnatelné příčiny absence či redukce adhezivních orgánů. U obojživelníků s přímým vývojem z terestrických vajec zcela pochopitelně žádné adhezivní orgány nejsou vyvinuty (jako příklad lze jmenovat žábu *Eleutherodactylus coqui* (Fang & Elinson, 1996). Taktéž u rheofilních larev ocasatých, které se líhnou s již vyvinutými končetinami, balancery z pochopitelných důvodů chybí (Crawford & Wake, 1998). Jako příčinu ekologickou lze uvést fakt, že u mořských ryb byl doposud popsán jediný druh s tímto typem orgánu (Wirtz, 1994; podle Britz et al., 2000), což lze přičíst častému planktonnímu rozmnožovacímu cyklu mořských druhů. Larvy se po narození nezdržují v místě líhnutí a rozptýlí se ve vodním sloupci, adhezivní orgán je tedy zbytečný. Taktéž však může jít o nedostatečnou znalost larválního vývoje těch mořských ryb, u nichž by bylo možné cementové orgány očekávat (pro přehled rozmnožovacích strategií, při nichž se uplatňuje larvální adheze (viz Balon, 1981). Zmíněná kategorizace příčin absence adhezivních orgánů je samozřejmě do jisté míry umělá a ekologie a ontogenetický vývoj se samozřejmě zásadním způsobem vzájemně ovlivňují.

## 6.2 Vnější morfologie

Význam morfologických dat spočívá především ve vyjevení kontextu, ve kterém studované orgány vznikají. Po dlouhou dobu však byla sdílená morfologie také zásadním argumentem pro homologii (více viz Hall, 1994). Mezi předpoklady homologizace

orgánů býval uváděn především sdílený embryonální původ a shodná pozice orgánu na těle živočicha. Podíváme-li se na adhezivní žlázy strunatců, je na první pohled zřejmé, že tyto předpoklady nespĺňují. Nicméně s pokroky především v genetice se objevují nové koncepty, které umožňují považovat za homologické i orgány a struktury, které tyto předpoklady ne zcela napĺňují (viz kapitola 7.6).

Data ze skenovací elektronové mikroskopie ukazují poměrně značnou variabilitu ve vnějším uspořádání orgánu (obr. 1). Nicméně umožňují studovat pouze morfologii povrchu žlázy, z níž obvykle nelze odvodit detaily vnitřní struktury orgánu. Z hlediska posouzení homologie může být důležitá informace o lokalizaci adhezivní žlázy. U bichira pozorujeme, že se párové cementové orgány zakládají na anteriorním konci embrya a v pozdějších stádiích se v úzkém prostoru mezi žlázami a žloutkovým váčkem otevírají ústa, jak ostatně ve své práci ukázal již Kerr (1907). S diferenciací ústního aparátu ztrácí postupně orgány svou funkci a zanikají jako nepatrné struktury na horním rtu. Naproti tomu ústa drápatky se otevírají nad cementovou žlázou (obr. 5D') a k regresi orgánu dochází v ektodermu asociovaném s dolní čelistí (van Evercooren & Picard, 1978). Balancery žebrovníka vznikají přibližně v oblasti maxilomandibulární kondenzace buněk neurální lišty (obr. 9A, srov. s Černý et al., 2004), z níž se v dalším vývoji diferencuje palatoquadratum a mandibula (Černý et al., 2004). Ačkoliv se v pozdějších stádiích zřetelně pojí s distálními částmi horní čelisti, ze získaných snímků je možné pouze konstatovat, že vznikají kaudálně od budoucích úst. Vzhledem k jejich laterální pozici není z dostupných stádií patrné, zda se vznikající ústa otevírají nad nebo pod základy balancerů (srov. Crawford & Wake, 1998). Jednoznačně nad ústy je umístěna cementová žláza piskoře, která se tedy nachází na topograficky podobném místě jako cementové orgány bichira, s tím rozdílem, že se jedná o jedinou mediálně ležící žlázu (obr. 1). Prostor mezi žlázou a žloutkem je nicméně větší než u bichira, u kterého cementové orgány po určitou dobu vznikající ústa zakrývají.

Z výše uvedeného je zřejmé, že v umístění orgánů nalézáme zásadní odlišnosti. Nicméně je nutné brát v úvahu také stádia, v nichž se tyto struktury zakládají. Crawford & Wake (1998) například tvrdí, že balancer je struktura vázaná na maxilární ektoderm, zatímco žlázy žab na mandibulární, uvádí jako argument proti jejich homologii. Uvědomíme-li si ale, v jakém kontextu orgány vznikají, ztrácí toto tvrzení na váze. Ve stádiu 17, kdy se u embrya drápatky objevují první náznaky cementové žlázy, navazuje tato oblast bezprostředně na anteriorní konec neurální trubice (Veeman et al., 2010). Mandibulární lokalizace cementové žlázy je tak čistě důsledkem pozice vznikajících úst

v pozdějších stádiích. O kontextu, v jakém se zakládá samotná žláza, však nic nevyovídá. Podíváme-li se na balancery žebrovníka, zakládají se na počátku diferenciaci jednotlivých základů žaber (přibližně ve stádiu 27; Shi a Boucaut, 1995). U axolotla (Černý et al., 2004) ve srovnatelném stádiu (34-35, dle Bordzilovskaya et al., 1989) teprve počíná rozdělení maxilomandibulární kondenzace na jednotlivé populace. Při topografickém srovnání obou druhů se zdá, že pozice základů balanceru odpovídá právě maxilomandibulární kondenzaci axolotla, nikoliv již diferencované maxile. Na příkladu drápatky a žebrovníka si tedy lze snadno představit, že finální poloha orgánu je pouze vedlejším projevem konkrétní a druhově specifické dynamiky vývoje orálních struktur.

Studované druhy jeví některé zajímavé podobnosti v uspořádání povrchu adhezivních žláz. Novým zjištěním je především nápadný menší průměr apikálních membrán sekretorických buněk oproti buňkám okolní pokožky (obr. 1A', B', C'), a to u všech druhů. Možným vysvětlením je výrazná elongace buněk, která by při malé změně objemu k podobnému stavu nevyhnutelně vedla. Důsledkem tohoto stavu je pak vyšší koncentrace sekretorických buněk na malé ploše žlázy. U žebrovníka a piskoře pak byly pozorovány kuželovité výběžky (obr. 1C', D'), popsané i u jiných druhů (Britz et al., 2000) a zmiňované v souvislosti se zvětšováním plochy pro distribuci adhezivního sekretu a tedy i adhezivních schopností. Otázkou je, proč nejsou podobné struktury vyvinuty u bichira a drápatky. U prvního zmiňovaného druhu snad samotný komplikovaný tvar orgánu vytváří dostatečný povrch pro udržení adhezivního sekretu. Podobně je tomu zřejmě u skalár, kde však bylo pozorováno výrazné zvrásnění epitelu. (Bennemann & Pietzsch-Rohrschneider, 1978). Drápatka za účelem adheze vytváří dlouhé lepkavé vlákno. Mechanismus jeho uchycení k povrchu žlázy však na základě získaných snímků nelze dedukovat.

Pro posouzení homologie se SEM zdá nejpřínosnější jako technika, kterou lze velmi kvalitně zobrazit vnější morfologii orgánů v kontextu celého embrya, a to ve značně vysokém rozlišení. Samotné detaily utváření povrchů buněk mohou být důsledkem specifického způsobu použití orgánů a o homologii nemusí nic vypovídat. Nápadná je v tomto směru dichotomie v uspořádání povrchu sekretorických buněk (výskyt vs. absence kuželovitých výběžků), pro jejíž vysvětlení by bylo nutné podrobné komparativní studium funkce jednotlivých typů orgánů.

## 6.3 Histologie

Histologické řezy umožňují do jisté míry interpretovat povrchovou informaci, získanou pomocí SEM. Zpracování série všech stádií, v nichž se adhezivní žlázy vyvíjejí, umožňuje sledovat změny tkáňového kontextu a dynamiku vývoje okolních hlavových struktur. Z tohoto pohledu se jedná o velmi přínosnou techniku, díky níž je možné základní pochopení morfogeneze těchto orgánů a následná tvorba či korekce hypotéz o jejich homologii. Barvení Azure B/Eozin usnadňuje základní orientaci v tkáních, která je nutná pro analýzu výstupů z dalších technik, především imunohistochemie, aplikované na kryostatové řezy, jež neumožňují tak dokonalé zachování struktury tkání. V případě bichira už pouhé použití této techniky naznačuje entodermální původ základů cementových orgánů (Kerr, 1907), avšak pouze na základě podobné zrnitosti buněk, způsobené vyšším obsahem žlutkových granulí v entodermu. Raná stadia bichira obecně vykazují vysoké množství žlutkových granulí v buňkách, což činí jednotlivé epitely těžko odlišitelnými (v porovnání např. s piskořem). Přesto právě kombinace Azure B/Eozinu a JB-4 histologie umožňuje poměrně dobrou vizualizaci buněk ektodermu s možností rozlišení jeho dvou vrstev v místech, kde ke spodní vrstvě přiléhá základ cementového orgánu (obr. 4F). Stejně zřejmý je pak původ cementové žlázy drápatky (dobře patrný i v Nieuwkoop & Faber, 1967) a piskoře ve svrchní vrstvě ektodermu (obr. 6A', 8A') elongací a diferenciací buněk, která je zvláště patrná u drápatky. Není třeba připomínat, že znalost zárodečné vrstvy, ze které žláza vzniká, je důležitá pro úvahy o její homologii.

Zásadním příspěvkem k takovým úvahám je také vyjevení tkáňového kontextu vznikající žlázy. U drápatky je zřejmé, že žláza vzniká v oblasti, kde se bezprostředně stýká ektoderm s anteriorním entodermem (obr. 10B, více viz Dickinson & Sive, 2007, srov. též Veeman et al., 2010). Dorzálněji se vyvíjí mozek, ventrálně pak kontakt zárodečných vrstev narušuje mezoderm (Dickinson & Sive, 2007). Na základě získaných dat se zdá, že přes veškeré odlišnosti je tento rozvrh sdílen s embryem bichira, ve kterém se cementové orgány zakládají v podobném kontextu, tedy v oblasti kontaktu ektodermu s entodermem, avšak v tomto případě nikoli z první, ale druhé zmiňované vrstvy (obr. 10A). Popsaná konfigurace epitelů v anteriorní části embrya by mohla umožnit sdílení signalizačních pochodů mezi zárodečnými vrstvami u na první pohled tak rozdílných orgánů. Vzhledem k poměrně dobře známým mechanismům indukce cementové žlázy u drápatky (Bradley et al., 1996; Sive & Bradley, 1996; Dickinson & Sive, 2007) by tedy

bylo vhodné pokročit v tomto směru také u bichira. Odlišný je stav u piskoře. Cementová žláza se zakládá ve svrchní vrstvě anteriorního ektodermu, pod níž se vyvíjí mozková tkáň předního mozku (obr. 10C). Ústa se zakládají více ventrálně, nad místem, kde ektoderm přechází na žloutkový váček. Tato situace spíše připomíná vývoj cementové žlázy tetry *Astyanax mexicanus*, která se zakládá v dorzálním ektodermu, ležícím na rozhraní středního a zadního mozku (Pottin et al., 2010).

Ukazuje se, že použití pryskyřice (JB-4) umožňuje uchovat tkáně a buňky během krájení ve velmi dobrém stavu, což se projeví především při snaze o rozpoznání jednotlivých vrstev pokožky a jejich příspěvcích do adhezivních orgánů. Rozlišovací schopnosti JB-4 histologie dále potvrzují platnost v literatuře popisovaných cytologických charakteristik sekretorických buněk (např. Groppelli et al., 2003) na studovaných orgánech, a to u všech zkoumaných druhů. Jak bylo však v této práci už několikrát zmíněno, samotné cytologické charakteristiky pro odhalení homologie nestačí, neboť extrémní polarizace buněk je pro jejich intenzivní sekretorickou funkci nevyhnutelná. Z tohoto pohledu přínos JB-4 spočívá právě v možnosti do poměrně jemných detailů vizualizovat tkáňový kontext, ve kterém se orgány zakládají. Pokud jde o zárodečný původ orgánu, v případě bichira by bez prostudování více stádií mohlo snadno dojít k omylu. Po otevření entodermálního váčku a fúzi jeho okrajů s okolní pokožkou totiž výsledné uspořádání působí dojmem, jako by cementový orgán vznikl ze spodní vrstvy pokožky a v místě jeho otevření pouze chyběla vrstva svrchní. Ostatně na tento problém upozorňuje ve své práci už Kerr (1907). JB-4 histologii je tedy nutné aplikovat na větší sérii stádií a pokud možno doplnit dalšími technikami. Pro podrobnější zkoumání samotných orgánů a sekretorických buněk by připadaly v úvahu další techniky, jako semitenké řezy, případně transmisní elektronová mikroskopie (srov. obrázky v Zeiske et al., 2009).

