

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jitka Peštová

Diferenciace totipotentních zárodečných buněk u larev ptačích schistosom

Differentiation of totipotent germinal cells in larvae of bird schistosomes

Diplomová práce

Školitel prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze

Podpis

Poděkování:

Děkuji především Petru Horákovi za cenné rady, ochotu a trpělivost.

Děkuji Ondřeji Šebestovi za ochotu a čas strávený u konfokálního mikroskopu.

Děkuji kolegům z laboratoře za jejich připomínky a zpříjemnění práce.

Děkuji rodičům a přátelům za podporu během studia.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle diplomové práce	3
3. Literární přehled	4
3.1. Systematické zařazení schistosomy <i>Trichobilharzia regenti</i>	4
3.2. Životní cyklus zástupců čeledi Schistosomatidae	4
3.3. Životní cyklus schistosomy <i>Trichobilharzia regenti</i>	7
3.4. Reprodukce larev motolic v meziphostiteli	8
3.5. Časná embryogeneze sporocyst, redií a cercárií, a vývoj jejich povrchu	12
3.6. Morfologie a vývoj mateřské sporocysty schistosom	14
3.7. Morfologie a vývoj dceřiné sporocysty schistosom	16
3.8. Morfologie a vývoj cercárií schistosom	17
3.8.1. Tegument	17
3.8.2. Svalová soustava	18
3.8.3. Sekreční žlázy	18
3.8.4. Vylučovací soustava	19
3.8.5. Nervová soustava	20
3.8.6. Vývoj cercárie	20
4. Metodika	21
4.1. Získávání materiálu	21
4.1.1. Sběr cercárií	21
4.1.2. Nákaza kachen	21
4.1.3. Nákaza plžů	21
4.2. Použité roztoky	22
4.3. Fixace tkání	22
4.3.1. Fixace pomocí Bouinova roztoku	22
4.3.2. Fixace pomocí paraformaldehydu	23
4.4. Zalévání tkání	23
4.4.1. Zalévání tkání do parafínu	23
4.4.2. Zalévání tkání do JB-4	24
4.4.3. Zalévání tkání do OCT	25
4.5. Histologické metody	26
4.5.1. Barvení řezů	26
4.5.1.1. Barvení hematoxylinem a eosinem	26
4.5.1.2. Barvení Malloryho trichromem	28
4.5.2. Barvení celých červů	29
4.5.2.1. Barvení lithium-karmínem	29
4.5.2.2. Barvení acetokarmínem	29
4.5.2.3. Barvení apomorfinem	30
4.5.2.4. Barvení Malloryho trichromem	30
4.5.2.5. Barvení nilskou modří a neutrální červení	30
4.6. Fluorescenční imunohistochemické a histochemické metody	31
4.6.1. Histochemické metody	31
4.6.1.1. Značení svalové soustavy	32
4.6.1.2. Značení žláz	33
4.6.2. Imunohistochemické metody	34
4.6.2.1. Značení celých červů	34
4.6.2.2. Značení řezů	35
4.7. Elektronová mikroskopie	37