## 6.4 Imunohistochemie

Aplikace imunohistochemických technik na kryostatové, případně parafinové řezy má nevýhodu v horším uchování tkání během krájení a především vypadávání velkých shluků buněk ze žloutkových váčků při zpracovávání řezů. Vzhledem k nepřehledným možnostem výběru protilátek a tedy selektivní vizualizace tkáňových rozhraní, významných proteinových markerů a buněčných procesů od pohybu po



buněčnou smrt má však tato technika při budoucím použití potenciál přinášet množství zásadních informací jak o morfogenezi, tak o samotné homologii orgánů mezi obratlovci, respektive strunatci.

Pro účely vzájemného rozlišení diferencovaných epitelů jednotlivých zárodečných vrstev byla použita protilátka proti fibronektinu, přítomnému v bazálních membránách. Jak se ukázalo, fibronektin nejen umožňuje značně usnadnit základní orientaci v tkáňovém kontextu morfogeneze adhezivních orgánů, ale leccos vypovídá také o její dynamice. Dickinson a Sive (2006) ve své práci popisují detaily vzniku úst u drápatky a ukazují, že první známkou počínající morfogeneze orální oblasti je rozrušení bazální membrány, oddělující epitely anteriorního ektodermu a entodermu, které jsou v této oblasti v přímém kontaktu (viz též Dickinson & Sive, 2007). V souladu s touto prací bylo rozrušení bazální laminy pozorováno u embryí ve stádiu 35/36 (obr. 6D). Předchází tak zásadním modifikacím ekto-entodermálního rozhraní, které se v následujících stádiích ztenčuje, a obě vrstvy posléze splývají, aby vytvořily bukofaryngeální membránu (Dickinson a Sive, 2006). Změny v rozložení fibronektinu jsou tedy první známkou nastávajících morfogenetických pochodů a umožňují definovat počátek vzniku úst. Naproti tomu na bázi cementové žlázy zůstává bazální lamina zachována beze změn, což naznačuje, že oblast je plně diferencovaná a nedochází zde k zásadnějším epiteliálním přestavbám. Na základě těchto poznatků lze dále interpretovat data, získaná aplikací protilátky na embrya dalších druhů.

Na počátku vzniku cementových orgánů u bichira umožnilo značení na fibronektin prokázat kontinuitu entodermu anteriorní části faryngu a cementových orgánů. Vychlípující se entodermální váčky si tedy v první fázi zachovávají bazální laminu. Nicméně v dalších stádiích dochází k podobnému jevu, jaký pozorujeme v případě vzniku úst u drápatky. Konkrétně ve stádiu 22, kdy už jsou váčky u bichira zcela odděleny od entodermu, naznačuje rozrušení bazální laminy na jejich anteriorním konci počátek splývání váček s ektodermem (obr. 4C). V následujících stádiích je pak zřetelná kontinuita bazální laminy pokožky a báze váčku, který se postupně otevírá do vnějšího prostředí (obr. 3E', F'). Opět je vhodné připomenout, že bez znalosti morfogeneze raných stádií by tato situace ukazovala na ektodermální původ orgánů (Kerr, 1907).

Protilátka v pozdějších stádiích zřetelně značí jednotlivé mezenchymatické buňky, které se dostávají do oblasti báze cementových orgánů zřejmě migrací buněk neurální lišty. Množství mezenchymu vysvětluje nezdary s extirpací povrchových tkání

za účelem vizualizace pozice orgánů v rámci vyvíjející se hlavy pomocí SEM. Je zřejmé, že po odstranění ektodermu byl odkryt pouze pod ním ležící mezenchym, jenž netvoří dostatečně kompaktní vrstvu, aby byla dobře viditelná a v ideálním případě odpreparovatelná pod binokulární lupou. Značení bohužel neumožnilo vzájemně rozlišit svrchní a spodní vrstvu ektodermu, jejichž rozpoznání a kvalitní vizualizace by byly nutné pro detailní popis mechanismu otevírání cementových orgánů bichira. Taktéž se nepodařilo úspěšně aplikovat protilátky u piskoře. Pro účely budoucí práce tak bude zřejmě nutné pro tento druh modifikovat protokol, případně testovat další protilátky.

S použitím značené protilátky proti fibronektinu se ukázalo, že u bichira lze v orální oblasti pozorovat podobné pochody a konfigurace epitelů, jaké jsou známy u drápatky (Dickinson & Sive, 2006; Dickinson & Sive, 2007). Vystává tak otázka, zda je možné popsanou situaci vysvětlit existencí extrémně anteriorní domény, popisované v práci Dickinson a Sive (2007). Cementové orgány bichira se evidentně zakládají v anteriorní oblasti charakterizované kontaktem ektodermu a ektodermu, což odpovídá definici této domény. Zmiňovaní autoři však kromě cementové žlázy studují také otevírání úst a vznik adenohipofýzy. Odpovídající data pro bichira bude tedy pro posouzení této možnosti třeba dodat. V popsaném schématu je mezi studovanými druhy nápadný zásadní rozdíl, totiž pozice adhezivních žláz vzhledem k ústům. Jak bylo několikrát uvedeno, u drápatky ústa vznikají dorzálně od jediné, mediálně uložené žlázy (Wardle & Sive, 2003; Dickinson & Sive, 2007 aj.), zatímco u bichira ventrálně mezi cementovými orgány. Bude zajímavé zaměřit se na mechanismy, stojící za těmito rozdíly. Nabízí se možnost, že za odlišnou vzájemnou pozici obou struktur budou stát už rozdíly v jejich primární indukci. U drápatky jsou však ústa definována mnohem později než cementová žláza (Dickinson & Sive, 2007). Stejně tak je tedy možné, že pozice úst u bichira je ovlivněna dynamikou vývoje dříve indukovaných cementových orgánů, které v anteriorní oblasti zásadním způsobem mění rozložení epitelů a mohou tak ovlivňovat difuzi a překryv signálních molekul.

V souvislosti s cementovými orgány bichira se ovšem nabízí ještě další modely, které je možné na jejich morfogenezi aplikovat. Morfogeneze cementových orgánů totiž nápadně připomíná schéma vývoje žaberních výchlipků. Ty se taktéž zakládají jako oblasti, v nichž entoderm kontaktuje ektoderm bez účasti mezenchymu (Graham et al., 2005). Vznikající výchlipky se následně otevírají do vnějšího prostředí, pochopitelně však bez ztráty kontaktu s faryngem. Graham et al. (2005) zdůrazňuje řídicí úlohu morfogeneze faryngeálních štěrbin pro vývoj celého žaberního aparátu. Quinlan et al.

(2004) se pak podrobně zabývá mechanismem jejich tvorby a popisuje síť aktinových vláken, která se vytváří na apikálních membránách buněk právě v oblasti vznikajících výchlipků a asociována je pomocí N-cadherinu. Tato síť umožňuje zřejmě prohýbání epitelu a tím samotnou tvorbu výchlipků. Je tedy pravděpodobné, že podobný mechanismus bude stát také za morfogenezí cementových orgánů, alespoň v první fázi, kdy se vytváří výchlipky v anteriorním entodermu. Nicméně otázkou opět je, jaký přínos by měla tato data pro posuzování homologie cementových orgánů. Je možné očekávat, že v rámci faryngu bude podobný typ morfogeneze zajišťován stejnými procesy jednoduše proto, že se jedná o běžný molekulární mechanismus, kterým epitelové buňky obecně dosahují pozorovaných změn v uspořádání. V případě jakékoli zjištěné specificity zmiňovaných mechanismů by však situace byla o poznání zajímavější. V úvahu by také připadaly hypotézy o vzniku cementových orgánů kombinací více morfogenetických modulů za účasti několika regulačních domén, v tomto případě například modulu adhezivního orgánu a faryngeální výchlipky.

## 6.5 Barvení PAS

Aplikace metody PAS se ukázala užitečná především jako doplňkové barvení k imunohistochemickým technikám, protože umožňuje jednoduše vizualizovat sekretorický epitel a usnadnit tak orientaci v preparátu. Během barvení se ovšem objevily komplikace, způsobené různou citlivostí metody pro jednotlivé studované druhy. Především tkáně drápatky vykazovaly značnou tendenci reagovat rychlým zabarvením. Vliv na výsledek reakce mohly mít zbytky formaldehydového fixativa PFA, které představuje vhodný substrát pro vznik barevného produktu. Kvůli prosycení embryonálních tkání, přes důkladné promytí, tak mohlo docházet k nespecifickému značení ostatních tkání. Přesto i při přebarvení byl patrný intenzivnější odstín značky u sekretorických buněk (obr. 6C). Při opožděném zastavení reakce však hrozilo, že přes sytě růžové pozadí nebude možné pozorovat primární imunohistochemickou značku. Barvicí protokol tedy bylo nutné modifikovat pro želatinové řezy, u kterých dochází k reakci mnohem rychleji než u řezů parafinových, pro které je technika původně určena. Barvicí časy byly upraveny s ohledem na vlastnosti jednotlivých druhů.

Po modifikaci protokolu u všech studovaných druhů došlo k obarvení cementových orgánů (obr. 1A'', B'', C''). Technika tak umožňuje zřetelnou lokalizaci

sekretorického epitelu na hlavě embrya a důkaz sekrece mukopolysacharidů (Pottin et al., 2010), který umožňuje žlázy odlišit například od tzv. „hatching glands“. Na histologických řezech je při dobrém zachování struktury tkání možné vidět rozdílný obsah značených mukopolysacharidů v různých částech buněk. Data jsou tedy užitečná jak při srovnávání charakteristik sekretorických buněk napříč studovanými druhy, tak pro popis vývoje a změn sekretorické aktivity během diferenciaci a činnosti orgánu. Nicméně již ze samotného principu metody vyplývá značná nespecifita značení. Mukopolysacharidy jsou obecně základem mukózních sekretů různých typů, nejsou tedy produkovány pouze adhezivními žlázami. Například v medicínském výzkumu je značení PAS používáno ke studiu mukózních žlázek v dýchacích cestách (např. Tos, 1970). Jak naznačují výsledky této práce, také u drápatky a piskoře metoda značí kromě cementovaných orgánů i další sekretorické buňky rozmístěné v pokožce a produkující zřejmě ochrannou mukózní vrstvu (obr. 1E, E'). Je tedy zřejmé, že pozitivita epitelu adhezivní žlázy na PAS o její homologii s ostatními adhezivními žlázami nic nevyovídá, neboť mukopolysacharidy jsou látky produkovány širokou škálou buněčných typů. Jejich přítomnost v sekretorických buňkách orgánů je tedy záležitostí ryze funkční a nemůže být použita jako argument pro jejich homologizaci.

Avšak přínos metody spočívá v možnosti potvrzení adhezivní funkce orgánů, u kterých je tato možnost pouze předpokládána. U zkoumaného jesetera *Acipenser ruthenus*, kde bylo značení PAS aplikováno na řezy stádií před a těsně po vylíhnutí, byla pozorována PAS pozitivní oblast epitelu, přestože podle některých pramenů má orgán dorzálně od úst představovat právě výše zmiňovanou „hatching gland“ (Bolker, 2004). U pozdějších stádií ze studované oblasti vznikají základy hmatových vousů. Zdá se tedy, že orgán opravdu plní funkci adhezivní žlázy, jak uvádí například Frankenberger (1927).

## 6.6 Teoretický rámec pro posouzení homologie

Jak vyplývá z prezentovaných výsledků a předcházející diskuse, vyslovit se pro homologii adhezivních žláz obratlovců (a tím spíše strunatců) není snadné. Zdánlivě jediným argumentem, který tuto možnost poměrně dobře podporuje, je výskyt podobných struktur u takřka všech skupin, u kterých má podobný orgán opodstatnění. Jakmile se však zaměříme na morfologii adhezivních orgánů, podobnosti se začínají vytrácet. Pomineme-li cytologické charakteristiky, jež jsou záležitostí zřejmě ryze funkční, orgány

se liší svou komplexitou, strukturou povrchu, počtem, relativní pozicí vůči ostatním hlavovým strukturám a konečně také svým zárodečným původem. Nebýt nápadné hojnosti adhezivních žláz napříč rozmanitým spektrem larev obratlovců a výskytu podobných struktur také u bazálních strunatců, málokdo by se o homologizaci vůbec pokoušel. Avšak při daném stavu věcí je otázka homologie stále aktuální. Přestože od popisu entodermálních cementových žláz bichira uplynulo již století, doposud žádná práce nepřinesla uspokojivé posouzení jejich vztahu k ostatním strukturám tohoto typu. Recentním autorům (Pottin et al.; 2010; Rétaux a Pottin, 2011) je dokonce entodermální původ těchto orgánů zcela neznámý a ve svých pracích je zmiňují ve výčtu obdobných adhezivních žláz přesto, že je odvozují od hypotetického sdíleného potenciálu ektodermu (*sic*) diferencovat se u larev obratlovců v sekretorický adhezivní epitel.

Obecně se zdá, že tendence detailně srovnávat adhezivní orgány napříč strunatci převažovala na počátku minulého století (Garstang, 1928; Frankenberger, 1927), zatímco recentní práce se zaměřují na srovnání v rámci nižších taxonů (např. Crawford & Wake, 1998; Gropelli et al., 2003). Avšak právě změny ve vnímání samotného konceptu homologie během posledních desetiletí mohou homologizaci adhezivních orgánů učinit snazší. Zatímco v předdarwinovských dobách by byly úvahy komplikovány pravděpodobně již odlišnou relativní pozicí orgánů a jejich morfologickou rozmanitostí, s Darwinem přichází kritérium společného původu, které těmto úvahám dává v případě cementových orgánů solidní základ (pro vývoj konceptu homologie viz Kleisner, 2007). Pokud jde o zdánlivě nejzásadnější překážku homologizace cementových orgánů, totiž nestejný zárodečný původ, tato byla v průběhu 20. století intenzivně diskutována (viz např. de Beer, 1958) a jak mimo jiné ukazuje kupříkladu nedávná práce Soukup et al. (2008) o dvojím embryonálním původu zubů u axolotla, nejedná se v důsledku o překážku nijak významnou.

V poslední době se do popředí dostává otázka genetických regulačních mechanismů, stojících za morfogenezí jednotlivých orgánů, čímž se otevírá další úroveň, v níž lze homologii hledat. Jak však upozorňuje Dickinson (1995), molekulární mechanismy jako důkazy jsou samy o sobě slabé a jejich homologie se nemusí vztahovat na jinou než právě samotnou molekulární úroveň. K tomuto problému se vztahuje pojem pleiotropie, tedy exprese téhož genu v různých kontextech, a její protiklad, tzv. „genetic piracy“, označující použití genu za účelem kontroly původně nesouvisejícího děje (např. Minelli, 1997). V těchto souvislostech je snadné si představit, že adhezivní orgány budou sdílet část regulačních mechanismů jednoduše proto, že dané geny jsou standardně

používanými nástroji např. pro diferenciaci epitelu na sekretorické buňky. V tom případě je dobře možné, že mimo tyto sdílené mechanismy bude za každým typem adhezivních orgánů stát jiná regulační síť, respektive modul, řídící samotnou morfogenezi struktur, na něž se samotný sekretorický epitel váže. Naproti tomu je možné, že se podobně regulované adhezivní orgány dvou druhů budou lišit v části řídící genové kaskády proto, že za určitým účelem může být v daném modulu využit více než jeden gen. Lze připomenout například cementové žlázy drápatky *Xenopus laevis* a tetry *Astyanax mexicanus*, které sdílí signalizaci *bmp4*, *pitx1* a *pitx2* (Pottin et al., 2010), avšak u druhého zmiňovaného druhu chybí exprese *agr2* (*xcg*), který je u drápatky považován za prekursor samotné adhezivní substance produkovaného sekretu (Sive & Bradley, 1996). Zdá se tedy, že u tetry je základem sekretu jiná molekula.

Od přelomu století se podařilo prokázat sdílené molekulární mechanismy u řady orgánů, které byly na dle morfologických a fylogenetických dat považovány za nehomologické (Shubin et al., 2009). Především na základě zjištění, že tyto sdílené mechanismy stojí i za tak vzdálenými orgány, jako jsou tělní přívěsky obratlovců a hmyzu, definoval Shubin et al. (1997) termín „deep homology“. Tato hluboká homologie se tedy vztahuje k společnému původu nikoli samotných orgánů, ale molekulárních mechanismů, které řídí jejich vznik. V tomto smyslu mohou být homologické i takové orgány, které se u společného předka dvou taxonů morfologicky neprojeví, přestože již existovalo potřebné genetické pozadí (Shubin et al., 2009). Autoři pak správně podotýkají, že odhalení těchto mechanismů může být užitečné v případech, kdy se samotná morfologická data jeví pro posouzení morfologie nedostatečná. Von Dassow a Munro (1999) se pak věnují vztahu jednotlivých regulačních modulů s morfologickými a zdůrazňují, že jakékoli homologické moduly musí být charakterizovány fylogenetickou kontinuitou napříč spektrem možných adaptivních změn. Wagner (2007) staví historickou kontinuitu celých genových regulačních sítí při posuzování homologie nad sdílenou expresi jednotlivých genů ve studovaných strukturách.

Existence morfogenetických modulů, odvíjejících se od sdílených regulačních mechanismů, je vhodným předpokladem k rozšíření úvah o homologii. Zatímco tradiční pojetí považuje homologii za veličinu čistě binární (Dickinson, 1995), modulární pojetí umožňuje s konceptem pracovat takřka v duchu molekulárně biologického přístupu, který dovoluje přímo procentuální vyjádření (Fitch, 2000). Z hlediska morfologie je tak možné uvažovat nehomologické orgány, jejichž jednotlivé části nacházejí homologické protějšky u jiných organismů (Bolker & Raff, 1996; v tomto případě ovšem musíme homologii

posuzovat u každé autonomní části zvlášť, výstup je tak v důsledku opět ano/ne). Toto pojetí je pro některé typy adhezivních orgánů přímo ideální. Například o balancerech ocasatých obojživelníků je tak možno uvažovat jako o integraci dvou původně nezávislých modulů, totiž modulu adhezivního orgánu, shodného s ostatními obratlovci, a modulu vnější žábry, na jejíž morfogenezi vznikající balancery zřetelně upomínají.

Pod touto optikou je možné začít zcela nově spekulovat o původu cementových orgánů bichira. Jelikož se zdá, že adhezivní žlázy bichira sdílí některé klíčové geny s drápatkou (Sive & Bradley, 1996; Suda et al., 2009), je možné předpokládat, že na jejich indukci se podílí obdobné regulační mechanismy. Srovnáním s prací Dickinson a Sive (2007) se navíc zdá, že sdílena je také embryonální doména, ve které se zakládají adhezivní žlázy a později ústa. Samotný orgán však vzniká na zcela jiném základě. Zde je místo právě pro uplatnění principu modularity, který umožňuje posuzovat zvlášť adhezivní epitel a zvlášť morfogenezi orgánu jako takovou. Vracíme se tak k úvahám Garstanga (1928) a jím nabízené možnosti původně entodermálních adhezivních orgánů, které byly u většiny linií později „zjednodušeny“ na ektoderm. Takovýto posun se zdá být přirozený v tom smyslu, že ektoderm představuje vrstvu, která je v přímém kontaktu s vnějším prostředím, k využití za účelem tohoto typu interakce má tedy relativně nejbližší. Z pohledu výše probíraných konceptů je tak možné pojednávat homologie modulu adhezivního epitelu a modulu faryngeální morfogeneze odděleně.

## 7 Závěr

V této práci byly zkoumány adhezivní orgány bichira, drápatky, piskoře a žebrovníka s cílem zvážit možnosti a úrovně homologie těchto struktur. Za tímto účelem byla shromážděna data týkající se vnější morfologie, histologie, dynamiky zúčastněných tkání, imunohistochemie a sekrece adhezivních látek. Na první pohled jsou nápadné značné rozdíly v umístění orgánů na hlavě. Párové cementové orgány bichira se zakládají anteriorně nad žloutkovým váčkem, k otevírání úst poté dochází ventrálně od nich. Podobně je tomu u piskoře, avšak kontakt žlázy s ústy není tak těsný. U drápatky naproti tomu ústa vznikají dorzálně od cementové žlázy. Relativní pozice balancerů žebrovníka je interpretovatelná obtížněji, jelikož vznikají v místě maxilomandibulární kondenzace. Ve výsledku se tedy nacházejí laterálně/posteriorně od úst.

U bichira a drápatky cementové orgány vznikají v podobném tkáňovém kontextu, tedy v místě kontaktu anteriorního entodermu s ektodermem. U piskoře naopak žláza vzniká v ektodermu nad neurální trubicí, tedy bez přímé účasti entodermu (obr. 10). Přestože u bichira diferencovaný sekretorický epitel plynule navazuje na buňky pokožky, mladší stádia ukazují, že cementový orgán vzniká odštěpením z anteriorního entodermu a následným otevřením do vnějšího prostředí, což je v souladu s výsledky Kerrovy studie (1907). Tato zásadní skutečnost je však moderní literaturou zcela opomíjena, a to dokonce v případech, kdy jsou cementové orgány bichira zmiňovány v rámci úvah o homologizaci adhezivních orgánů obratlovců (např. Pottin et al., 2010). Kerr (1907) pouze schématicky popisuje vývoj cementových orgánů na histologických řezech. Od doby publikování byla navíc tato práce téměř zapomenuta. Přestože Diedhiou a Bartsch popisují podrobně vývoj bichira v recentní práci (2009), cementovým žlázám se věnují pouze deskriptivně v rámci popisu stupně jejich vývoje v jednotlivých stádiích.

Data, shromážděná pro tuto diplomovou práci, definitivně potvrzují entodermální původ cementových orgánů bichira, a to na základě histologie i imunohistochemie, aplikované na kompletní sérii stádií, v nichž se orgány formují. Aplikace imunohistochemického značení fibronektinu pak vyjevuje mimo jiné změny bazální laminy v anteriorní oblasti embrya bichira, srovnatelné s procesy známými u drápatky (Dickinson & Sive, 2006). V kombinaci s imunohistochemií se osvědčilo použití techniky PAS pro značení mukopolysacharidů, které přidává informaci o začátku sekretorické aktivity buněk a přehledně vizualizuje epitel adhezivních orgánů na řezech.



Kromě nich lze pak v pokožce embryí pozorovat také jednotlivé mukus-sekretující buňky, které zřejmě produkují ochrannou mukózní vrstvu pokožky.

Jak plyne již z úvah prezentovaných v předchozí kapitole, získaná data rozšiřují naše znalosti o morfogenezi adhezivních orgánů, nicméně ani při důkladném mezidruhovém srovnání nejsou dostatečnými vodítky pro definitivní posouzení homologie jednotlivých typů žláz. Fylogenetické rozložení adhezivních orgánů ukazuje, že jsou přítomny téměř u všech skupin, u nichž se vyskytují typické vodní larvy. V rámci těchto skupin se pak jejich výskyt nebo absence odvíjí od způsobu rozmnožování a konkrétní ekologie daného druhu a jsou tak často jednoduše vysvětlitelné (viz kapitolu 6.1). Avšak přidáme-li do srovnání další parametry, jako je embryonální původ, pozice vzhledem k ústům a uspořádání adhezivního epitelu, z obecné hojnosti adhezivních struktur vyplývající možnost homologie se najednou zcela rozpadá. Je tedy třeba zaměřit se na další možné úrovně.

Metoda značení mukopolysacharidů pomocí reakce PAS, kterou Pottin et al. (2010) uvádí ve výčtu společných vlastností cementových orgánů drápatky a tetry, se ukázala při posuzování homologie jako zavádějící. PAS pozitivní buňky se nacházejí také volně v pokožce (obr. 1E, E'). Nelze tak vyloučit například hypotézu, že u Teleostei vznikly cementové orgány právě agregací pokožkových buněk, produkujících ochrannou mukózní vrstvu (Britz et al., 2000). Také pokud uvážíme například rozdíl v pozici cementové žlázy vzhledem k ústům u drápatky a bichira, popsaná situace se jeví jako zásadně odlišná. Když si ale uvědomíme, že cementová žláza je indukována mnohem dříve než ústa, jejich výslednou vzájemnou pozici můžeme přičíst právě rozdílům v morfogenezi adhezivní žlázy, která ovlivňuje uspořádání okolních tkání a pravděpodobně také difuzi a překryv signálních molekul.

Z výše uvedeného vyplývá, že spíše než pro ultimátní posouzení homologie (či jejích úrovní) jsou získaná data přínosná pro tvorbu nových hypotéz, které bude možné testovat v následující práci. U bichira se nabízí srovnání morfogeneze cementových orgánů a úst s morfogenezí struktur tzv. extrémně anteriorní domény u drápatky (Dickinson & Sive, 2007), případně objasnění mechanismu tvorby anteriorních entodermálních výchlipek a jeho srovnání se vznikem obdobných struktur dále ve faryngu. V další práci tedy bude nutné podrobně popsat souvislosti morfogeneze úst a cementových orgánů a rozšířit spektrum aplikovaných protilátek o takové, které umožní vizualizaci molekul, podílejících se na změnách v uspořádání epitelů.

Co se týče charakteristiky samotného adhezivního sekretu, bude vhodné provést proteomické srovnání produkovaných sekretů nebo použít známé markery cementových orgánů drápatky, jejichž produkty jsou právě složky adhezivní látky. Na příkladu práce Pottin et al. lze představit rozdílné výsledky, ke kterým vedou tyto přístupy v porovnání s technikou PAS. Zatímco u obou druhů se žláza jeví PAS pozitivní, u tetry *Astyanax mexicanus* nebyla prokázána exprese genu *agr2* (Pottin et al., 2010), jehož produktem je mucinu podobný základ sekretu žlázy drápatky (Sive & Bradley, 1996). Cementové orgány tak vytváří sice v principu podobné sekrety, avšak lišící geny, které je kódují.