5. Výsledky	38
5.1. Použití histologického barvení pro sledování diferenciacie zárodečných buněk a vývoje larválních stadií <i>Trichobilharzia regenti</i>	38
5.1.1. Vývoj mateřské sporocysty	38
5.1.1.1. Mateřská sporocysta v těle plže 5. den po infekci	38
5.1.1.2. Mateřská sporocysta v těle plže 10. den po infekci	39
5.1.1.3. Mateřská sporocysta v těle plže 15. den po infekci	40
5.1.1.4. Mateřská sporocysta v těle plže 20. den po infekci	41
5.1.2. Vývoj dceřiné sporocysty	42
5.1.2.1. Stadium 1: zárodečná buňka	42
5.1.2.2. Stadium 2: agregát buněk	42
5.1.2.3. Stadium 3: zárodečná koule	42
5.1.2.4. Stadium 4: prodlužující se zárodečná koule	43
5.1.2.5. Stadium 5: Sporocysta s tegumentem	45
5.1.3. Vývoj cercárie	46
5.1.3.1. Stadium 1: zárodečná buňka	46
5.1.3.2. Stadium 2: agregát buněk	47
5.1.3.3. Stadium 3: zárodečná koule	47
5.1.3.4. Stadium 4: prodlužující se zárodečná koule	47
5.1.3.5. Stadium 5: cercárie se základem ocásku	48
5.1.3.6. Stadium 6: cercárie s furkou	49
5.1.3.7. Stadium 7: cercárie s kmenem ocásku	51
5.1.3.8. Stadium 8: Cercárie se žlázami typu I	51
5.1.3.9. Stadium 9: cercárie se žlázami typu II	54
5.1.3.10. Stadium 10: cercárie s hlavovou žlázou	54
5.1.4. Atypická lokalizace sporocystogenních sporocyst	56
5.2. Značení celých červů	57
5.2.1. Použití histologických barviv na celé cercárie	57
5.2.2. Fluorescenční značení	61
5.2.2.1. Značení žláz lektiny	61
5.2.2.2. Vývoj svalové soustavy cercárií	62
5.2.2.3. Vývoj vylučovací soustavy	64
5.2.2.4. Vývoj nervové soustavy	66
5.2.2.5. Značení zárodečných buněk	67
5.3. Elektronová mikroskopie	67
5.3.1. Struktura stěny dceřiné sporocysty	67
5.3.2. Diferenciacie zárodečných buněk, vývoj cercárií a jejich povrchu	70
5.3.3. Žlázy typu I a typu II	74
6. Diskuze	76
6.1. Vývoj mateřské sporocysty	76
6.2. Vývoj dceřiných sporocyst	77
6.3. Vývoj cercárií	80
6.4. Vývoj povrchu cercárie	82
6.5. Žlázy typu I a II	83
6.6. Sporocystogenní sporocysty	84
6.7. Reprodukce a původ zárodečných buněk u larev motolic	85
7. Závěr	88

1. Úvod

Schistosomy jsou kosmopolitní paraziti s veterinárním i medicínským významem. Lidskými schistosomami, jež způsobují vážná onemocnění, je nakaženo přibližně 240 miliónů lidí a dalších 700 miliónů je jimi ohroženo (WHO). Existují však schistosomy, parazitující i u jiných druhů savců nebo u ptáků. K ptačím schistosomám patří například rod *Trichobilharzia*, do kterého se řadí *Trichobilharzia regenti* (Horák a kol., 2002), jež sloužila jako modelový organismus pro tuto práci. Výsledkem infekce ptáků touto schistosomou může být paralýza nohou, poruchy rovnováhy a orientace a rhinorrhágie (Horáka a kol., 1999). Cerkárie rodu *Trichobilharzia*, stejně jako další rody schistosom, způsobují u obratlovců (včetně člověka) zánětlivou kožní reakci, tzv. cercáriovou dermatitidu (Cort, 1928; Chamot a kol., 1998; Kolářová a kol., 1999; Horák a kol., 2002; Farahnak a Esallat, 2003). Mimo to byla schistosomula ptačích motolic nalezena v plicích a dalších orgánech savců. Například při experimentálních infekcích myši neurotropní schistosomou *Trichobilharzia regenti* bylo prokázáno, že tyto motolice mohou v náhodném hostiteli migrovat až do centrální nervové soustavy (Horák a kol., 1999; Hrádková a Horák, 2002), což u myši způsobovalo poškození nervové tkáně (Kouřilová a kol., 2004).

V definitivním hostiteli se dospělé schistosomy sexuálně rozmnožují, což vede k produkci vajíček, z nichž se líhnou miracidia napadající mezihostitele. V mezihostiteli pak dochází k vývoji jednotlivých larválních generací (mateřských sporocyst, dceřiných sporocyst a cercárií), přičemž dceřiné sporocysty a cercárie se vyvíjí z jednotlivých zárodečných buněk.