Tím se dostáváme k mezidruhovému srovnávání exprese genů ve vyvíjejících se adhezivních orgánech a obecně anteriorní části hlavy. Toto srovnání se jeví logickým pokračováním zde prezentované práce, pokud chceme porozumět mechanismům, které stojí za rozdílnou morfogenezi jednotlivých typů adhezivních žláz. Odhalení genových regulačních mechanismů bude užitečné pro aplikaci hypotézy o extrémně anteriorní doméně (Dickinson & Sive, 2007) na bichira. Jako zajímavý model se v tomto směru jeví balancery ocasatých obojživelníků, které v raných stádiích morfogeneze připomínají zakládající se vnější žábry. Vzhledem k dlouhodobému výzkumu embryí axolotla *Ambystoma mexicanum* v naší laboratoři, včetně techniky *in situ* hybridizace a možností transplantací tkání z GFP exprimujících jedinců, se nabízí zavedení příbuzného axolotla skvrnitého (*A. maculatum*), u kterého se na rozdíl od prvního zmiňovaného druhu balancery vyskytují. U takto blízce příbuzných druhů je pravděpodobná úspěšná aplikace dostupných hybridizačních proub, stejně jako xenotransplantace GFP exprimujících tkání.

Přínosem této práce bylo, kromě prezentovaných výsledků, především otestování mikroskopických, histologických a imunohistochemických technik na různých druzích povětšinou nemodelových organismů s ohledem na možnost jejich dalšího srovnávání a interpretace získaných dat. Především bichir se pak ukázal zásadní pro další posuzování homologie cementových orgánů, a to bez ohledu na úvahy o homologii cementových orgánů. Ať se totiž ukáže, že struktury jsou přes zásadní odlišnosti v původu a morfogenezi homologické, nebo se jedná o evoluční novinku, vzniklou modifikací vývoje anteriorního faryngu, zcela jistě jde o unikátní řešení, které v této podobě nenalezneme u žádné jiné skupiny obratlovců.

## 8 Seznam použité literatury

- Andersson, E., Olsson, R. 1989.** The Oral Papilla of the Lancelet Larva (*Branchiostoma lanceolatum*) (Cephalochordata). *Acta Zool.* **70**, 53-56.
- Arnold, M., Kriesten, K., Peters, H.M. 1968.** Die Haftorgane von *Tilapia*-Larven (Cichlidae, Teleostei). Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **91**, 248-260.
- Balfour, F.M., Parker, W.N. 1882.** On the Structure and Development of *Lepidosteus*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **173**, 359-442.
- Ballard, W.W., Needham, R.G. 1964.** Normal embryonic stages of *Polyodon spathula* (Walbaum). *J. Morphol.* **114**, 465-477.
- Balon, E.K. 1981.** Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes. *Environ. Biol. Fish* **6**, 377-389.
- Bennemann, R., Pietzsch-Rohrschneider, I. 1978.** The Morphology of the Cement Gland Apparatus of Larval *Pterophyllum scalare* Cuv., Val. (Cichlidae, Teleostei). *Cell Tiss. Res.* **193**, 491-501.
- Bolker, J.A., Raff, R.A. 1996.** Developmental genetics and traditional homology. *Bioessays* **18**, 489-494.
- Bolker, J.A. 2004.** Embryology. In: LeBreton, G. *Sturgeons and paddlefish of North America*. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; Boston, 2004).
- Bordzilovskaya, N.P., Detlaff, T.A. 1979.** Table of stages of normal development of axolotl embryos and the prognostication of timing of successive developmental stages at various temperatures. *Axolotl Newsletter* No. 7.
- Bradley, L., Wainstock, D., Sive, H. 1996.** Positive and negative signals modulate formation of the *Xenopus* cement gland. *Development* **122**, 2739-2750.
- Braun, E., Peters, N., Stolz, M. 1996.** The adhesive organs of larval pike *Esox lucius* L., (Pisces). *Int. Rev. Ges. Hydrobio.* **81**, 101-108.
- Britz, R., Kirschbaum, F., Heyd, A. 2000.** Observations on the structure of larval attachment organs in three species of gymnotiforms (Teleostei, Ostariophysi). *Acta Zool.* **81**, 57-67.
- Brunelli, E., Perrotta, I., Bonacci, A., Tripepi, S. 2007.** The balancers of *Triturus italicus*: an ultrastructural approach. *Ital. J. Zool.* **74**, 135-142.
- Budgett, J.S. 1899.** Notes on the batrachians of the Paraguayan Chaco, with observations upon their breeding habits and development, especially with regard to *Phyllomedusa hypochondrialis*, Cope. Also a description of a new genus. *Q. J. Microsc. Sci.* **42**, 305-333.

- Budgett, J.S. 1901.** On the breeding-habits of some West-African Fishes, with an account of the external features in the development of *Protopterus annectens* and a description of the larva of *Polypterus lapradei*. In Kerr J. G. *The work of John Samuel Budgett, Balfour Student of the University of Cambridge: Being a Collection of His Zoological Papers, together with a Biographical Sketch by A. E. Shipley, F.R.S., and Contributions by Richard Assheton, Edward J. Bles, Edward T. Browne, J. Herbert Budgett and J. Graham Kerr.* (Cambridge University Press: 1907, pp120-142).
- Crawford, A.J., Wake, D.B. 1998.** Phylogenetic and evolutionary perspectives on an enigmatic organ: the balancer of larval caudate amphibians. *Zool. Anz.* **101**, 107-123.
- Cerny, R., Lwigale, P., Ericson, R., Meulemans, D., Epperlein, H-H., Bronner-Fraser, M. 2004.** Developmental origins and evolution of jaws: new interpretation of „maxillary“ and „mandibular“. *Dev. Biol.* **276**, 225-236.
- de Beer, G. 1958.** *Embryos and Ancestors.* (Oxford University Press: London, 1958).
- Dickinson, A., Sive, H. 2006.** Development of the primary mouth in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **295**, 700-713.
- Dickinson, A., Sive, H. 2007.** Positioning the extreme anterior in *Xenopus*: Cement gland, primary mouth and anterior pituitary. *Seminars in Cell, Dev. Biol.* **18**, 525-533.
- Dickinson, W.J. 1995.** Molecules and morphology: where's the homology? *Trends Genet.* **11**, 119-121.
- Diedhiou, S., Bartsch, P. 2009.** Staging of the Early Development of *Polypterus* (Cladistia: Actinopterygii). In: Kunz, Y. *Development of non-teleost fishes.* (Science Publishers: Enfield NH, 2009).
- Drysdale, T., Elinson, R.P. 1993.** Inductive events in the patterning of the *Xenopus laevis* hatching and cement glands, two cell types which delimit head boundaries. *Dev. Biol.* **158**, 245-253.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1986.** *Biology of Amphibians.* (London: The Johns Hopkins University Press).
- Eycleshymer, A.C., Wilson, J.M. 1908.** The Adhesive Organs of *Amia*. *Biol. Bull.* **14**, 134-1481.
- Fang, H., Elinson, R.P. 1996.** Patterns of Distal-less Gene Expression and Inductive Interactions in the Head of the Direct Developing Frog *Eleutherodactylus coqui*. *Dev. Biol.* **179**, 160-172.
- Fitch, W.M. 2000.** Homology. *Trends Genet.* **16**, 227-231.
- Fox, H. 1985.** Balancer Fine Structure of the *Pleurodeles* Larva. *Acta Zool.* **66**, 97-110.
- Fox, H. 1999.** Barbels and barbel-like tentacular structures in sub-mammalian vertebrates: a review. *Hydrobiologia* **403**, 153-193.

- Frankenberger, Z. 1927.** Über die morphologische Bedeutung der Haftorgane bei den Larven einiger niederer Vertebraten. *Zool. Anz.* **69**, 171-180.
- Gaisler, J., Zima, J. Zoologie obratlovců.** (Academia: Praha, 2007).
- Gamill, L.S., Sive, H. 1997.** Identification of *otx2* target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development* **124**, 471-481.
- Gamill, L., Sive, H. 2000.** Coincidence of *otx2* and BMP4 signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation. *Mech. Dev.* **92**, 217-226.
- Garstang, W. 1928.** The Morphology of the Tunicata, and its bearings on the Phylogeny of the Chordata. *Q. J. Microsc. Sci.* **72**, 51-187.
- Graham, A., Okabe, M., Quinlan, R. 2005.** The role of the endoderm in the development and evolution of the pharyngeal arches. *J. Anat.* **207**, 479-487.
- Groppelli, S., Pennati, R., Sotgia, C., de Bernardi, F. 2003.** Cement gland apparatus of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Teleostei, Cichlidae): functional morphology in comparison with adhesive organs of other Chordata. *Ital. J. Zool.* **70**, 133-139.
- Hall, B. Homology : the hierarchical basis of comparative biology.** (Academic Press: San Diego CA, 1994).
- Holland, N.D., Paris, M., Koop, D. 2009.** The club-shaped gland of amphioxus: export of secretion to the pharynx in pre-metamorphic larvae and apoptosis during metamorphosis. *Acta Zool.* **90**, 372-379.
- Katz, M.J. 1983.** Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* **164**, 1-27.
- Kerr, J.G. 1900.** The External Features in the Development of *Lepidosiren paradoxa*, Fitz. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **192**, 299-330.
- Kerr, J.G. 1907.** The development of *Polypterus senegalus* Cuv. by J. Graham Kerr, University of Glasgow. In Kerr J. G. *The work of John Samuel Budgett , Balfour Student of the University of Cambridge: Being a Collection of His Zoological Papers, together with a Biographical Sketch* by A. E. Shipley, F.R.S., and *Contributions by Richard Assheton, Edward J. Bles, Edward T. Browne, J. Herbert Budgett and J. Graham Kerr.* (Cambridge: Cambridge University Press, pp195-290).
- Kleisner, K. 2007.** The Formation of the Theory of Homology in Biological Sciences. *Acta Biotheor.* **55**, 317-340.
- Kostomarova, A.A. 1991.** The loach *Misgurnus fossilis*. In: eds Dettlaff, T.A., Vassetzky, S.G. *Animal species for developmental studies, Vol.2: Vertebrates.* (Consultants Bureau, New York: 1991, pp125-144).
- Kuratani, S., Nobusada, Y., Saito, H., Shigetani, Y. 2000.** Morphological Characteristics of the Developing Cranial Nerves and Mesodermal Head Cavities in

- Sturgeon Embryos from Early Pharyngula to Late Larval Stages. *Zool. Sci.* **17**, 911-933.
- Lacalli, T. 2007.** Mucus secretion and transport in amphioxus larvae: organization and ultrastructure of the food trapping system, and implications for head evolution. *Acta Zool.* **89**, 219-230.
- Long, W., Ballard, W. 2001.** Normal embryonic stages of the Longnose Gar, *Lepisosteus osseus*. *BMC Dev. Biol.* **1**, 6.
- Lunardi, A., Vignali, R. 2006.** Xenopus Xotx2 and Drosophila otd share similar activities in anterior patterning of the frog embryo. *Dev. Genes Evol.* **216**, 511-521.
- Merron, G., Holden, K.K., Bruton, M.N. 1990.** The reproductive biology and early development of the African pike, *Hepsetus odoe*, in the Okavango Delta, Botswana. *Environ. Biol. Fish.* **28**, 215-235.
- Minařík, M. 2009.** Vývojová morfogeneze přichytných žláz a orgánů u nižších obratlovců. *PřF UK v Praze*, bakalářská práce.
- Minelli, A. 1998.** Molecules, Developmental Modules, and Phenotypes: A Combinatorial Approach to Homology. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**, 340-347.
- Musick, J., Ellis, J. 2005.** Reproductive evolution in chondrichthyans. In: Hamlett, W. *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras*. (Science Publishers: Enfield NH, 2005, pp45-79).
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J. 1967.** *Normal Table of Xenopus laevis*. (Amsterdam: North-Holland Publishing Company).
- Nishida, H. 2008.** Development of the appendicularian *Oikopleura dioica*: Culture, genome, and cell lineages. *Dev. Growth Differ.* **50**, S239-S256.
- Nokhbatolfoghahai, M., Downie, J.R. 2005.** Larval Cement Gland of Frogs: Comparative Development and Morphology. *J. Morphol.* **263**, 270-283.
- Nozaki, M., Gorbmann, A. 1992.** The Question of Functional Homology of Hatschek's Pit of Amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the Vertebrate Adenohypophysis. *Zool. Sci.* **9**, 387-395.
- Pennati, R., Bolzern, A. M., Gropelli, S., Sotgia, C., de Bernardi, F. 2000.** The adhesive organs of Anura: a histological and molecular study. *Ital. J. Zool.* **67**, 1-8.
- Perry, M.M., Waddington, C.H. 1966.** The ultrastructure of the cement gland in *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **1**, 193-200.
- Phelps Allis, E.J. 1926.** On Certain Features of the Orbito-Ethmoidal Region in the Cyclostomata, Plagiostomi and Teleostomi. *J. Anat.* **60**, 164-172.
- Picard, J.J. 1975a.** Xenopus laevis cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: I. In vitro stimulation of differentiation by ammonium chloride. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 957-967.