Existuje však velmi málo informací o diferenciaci zárodečných buněk a o vývoji těchto larválních stadií v mezihostiteli. Pomocí podrobnějších studií zaměřených na zárodečné buňky, jejich diferenciaci a embryogenezi schistosom v mezihostiteli by bylo možné rozpoznat jednotlivá larvální stadia již během jejich vývoje, a rozlišit tak počátek cercáriogeneze či sporocystogeneze a lépe pochopit vývoj a životní cyklus těchto parazitů. Například by bylo možné rozpoznat, zda jsou dceřiné sporocysty ptačích schistosom (stejně jako lidské schistosomy) schopné sporocystogeneze, a jaký vliv na vývoj larev schistosom mají vnější podmínky. Výzkum zárodečných buněk a jejich diferenciaci by mohl také vyřešit některé nejasnosti, jež jsou předmětem diskuzí mezi parazitology zabývajícími se reprodukcí a vývojem motolic. Sporný je například původ primitivního epitelu během vývoje zárodku a způsob reprodukce larválních stadií motolic – zda se

motolice v mezihostiteli rozmnožují ameiotickou partenogenezí či polyembryonií. V neposlední řadě by studium diferenciace totipotentních zárodečných buněk mohlo pomoci objasnit osud těchto buněk během vývoje a původ totipotentních buněk, z nichž vznikají další generace. O původu těchto buněk nejen v rámci kmene Platyhelminthes, ale obecně u živočichů, zůstává řada nezodpovězených otázek.

2. Cíle diplomové práce

- 1) Charakterizovat vývoj jednotlivých larválních stadií schistosomy *Trichobilharzia regenti* v meziphostiteli a pozorovat diferenciaci zárodečných buněk během jejich vývoje pomocí histologických a histochemických metod, a dále pomocí elektronové mikroskopie.
- 2) Sledovat výskyt cercáriogeneze a sporocystogeneze v dceřiných sporocystách schistosomy *T. regenti* a určit, zda se během jejího vývoje v meziphostiteli vyskytuje více generací dceřiných sporocyst.

3. Literární přehled

3.1. Systematické zařazení schistosomy *Trichobilharzia regenti*

Trichobilharzia regenti Horák, Kolářová et Dvořák, 1998 patří do rodu *Trichobilharzia* (Horák a kol., 1998), jenž je společně s rody *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Jilobilharzia*, *Bilharziella*, *Heterobilharzia*, *Schistosomatium*, *Ornithobilharzia*, *Austrobilharzia*, *Bivitellobilharzia*, *Macrobilharzia*, *Anserobilharzia*, *Allobilharzia* a *Schistosoma* řazen do čeledi Schistosomatidae, podtřídy Digenea, třídy Trematoda, kmene Platyhelminthes (Snyder a Loker, 2000; Lockyer a kol., 2003; Kolářová a kol., 2006; Brant a Loker, 2009; Horák a kol., 2014). Rod *Trichobilharzia* zahrnuje přibližně 40 druhů motolic (Blair a Islam, 1983) a z evropských mezi ně patří *T. szidati*, *T. franki*, *T. salmanticensis* a již zmíněná *T. regenti* (Horák a kol. 2002; Rudolfová a kol., 2007; Jouet a kol., 2008; Aldhoun a kol., 2009a; Aldhoun a kol., 2009b). Mezi americké zástupce rodu *Trichobilharzia* jdou řazeny například *T. physellae*, *T. querquedulae*, *T. stagnicola*, *T. franki* a *T. elvae* (Brant a Loker, 2009).

3.2. Životní cyklus zástupců čeledi Schistosomatidae

Pro schistosomy je typický dvouhostitelský životní cyklus, přičemž definitivním hostitelem jsou obratlovci a mezihostitelem plži (Horák a kol., 2014).

V definitivním hostiteli se tyto motolice sexuálně rozmnožují a samice poté produkuje vajíčka, z nichž se líhne první larvální stadium, tzv. **miracidium**. Tato larva se poté aktivně pohybuje ve vodním prostředí a po nalezení mezihostitele penetruje do jeho cefalopedální a plášťové oblasti (např. *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. incognitum*, *T. physellae*, *G. huronensis*) (Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Sinha a Srivastava, 1960; McGeachin, 1979; Jourdane a Mingyi, 1987; Jourdane a Théron, 1987; Soomro a kol., 2005) nebo migruje jeho přirozeným otvorem do těla mezihostitele (např. *S. douthitti*) (Loker, 1978), kde prodělává zásadní tělní přestavbu a transformuje se na **mateřskou sporocystu**.