- Picard, J.J. 1975b.** *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: II. The competence of embryonic cells. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 969-978.
- Pottin, K., Hyacinthe, C., Retaux, S. 2010.** Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *P. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17256-17261.
- Quinlan, R. 2004.** The role of actin cables in directing the morphogenesis of the pharyngeal pouches. *Development* **131**, 593-599.
- Rétaux, S., Pottin, K. 2011.** A question of homology for chordate adhesive organs. *Communicative, Integrative Biology* **4**, 75-77.
- Roberts, A., Blight, A.R. 1975.** Anatomy, physiology and behavioural role of sensory nerve endings in the cement gland of embryonic *Xenopus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 111-127.
- Sauka-Spengler, T., Germot, A., Shi, D. L., Mazan, S., 2002.** Expression patterns of an *Otx2* and *Otx5* orthologue in the urodele *Pleurodeles waltl*: implications on the evolutionary relationships between the balancers and cement gland in amphibians. *Dev. Genes Evol.* **212**, 380-387.
- Schweickert, A., Steinbeisser, H., Blum, M. 2001.** Differential gene expression of *Xenopus pitx1*, *pitx2b* and *pitx2c* during cement gland, stomodeum and pituitary development. *Mech. Dev.* **107**, 191-194.
- Shi, D., Boucaut, J. 1995.** The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 427-441.
- Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S. 1997.** Fossils, genes and the evolution of animal limbs. In: Gee, H. *Shaking the tree: readings from Nature in the history of life.* (University of Chicago Press: Chicago IL, 2000, pp100-128).
- Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S. 2009.** Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* **457**, 818-823.
- Sive, H., Bradley, L. A 1996.** Sticky problem: The *Xenopus* Cement Gland as a Paradigm for Anteroposterior Patterning. *Dev. Dyn.* **205**, 265-280.
- Sotgia, C., Fascio, U., Melone, G., de Bernardi, F. 1998.** Adhesive Papillae of *Phallusia mamillata* Larvae: Morphology and Innervation. *Zool. Sci.* **15**, 363-370.
- Soukup, V., Epperlein, H.-H., Horáček, I., Cerny, R. 2008.** Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature* **455**, 795-798.
- Stach, T. 2000.** Ultrastructural characterization of a rostral secretory gland present in larval *Branchiostoma lanceolatum*. *Ann. Sci. Nat.* **21**, 19-25.
- Suda, Y., Kurokawa, D., Takeuchi, M., Kajikawa, E., Kuratani, S., Amemiya, C., Aizawa, S. 2009.** Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev. Biol.* **325**, 282-295.

- Taylor, M. 1913.** The Development of *Symbranchus marmoratus*. *Q. J. Microsc. Sci.* **s2-59**, 1-51.
- Thibaudeau, G., Altig, R. 1999.** Endotrophic Anurans: Development and Evolution. In McDiarmid, W., Altig, R. *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. (Chicago and London: The University of Chicago Press, pp170-188).
- Tos, M. 1970.** Development of mucous glands in the human Eustachian tube. *Acta Otolaryngol.* **70**, 340-350.
- van Evercooren, A., Picard, J.J. 1978.** Surface Changes During Development and Involution of the Cement Gland of *Xenopus laevis*. *Cell Tiss. Res.* **194**, 303-313.
- Veeman, M.T., Newman-Smith, E., El-Nachef, D., Smith, W.C. 2010.** The ascidian mouth opening is derived from the anterior neuropore: Reassessing the mouth/neural tube relationship in chordate evolution. *Dev. Biol.* **344**, 138-149.
- von Dassow, G., Munro, E. 1999.** Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for EvoDevo. *J. Exp. Zool* **285**, 307-32.
- Wagner, G.P. 2007.** The developmental genetics of homology. *Nat. Rev Genet.* **8**, 473-479.
- Wardle, F.C., Sive, H.L. 2003.** What's your position? The *Xenopus* cement gland as a paradigm of regional specification. *Bioessays* **25**, 717-726.
- Wardle, F.C., Wainstock, D.H., Sive, H.L. 2002.** Cement gland-specific activation of the *Xagl* promoter is regulated by co-operation of putative *Ets* and ATF/CREB transcription factors. *Development* **129**, 4387-4397.
- Webb, J.E. 1969.** On the feeding and behaviour of the larva of *Branchiostoma lanceolatum*. *Mar. Biol.* **3**, 58-72.
- Zeiske, E., Kasumyan, A., Bartsch, P., Hansen, A. 2003.** Early development of the olfactory organ in sturgeons of the genus *Acipenser*: a comparative and electron microscopic study. *Anat. Embryol.* **206**, 357-372.
- Zeiske, E., Bartsch, P., Hansen, A. 2009.** Early Ontogeny of the Olfactory Organ in a Basal Actinopterygian Fish: *Polypterus*. *Brain Behav. Evol.* **73**, 259-272.
- Zwach, I. 2009.** *Obojživelníci a plazi České republiky*. (Praha: Grada Publishing).



## 8.1 Nepřímé citace

- Agassiz, A. 1878.** The development of *Lepidosteus*. *Proc. Am. Acad. Arts and Sc. Boston* **13**, 65-76. Citováno podle Eycleshymer & Wilson (1908).
- de Bernardi, F., Fascio, U. 1994.** Possibile omologia tra gli organi adesivi di ascidie e di anfibi. *Ist. Lomb. Rend. Sc. B.* **128**, 441-449. Citováno podle Sive & Bradley (1996).
- Galt, C.P., Fenaux, F. 1990.** Urochordata – Larvacea. In: eds Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. *Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 4, Part B* (Wiley-Interscience Publication, New York: 1990, pp. 471–500). Citováno podle Nishida (2008).
- Grave, C., Woodbridge, H. 1924.** *Botryllus schlosserii* (Pallas): the behaviour and morphology of the free-swimming larva. *J. Morph.* **39**, 207-247. Citováno podle Garstang (1928).
- Lieberkind, I. 1937.** Vergleichende Studien über die Morphologie und Histogenese der larvalen Haftorgane bei den Amphibien. *C. A. Reitzels, Copenhagen*. Citováno podle Crawford & Wake (1998).
- Lindahl, P.E. 1944.** Zur Kenntnis der Entwicklung von Haftorgan und Hypophyse bei *Lepidosteus*. *Acta Zool.* **25**, 97-133. Citováno podle Diedhiou & Bartsch (2009).
- Noble, G.K.** *The Biology of the Amphibia*. (Dover NY: 1931, p23). Citováno podle Crawford & Wake (1998).
- Stokes, M.D. 1997.** Larval locomotion of the lancelet *Branchiostoma floridae*. *J. Exp. Biol.* **200**, 1661-1680. Citováno podle Stach (2000).
- von Kupfer, C. 1893.** Studien zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte des Kopfes. Heft 1. Die Entwicklung des Kopfes von *Acipenser sturio*. *München*. Citováno podle Eycleshymer & Wilson (1908).
- Wirtz, P. 1994.** Does the larva of *Pholidichthys leucotaenia* give a clue to the systematic position of the monotypic fish family Pholidichthyidae? In Schröder, J.H., Bauer, J., Schartl, J. *Trends in Ichthyology - an International Perspective* (Blackwell Science Ltd., Oxford: 1994, pp237-238). Citováno podle Britz et al. (2000).

# Přílohy

## Seznam obrázků

**Obr. 1.** Srovnání pozice, struktury povrchu a rozsahu sekretorické aktivity u adhezivních orgánů studovaných druhů.

**Obr. 2.** *Polypterus senegalus*. Vnější vývoj cementových orgánů.

**Obr. 3.** *Polypterus senegalus*. Detail otevírání cementových orgánů.

**Obr. 4.** *Polypterus senegalus*. Dynamika bazálních membrán epitelů v raných stádiích morfogeneze cementových orgánů, obsah mukopolysacharidů v diferencovaných orgánech a jejich vývoj na histologických řezech.

**Obr. 5.** *Xenopus laevis*. Vnější vývoj cementové žlázy.

**Obr. 6.** *Xenopus laevis*. Vývoj cementové žlázy a dynamika bazální laminy na histologických řezech.

**Obr. 7.** *Misgurnus fossilis*. Vnější vývoj cementového orgánu.

**Obr. 8.** *Misgurnus fossilis*. Vývoj cementového orgánu na histologických řezech.

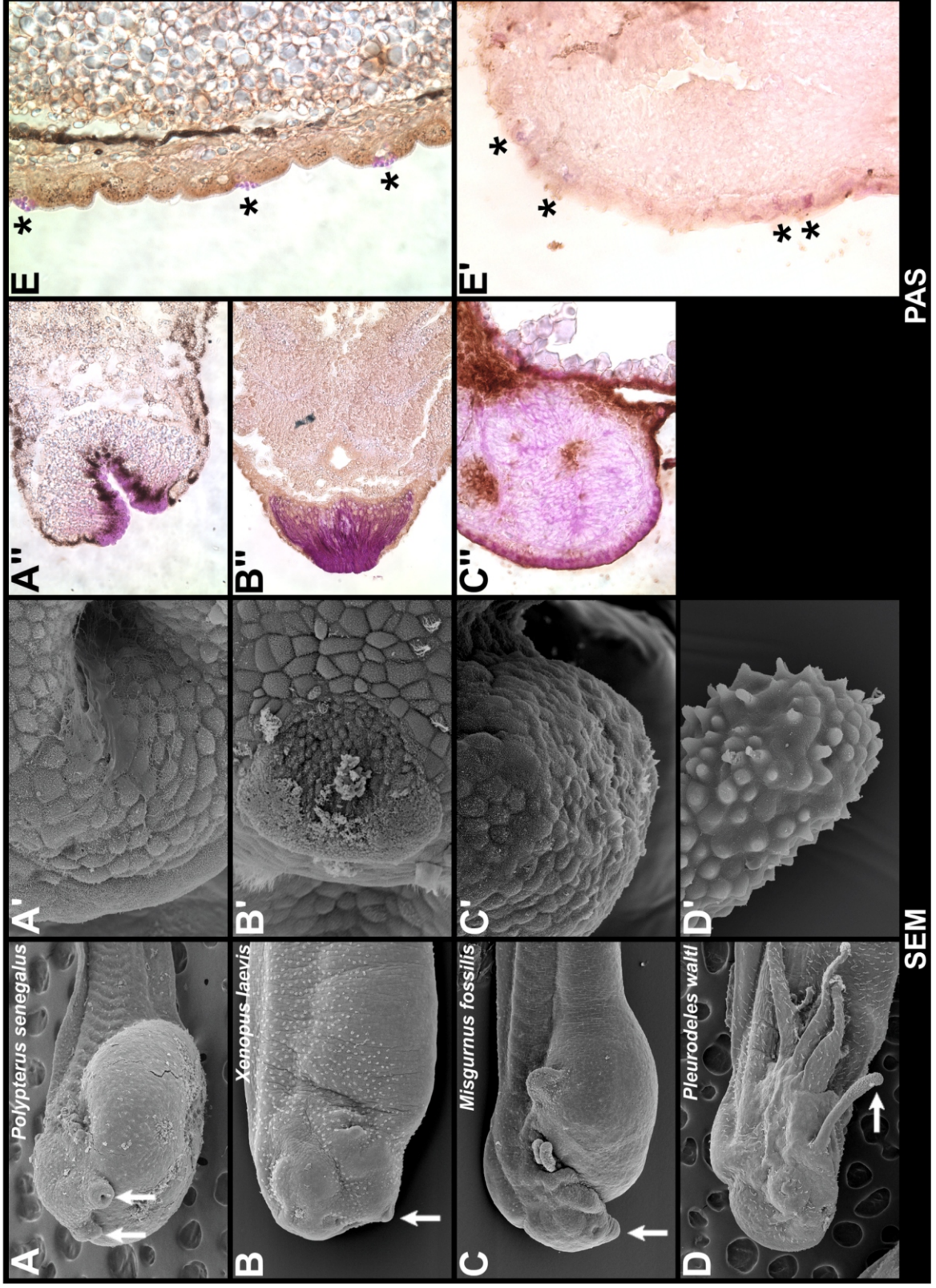
**Obr. 9.** *Pleurodeles waltl*. Vnější vývoj balancerů.