Uvnitř mateřských sporocyst se nachází velké množství zárodečných buněk, z nichž se vyvíjí další larvální stadium nazývané **dceřiná sporocysta**, jež opouští mateřskou sporocystu a migruje do interlobulárních prostorů hepatopankreatu plže¹.

Dceřiná sporocysta taktéž obsahuje mnoho zárodečných buněk a z každé této buňky se vyvíjí čtvrté larvální stadium, tzv. cercárie. Ta opouští tělo mezihostitele a ve vodním prostředí aktivně vyhledává definitivního hostitele, do něhož penetruje kůží. Během penetrace se transformuje na schistosomulum a migruje do cílové tkáně, kde se dospělá schistosoma pohlavně rozmnožuje (Lampe, 1927; Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Brooks, 1953; Chu a Cutress, 1954; Cort a kol., 1955; Sinha a Srivastava, 1960; Lee, 1962; Kinoti 1971; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Leite a kol., 1982; Jourdan a Mingyi, 1987; Lo a Lee, 1995; Souza a kol., 1995; Soomro a kol., 2005; Akramova a kol., 2010; Akramova a kol., 2011; Schuster a kol., 2013).

Výše popsany životní cyklus odpovídá představě Pearsona (1972), že se u motolic, u nichž nedochází během vývoje v měkkýši k produkci rédií, vyskytují pouze dvě generace sporocyst. Lie (1966) však pozoroval během interakce larev dvou druhů motolic v degenerujících dceřiných sporocystách *S. mansoni* další generaci sporocyst, čímž upozornil na možnost vzniku replikujících se dceřiných sporocyst. Druhá generace těchto larev byla pozorována i v případech kultivace dceřiných sporocyst *Schistosoma mansoni* nebo jejich transplantace z infikovaného plže do neinfikovaného (Chernin, 1966; DiConza a Hansen, 1972; Hansen, 1973; Hansen, 1975). Tito autoři naznačují, že by další generace sporocyst mohla být přirozenou součástí životního cyklu *S. mansoni* a předcházela by tak produkci cercárií.

V dceřiných sporocystách schistosom byly později pozorovány tyto mechanismy sporocystogeneze: **přímá sporocystogeneze**, **sporocystogeneze po cercáriogenezi** a **simultanní sporocystogeneze a cercáriogeneze** (viz obr. 1) (Touassem a Théron, 1986)

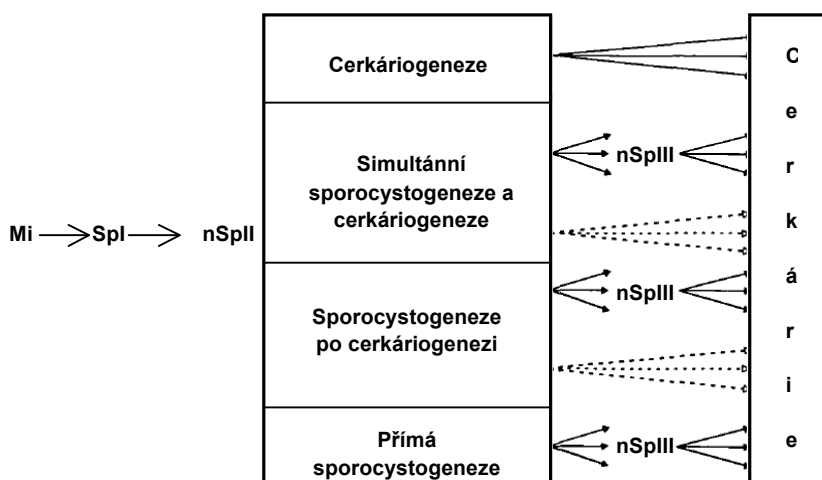
V případě **přímé sporocystogeneze** dceřiné sporocysty produkují pouze sporocysty. Tento typ sporocystogeneze byl pozorován například u schistosom *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. rodhaini* a *S. bovis* (Hansen, 1975; Touassem a Théron, 1986; Kechemir a Théron, 1989; Théron a Touassem, 1989).

Sporocystogeneze po cercáriogenezi se vyznačuje produkcí sporocyst, která následuje po ukončení produkce cercárií. V těchto sporocystogenních sporocystách byly pozorovány degenerující cercárie. Tento typ sporocystogeneze se vyskytuje u motolice

¹ Podle některých autorů dceřiná sporocysta opouští mateřskou pomocí porodního otvoru (Cort a kol., 1944). Jiní autoři naopak tvrdí, že dceřiná sporocysta penetruje stěnou mateřské sporocysty (Lampe, 1927; Théron a Touassem, 1989)

S. haematobium, *S. mansoni* a *S. bovis* (Jourdane a kol., 1980; Touassem a Théron, 1986; Kechemir a Théron, 1989).

V případě **simultánní sporocystogeneze a cercáriogeneze** dochází v dceřině sporocystě zároveň k produkci cercárií a další generace sporocyst. Tento typ sporocystogeneze byl pozorován pouze u *S. bovis*. (Touassem a Théron, 1986).



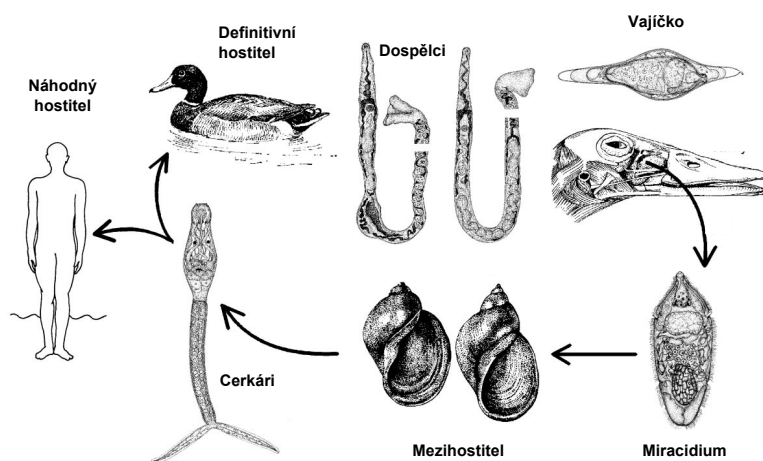
U všech těchto typů sporocystogeneze se sporocystogenní dceřině sporocysty vyskytují v hepatopankreatu plže (Hansen, 1975; Jourdane a kol., 1980; Touassem a Théron, 1985; Kechemir a Théron, 1989;). Výjimkou je *S. rodhaini*, u níž první generace dceřiných sporocyst migruje do orgánů v anteriorní oblasti (plicní vaky a ledviny), kde tvoří obrovské masy. Ve vzácných případech se tyto larvy akumulují v cefalopedální oblasti v blízkosti mateřské sporocysty. U těchto sporocystogenních sporocyst lokalizovaných mimo hepatopankreas je pozastaven vývoj. Jejich vývoj pokračuje až v době, kdy cercáriogenní sporocysty začínají degenerovat. Druhá generace dceřiných sporocyst pak migruje do hepatopankreatu, kde produkuje cercárie (Théron a Touassem, 1989).

Podle těchto pozorování koncem každé periody, kdy jsou produkovány cercárie, dochází k morfogenezi určitých sporocyst, které začnou produkovat další generaci dceřiných sporocyst. Tento proces je významný v obnovení zárodečného materiálu a udržení vysoké produkce cercárií během celého života plže (Kechemir a Théron, 1980; Jourdane a kol., 1980). K vyšší produkci sporocystogenních dceřiných sporocyst by mohlo také docházet při nepříznivých vnějších podmínkách, jako je například nižší teplota nebo nedostatek živin (Hansen, 1975).

Na vývoj jednotlivých larválních stadií v mezihostiteli, a tedy i na životní cyklus (nejen schistosom) mají vliv vnější podmínky, jako například roční období, teplota vody, velikost a stáří plžů a interspecifické vztahy motolic (Cort a kol., 1937; Chu a kol., 1966; Mathies a Cort, 1956; Yang a kol., 2006; Soldánová a Kostadinová, 2011).