**Obr. 10.** Srovnání tkáňového kontextu vyvíjejících se adhezivních žláz u bichira, drápatky a piskoře.

## Použité zkratky

<b>b</b>	(brain)	mozek
<b>ba</b>	(balancer)	balancer
<b>bb</b>	(barbel)	hmatový voušek
<b>co/cg</b>	(cement organ/gland)	cementový orgán
<b>e</b>	(eye)	oko
<b>eg</b>	(external gills)	vnější žábry
<b>en</b>	(endoderm)	entoderm
<b>h</b>	(hypophysis)	hypofýza
<b>m</b>	(mouth)	ústa
<b>me</b>	(mesoderm)	mesoderm
<b>ms</b>	(mucous secretion)	mukózní sekret
<b>n</b>	(nostril)	nozdra
<b>nt</b>	(notochord)	notochord
<b>ph</b>	(pharynx)	farynx
<b>s</b>	(stomodeum)	stomodeum
<b>sha</b>	(stomodeal-hypophyseal anlage)	základ stomodea a hypofýzy
<b>y</b>	(yolk)	žloutkový váček

**Obr. 1. Srovnání pozice, struktury povrchu a rozsahu sekretorické aktivity u adhezivních orgánů studovaných druhů.** (A-D) Srovnání pozice cementových orgánů u studovaných druhů (šipka označuje cementový orgán). (A'-D') Detail struktury povrchu cementových orgánů. (A') Bichir, anteroventrální pohled. Patrná je vrstva adhezivního sekretu. (B') Drápatka, ventrální pohled. (C') Piskoř, laterální pohled. (D') žebrovník, laterální pohled. (A''-C'') Značení mukopolysacharidů pomocí PAS. (A'') Bichir, ventrální pohled. (B'') Drápatka, ventrální pohled. (C'') Piskoř, laterální pohled. (E, E') PAS pozitivní buňky v části pokožky mimo cementový orgán (hvězdička ukazuje PAS pozitivní buňky). (E) Drápatka, pokožka na ventrální straně těla. (E') Piskoř, pokožka na dorzální straně hlavy.



*Polypterus senegalus*

*Xenopus laevis*

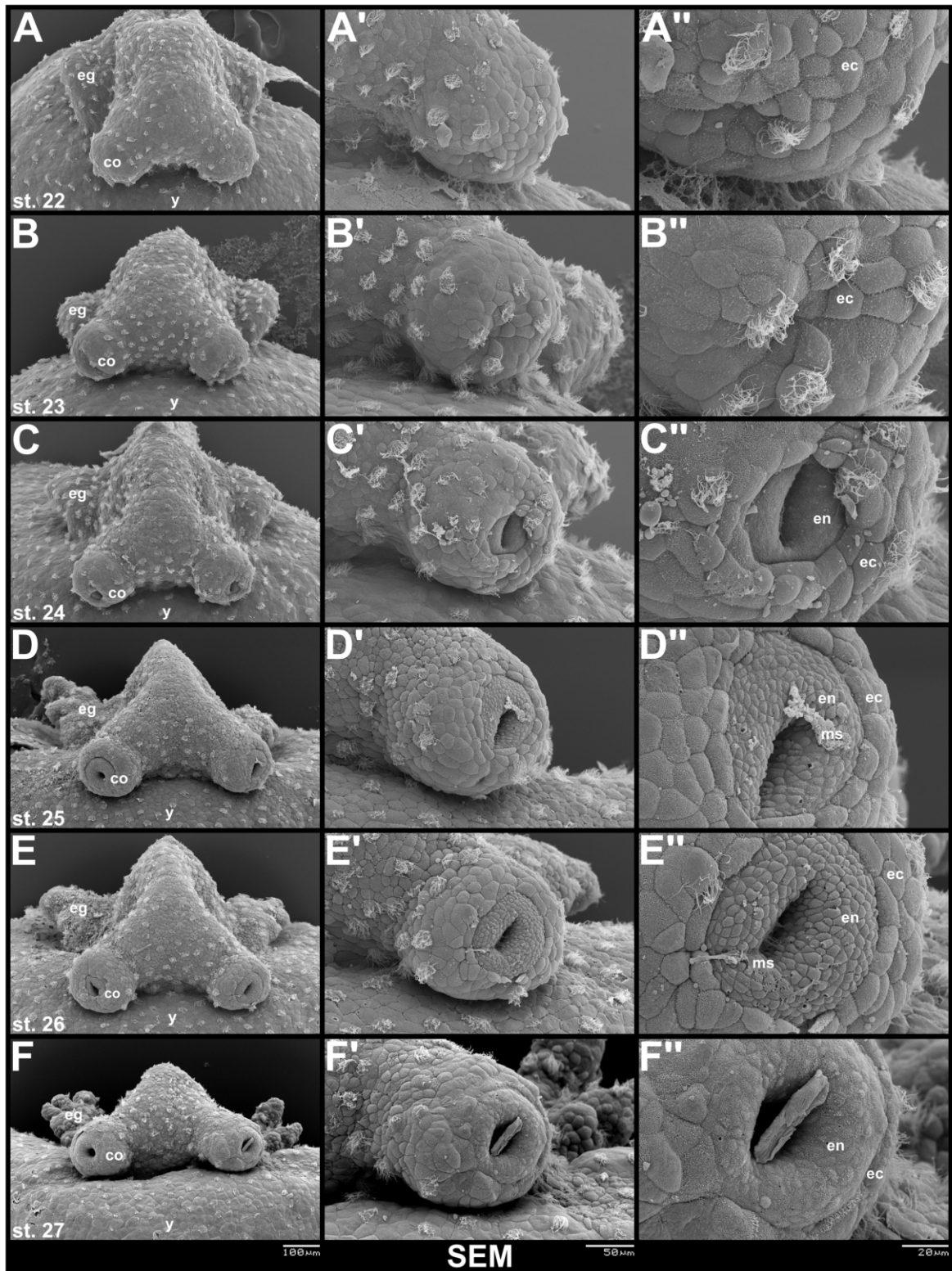
*Misgurnus fossilis*

*Pleurodeles waltl*

PAS

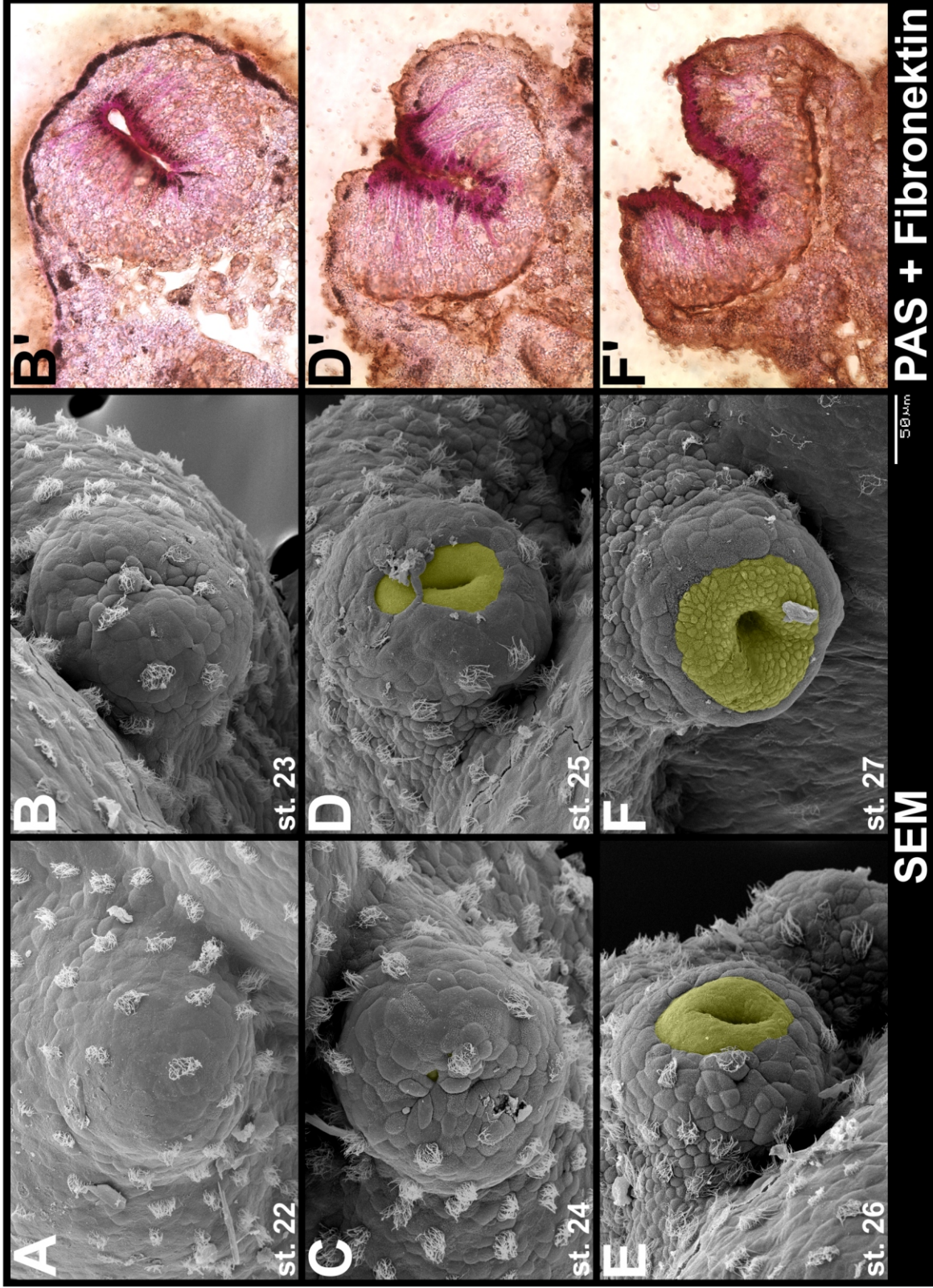
SEM

**Obr. 2. *Polypterus senegalus*. Vnější vývoj cementových orgánů.** (A-F) Pohled na hlavu embrya s ventrolaterálně umístěnými cementovými orgány. (A'-F') Detail pravého cementového orgánu, zobrazující rozestupování buněk pokožky. (A''-F'') Detail otevírání cementového orgánu. Nápadný je značný rozdíl v průměru apikálních povrchů buněk pokožky a buněk cementového orgánu. Od stádia 25 dochází k produkci adhezivního sekretu a zachytávání nečistot okolo ústí orgánu (D'', F'', E'')



**Obr. 3. *Polypterus senegalus*. Detail otevírání cementových orgánů.** (A-F) Detail otevírání cementových orgánů s vyznačením buněk odvozených s entodermu (žlutou barvou). (B', D', F') Průřez cementovými orgány se značením fibronektinu (hnědé linie) a mukopolysacharidů (růžová). Jednotlivé fáze odpovídají stádiím z obr. B, D, F.





A

st. 22

B

st. 23

C

st. 24

D

st. 25

E

st. 26

F

st. 27

B'

D'

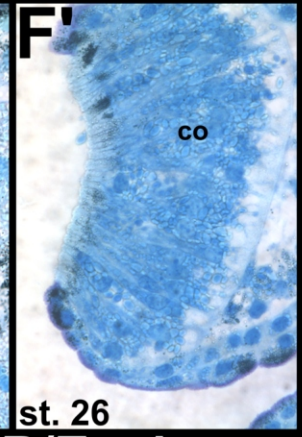
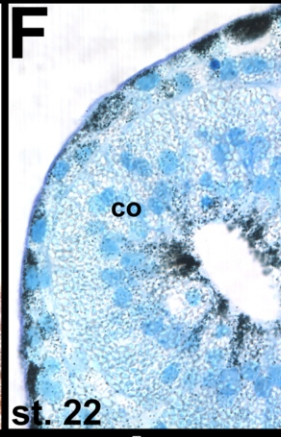
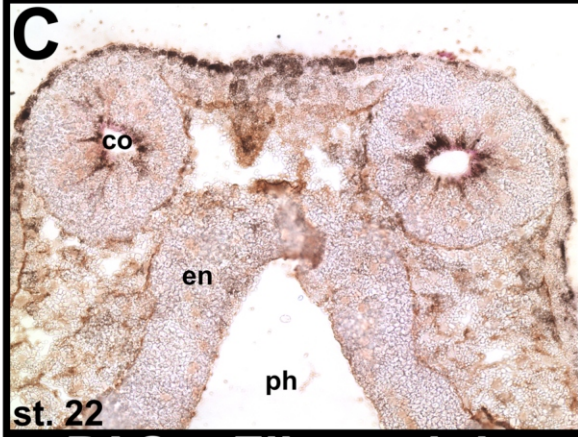
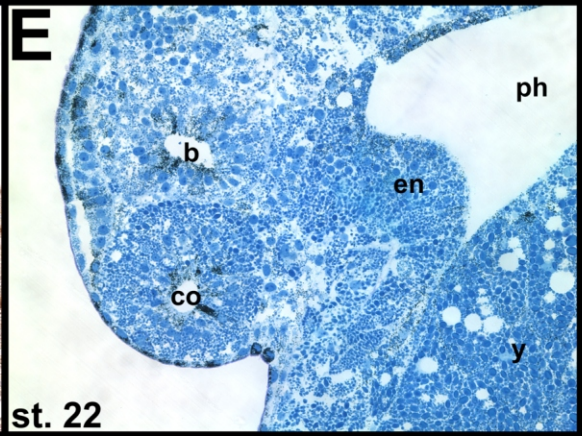
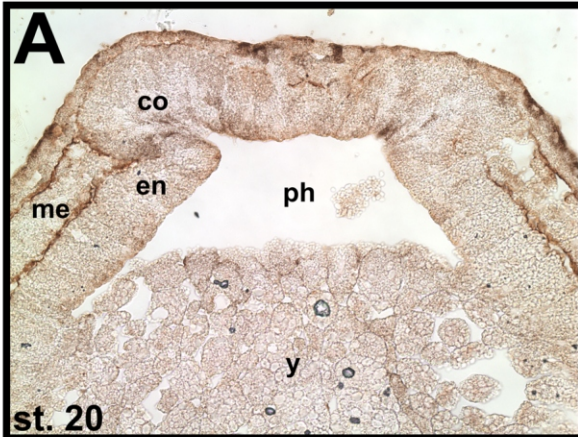
F'