3.3. Životní cyklus schistosomy *Trichobilharzia regenti*

Dospělci rodu *Trichobilharzia* jsou lokalizováni buď ve viscerálních nebo nazálních oblastech definitivního hostitele (Horák a kol., 2002). *Trichobilharzia regenti* se společně se sedmi dalšími druhy řadí mezi nazální. Dospělí jedinci (samec a samice) se sexuálně rozmnožují ve sliznici nosní dutiny vrubozobých ptáků (Anseriformes), kde produkují vajíčka. Miracidia se líhnou přímo ve tkáních infikovaných ptáků a opouštějí hostitele při kontaktu s vodou (Horák a kol., 1998). Ta pak infikují mezihostitele, jimiž jsou plži *Radix lagotis*, *R. labiata* a *R. peregra*, v nichž dochází k asexuálnímu rozmnožování (Horák a kol., 1998; Horák a kol., 2002; Huňová a kol., 2012). Z plže se pak uvolňují cercárie, které penetrují do definitivního hostitele, kde se transformují na schistosomula. Tyto larvy migrují podél periferních nervů do míchy, a pak mozkem do nosní dutiny (Horák a kol., 1999; Hrádková a Horák, 2002).



Obr. 2. Životní cyklus schistosomy *Trichobilharzia regenti* (Upraveno dle Horák a Kolářová, 2001).

Cerkárie ptačích schistosom mohou kromě ptáků infikovat i savce, včetně člověka (Horák a kol., 2002). Schistosomulum *T. regenti* při experimentálních infekcích myši migruje, stejně jako v definitivním hostiteli, podél periferních nervů do centrální nervové soustavy. V tomto náhodném hostiteli však nedochází k vývoji v dospělé (Horák a kol., 1999; Hrádková a Horák, 2002; Blažová a Horák, 2005).

3.4. Reprodukce larev motolic v mezihostiteli

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2., jednotlivá larvální stadia motolic se v mezihostiteli vyvíjejí ze zárodečných buněk.

Ve většině sporocyst a rédií jsou zárodečné buňky koncentrovány v **zárodečné masě** (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Zárodečná masa byla původně popsána skupinou autorů (Cort a Olivier, 1941; Cort a Olivier, 1943a; Cort a Olivier, 1943b; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949) jako místo proliferace zárodečných buněk. Podle těchto autorů je zárodečná masa malé, nepravidelně zakulacené těleso, volně plující v tělní dutině mateřských a dceřiných sporocyst. Zárodečná masa obsahuje samostatné zárodečné buňky a několik embryí. Takový shluk zárodečného materiálu obaluje tenká membrána tvořená cytoplazmatickými výběžky buněk sporocysty.

Zárodečná masa byla později popsána jako specializovaný reprodukční orgán larev motolic, skládající se ze zárodečných buněk v různém stadiu dozrávání, kmenových buněk, strukturních neboli podpurných buněk a pyknotických tělísek² (Obr. 3A, 3B). U některých druhů motolic navíc tato struktura obsahuje raná embrya, jež vznikla dělením zralých zárodečných buněk (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014).

Strukturní buňky vytváří tenké výběžky, které prostupují celou zárodečnou masou a zároveň pokrývají i její povrch. Výběžky se navzájem propojují a tvoří tak trojrozměrnou syncytiální síť. V této síti jsou zachyceny ostatní složky zárodečné masy (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Podpurné buňky tak zajišťují integritu celé struktury a dostatek živin pro vyvíjející se zárodky (Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). U motolice *Prosorhynchoides borealis* (Bucephalidae) se tyto buňky výrazně liší od ostatních buněk stěny sporocysty. Těla strukturních buněk se vyskytují, v závislosti na druhu motolice, buď v centrální části zárodečné masy, nebo na její periférii. Velké jádro obsahuje výrazné jadérko a kondenzovaný chromatin, jenž se vyskytuje především podél jaderné membrány a ve shlucích je také roztroušen po celé nukleoplazmě. Cytoplazma obsahuje volné ribozomy, drsné endoplazmatické retikulum, početné mitochondrie, několik Golgiho komplexů, mikrotubuly a velké množství vakuol (Obr. 3C) (Podvyaznaya, 2007).

² Pyknotická tělíška jsou degenerující buňky (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014).