SEM

PAS + Fibronectin

50µm

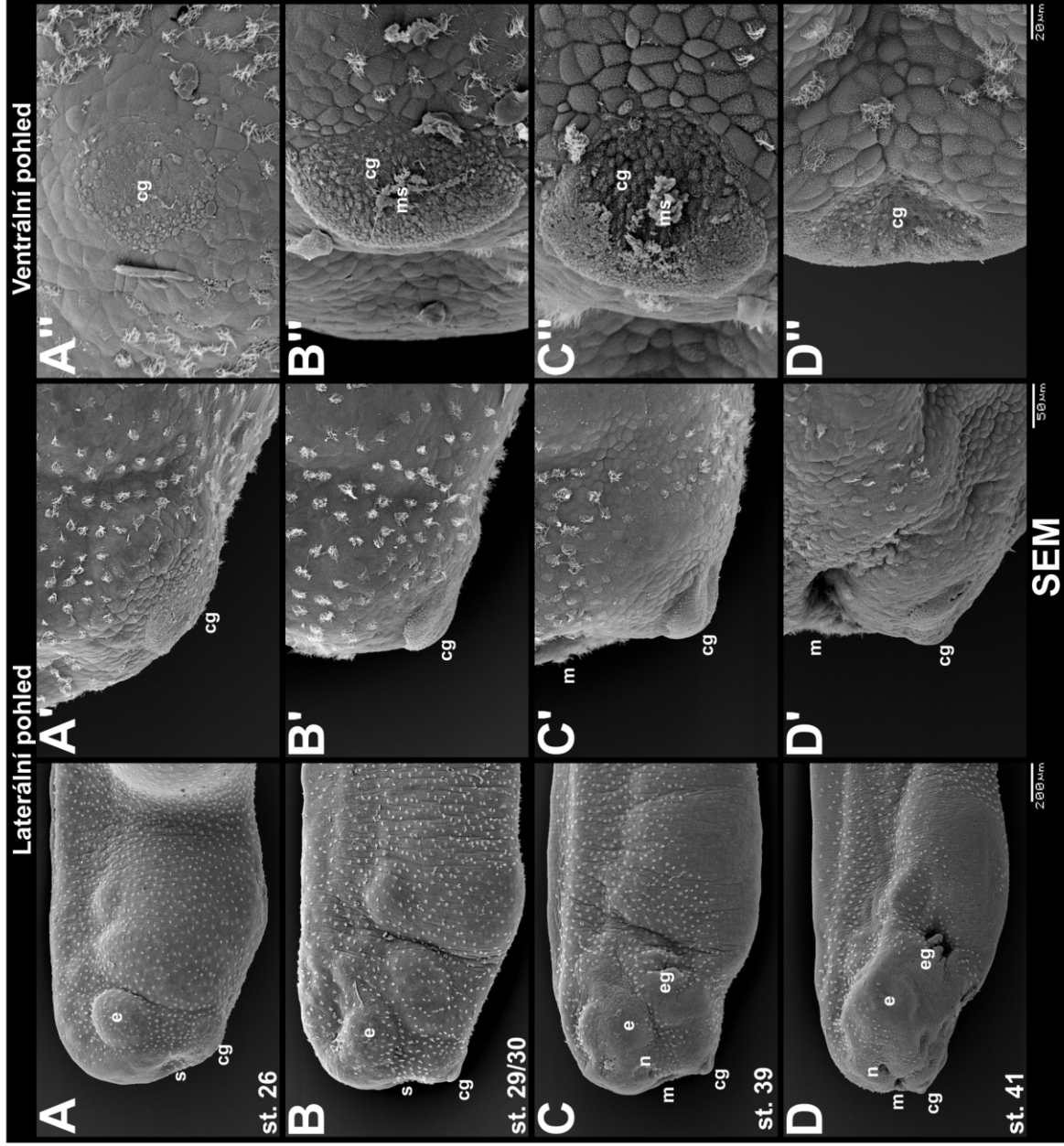
**Obr. 4. *Polypterus senegalus*. Dynamika bazálních membrán epitelů v raných stádiích morfogeneze cementových orgánů, obsah mukopolysacharidů v diferencovaných orgánech a jejich vývoj na histologických řezech.** (A-C) Raná stádia vývoje cementových orgánů na horizontálních řezech značených protilátkou proti fibronektinu souběžně s barvením PAS. Na obrázku C je v centru orgánu patrná pozitivní reakce na PAS. (D) Obsah mukopolysacharidů v sekretujících buňkách vizualizovaný reakcí PAS. (E) Sagitální řez hlavou embrya ve stádiu odškrcování cementových orgánů. (F, F') detail rozhraní pokožky a cementového orgánu před a po jeho otevření do vnějšího prostředí.



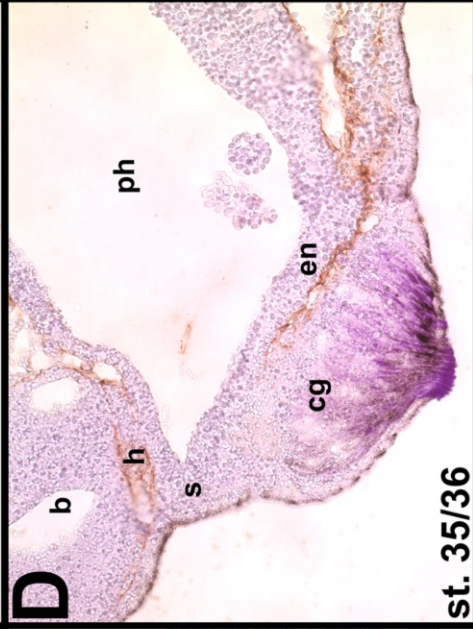
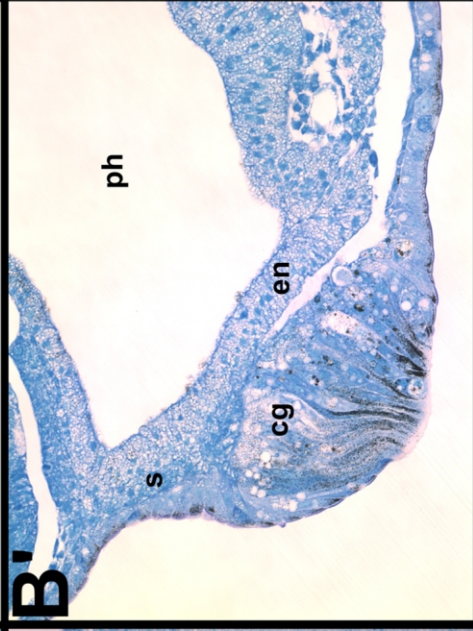
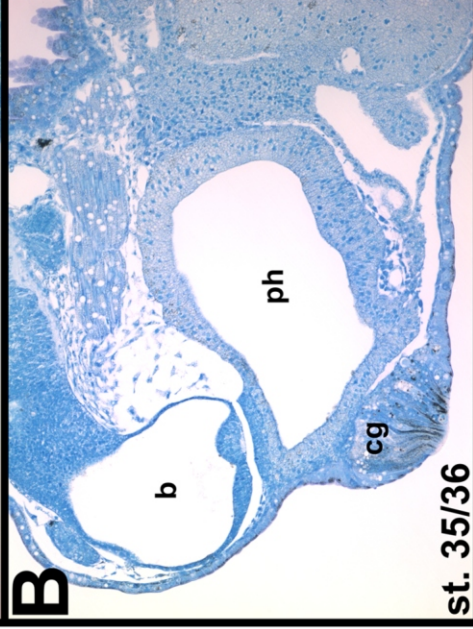
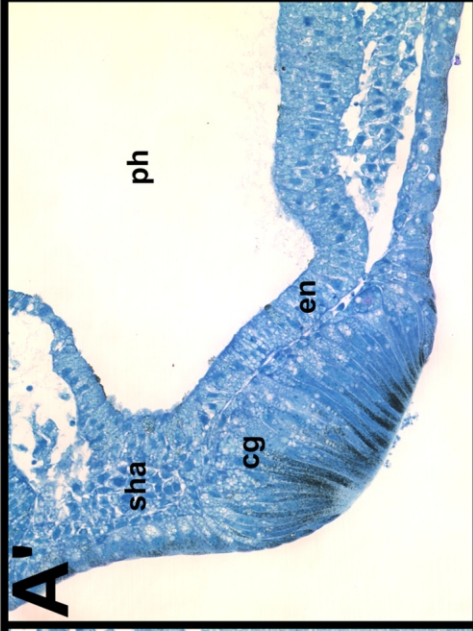
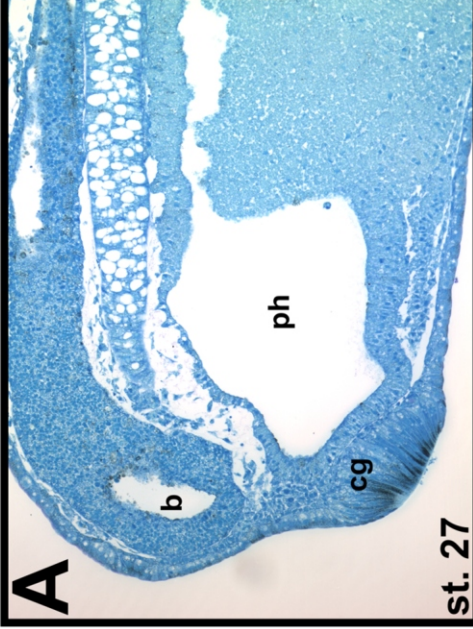
**PAS + Fibronectin**

**Azure B/Eosin**

**Obr. 5. *Xenopus laevis*. Vnější vývoj cementové žlázy.** (A-D) Laterální pohled na cementovou žlázu drápatky v kontextu hlavy v různých stádiích vývoje. (A'-D') Detail cementové žlázy z laterálního pohledu. (A''-D'') Ventrální pohled na žlázu v odpovídajících stádiích.



**Obr. 6. *Xenopus laevis*. Vývoj cementové žlázy a dynamika bazální laminy na histologických řezech.** (A, B) Cementová žláza na sagitálním řezu v tkáňovém kontextu anteriorní části embrya. (A', B') Detail oblasti vývoje cementového orgánu. (C) Vyznačení bazální laminy epitelů (hnědé linie) přibližně před započtím vývoje stomodea. (D) Vyznačení bazální laminy epitelů (hnědé linie) v pozdějším stádiu. Vlivem přestaveb tkání dorzálně od žlázy se bazální lamina v této oblasti rozrušuje.

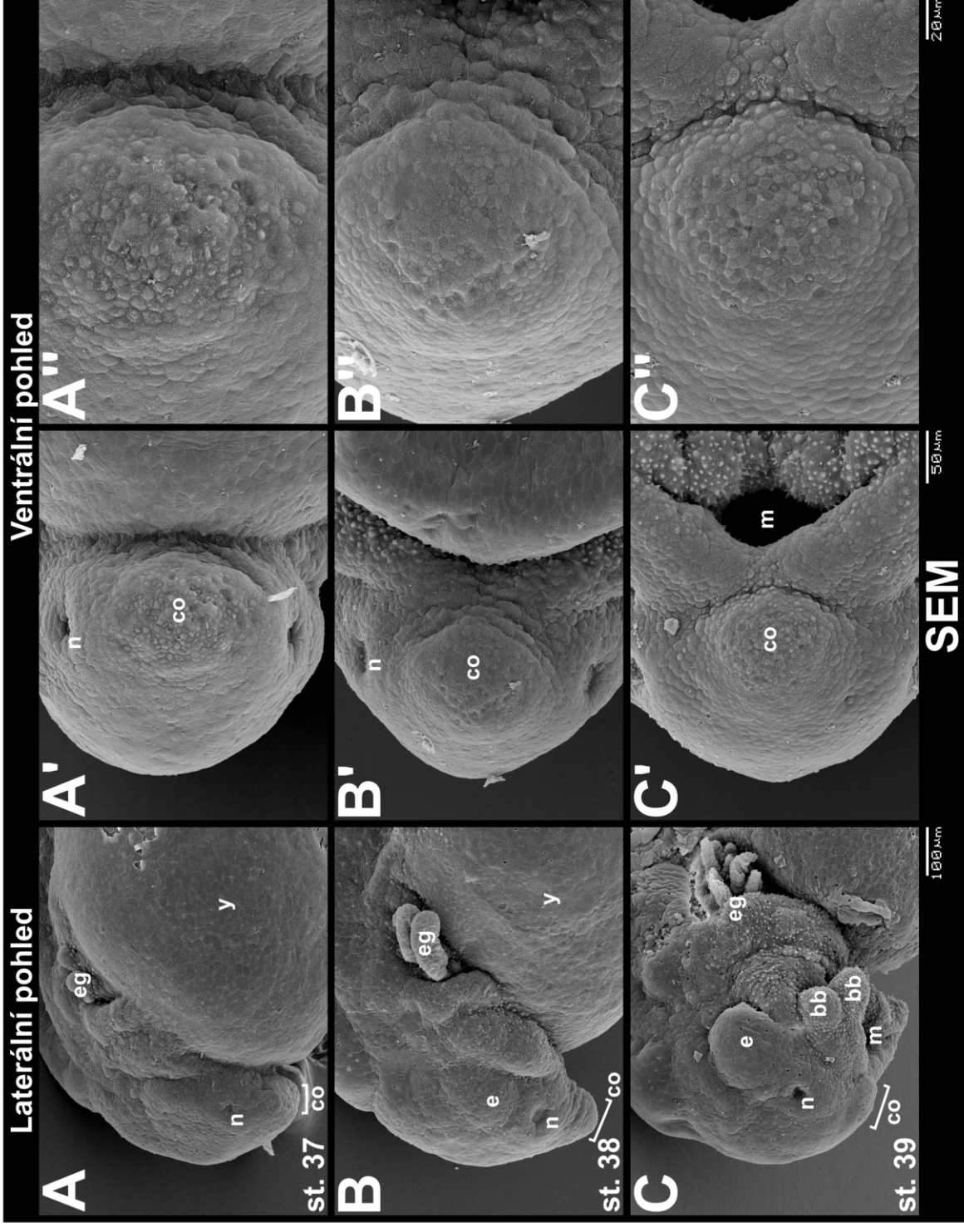


**PAS + Fibronectin**

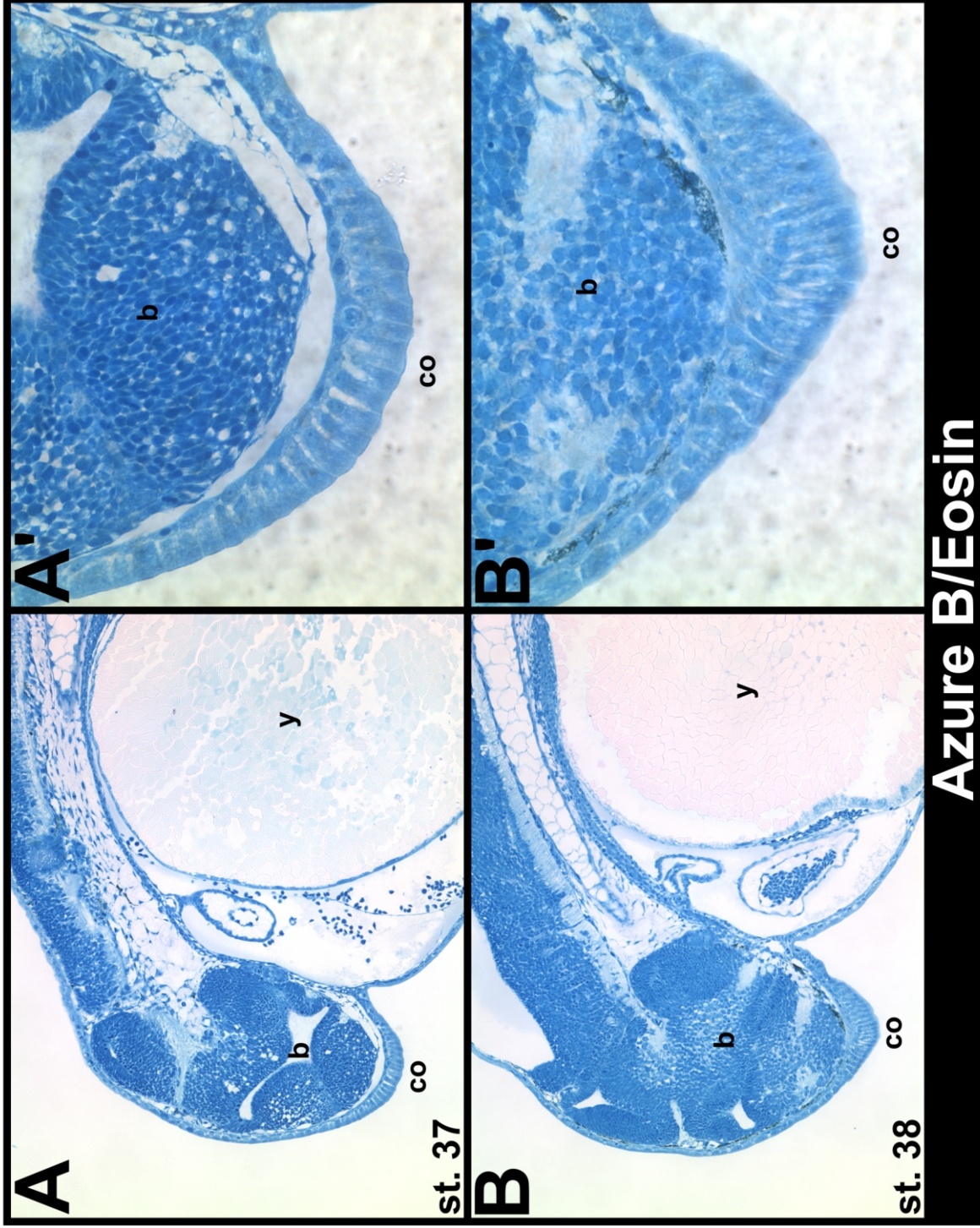
**Azure B/Eosin**

**Obr. 7. *Misgurnus fossilis*. Vnější vývoj cementového orgánu. (A-C) Laterální pohled na cementovou žlázu v kontextu hlavy v různých stádiích vývoje. (A'-C') Detail hlavy embrya z ventrálního pohledu. (A''-C'') Detail povrchu cementového orgánu.**



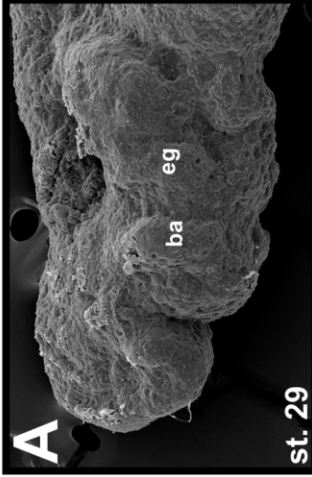


**Obr. 8. *Misgurnus fossilis*. Vývoj cementového orgánu na histologických řezech. (A, B) Cementový orgán na sagitálním řezu v tkáňovém kontextu anteriorní části embrya. (A', B') Detail cementového orgánu. Na obrázku A' jsou zřetelně odlišitelné dvě vrstvy ektodermu.**

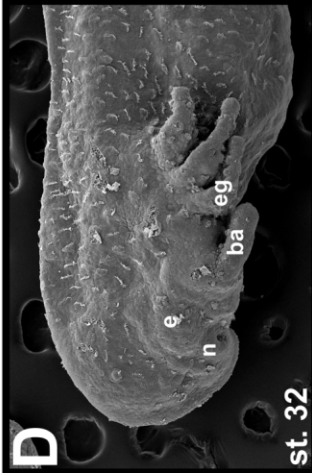
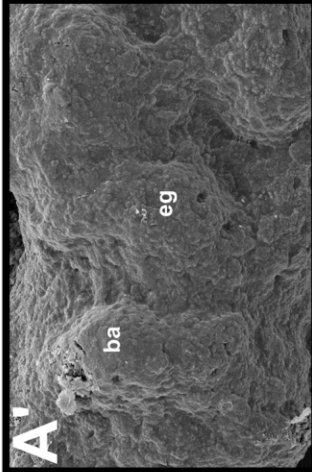


**Azure B/Eosin**

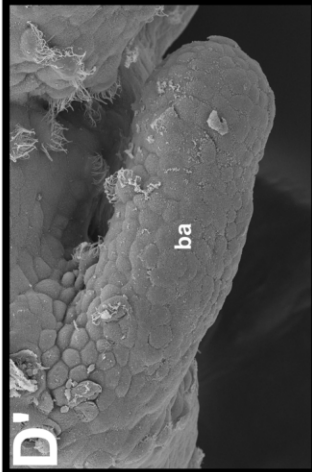
**Obr. 9. *Pleurodeles waltl*. Vnější vývoj balancerů.** (A-F) Relativní pozice vznikajících balancerů na hlavě embrya, laterální pohled. (A'-F') Detailní pohled na vyvíjející se balancery.



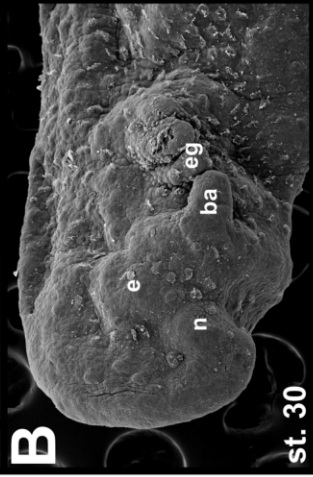
st. 29



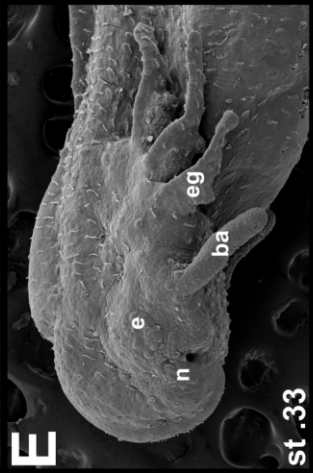
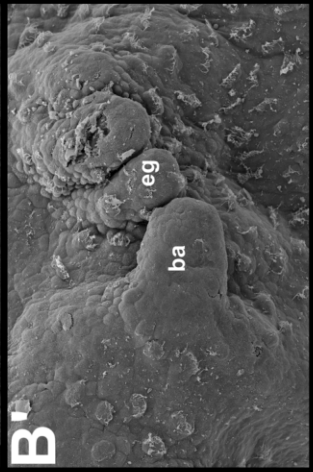
st. 32



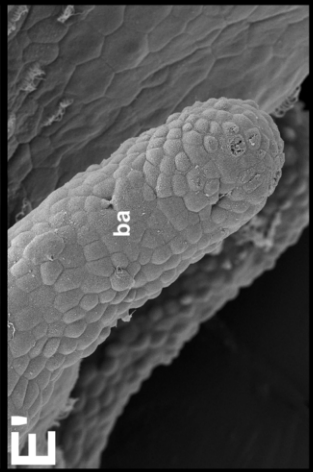
D'



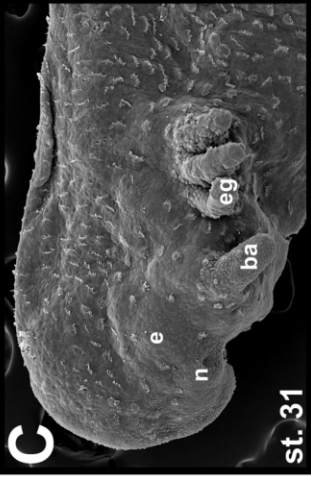
st. 30



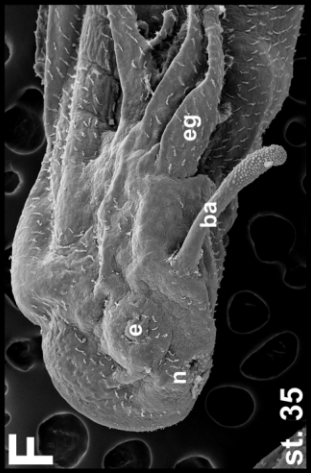
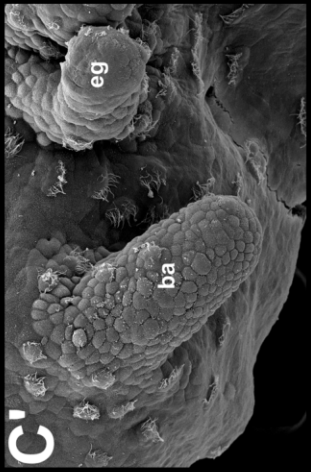
st. 33



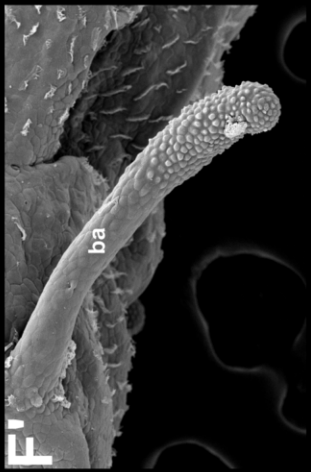
E'



st. 31



st. 35



F'

SEM

**Obr. 10. Srovnání tkáňového kontextu vyvíjejících se adhezivních žláz u bichira, drápatky a piskoře.** (A) Bichir *Polypterus senegalus*, st. 22. (B) Drápatka *Xenopus laevis*, st. 27. (C) Piskoř *Misgurnus fossilis*, st. 37. Barevně odlišen ektoderm (modrá), nervová tkáň (fialová), entoderm (žlutá) a mesoderm (červená).