Podvyznaya a Galaktionov (2014) pozorovali u motolice *Himasthla elongata* (Echinostomatidae) dva typy strukturních buněk. Pro typ I je charakteristické nepravidelné laločnaté jádro s denzní nukleoplazmou a jemnou vrstvou kondenzovaného chromatinu podél jaderného obalu. Cytoplazma má obdobnou strukturu jako cytoplazma strukturních buněk motolice *Prosorhynchoides borealis*. Strukturní buňky typu II jsou kompaktnější a tvoří méně výběžků. Jejich jádro obsahuje výraznější shluky chromatinu pod jadernou membránou. V zárodečné mase se však vyskytují i podpůrné buňky s morfologickými znaky částečně připomínajícími typ I i typ II, což svědčí o tom, že by tyto typy mohly být vývojovými stadii stejné buňky (viz obr. 3A, 3B) (Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

Kmenové buňky (označované také jako nediferenciované buňky) jsou buňky schopné proliferace, zajišťující fungování zárodečné masy. Jejich diferenciací vznikají buňky zárodečné a strukturní (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Jsou to malé buňky (průměr 6,2 μm) s vysokým poměrem objemu jádro/cytoplazma. Jejich velké jádro (velikost nad 5 μm) obsahuje výrazné jadérko a velké množství kondenzovaného chromatinu. Kondenzovaný chromatin tvoří nepravidelné shluky, které jsou často spojené. Tyto agregáty se vyskytují centrálně i pod jaderným obalem. Tenkou vrstvou cytoplazmy vyplňuje velké množství volných ribozomů a malé mitochondrie (viz obr. 3D) (Podvyznaya a Galaktionov, 2014).

Zárodečné buňky jsou velmi heterogenní, což je způsobeno jejich postupnou diferenciací ve zralé zárodečné buňky, které dávají následným dělením vzniknout další larvální generaci. Jejich velikost se pohybuje od 6 μm do 10 μm . Během diferenciaci tyto buňky rostou. Zároveň se zvětšuje i jejich jádro a jadérko, zatímco chromatin se postupně rozptyluje (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). Zralá zárodečná buňka obsahuje velké jádro (nad 7,5 μm) a jadérko (nad 2,5 μm) a malé shluky kondenzovaného chromatinu. Cytoplazma obsahuje mnohem větší množství organel než kmenové buňky (pod světelným mikroskopem granulární vzhled), obzvláště mitochondrií, které se akumuluji na jedné straně buňky (viz obr. 3E) (Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). Charakteristickým znakem diferencujících se a zralých zárodečných buněk je přítomnost annulární lamely (výrazný Golgiho komplex) a „nuage“³ (viz obr. 3E, 3F, 3G). „Nuage“ je malý shluk elektrodenzního materiálu připojený k cytoplazmatické straně jaderného obalu nebo volně ležící v cytoplazmě (Klag a kol., 1997; Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov,

³ U ploštěnek je „nuage“ označováno jako chromatoidní tělíčko (Shibata a kol., 1999; Willems a kol., 2000; Pfister a kol., 2008; Solana a Romero, 2009)

2014). Jedná se o strukturu typickou pro zárodečnou linii buněk živočichů. Obsahuje vasa-protein, který udržuje buňky v nediferencovaném stavu (Lasko a Ashburner, 1988; Extavour a Akam, 2003; Raz, 2010). Kromě zárodečných buněk živočichů byl vasa-like protein pozorován v „nuage“ a cytoplasmě neoblastu⁴ ploštěnek a v kmenových buňkách schistosom⁵ (Shibata a kol., 1999; Pfister a kol., 2008; Solana a Romero, 2009; Willems a kol., 2010; Skinner a kol., 2012; Wang a kol., 2013). U některých ploštěnek bylo pozorováno, že během vývoje zárodku „nuage“ v některých buňkách neoblastu zmizelo a zůstalo jen v některých buňkách, jež by pravděpodobně mohly být buňkami zárodečné linie oddělující se již během časně embryogeneze. Ve zbylých buňkách neoblastu byl pak vasa-like protein pozorován pouze volně rozptýlený v cytoplasmě buněk (Pfister a kol., 2008; Willems a kol., 2010).

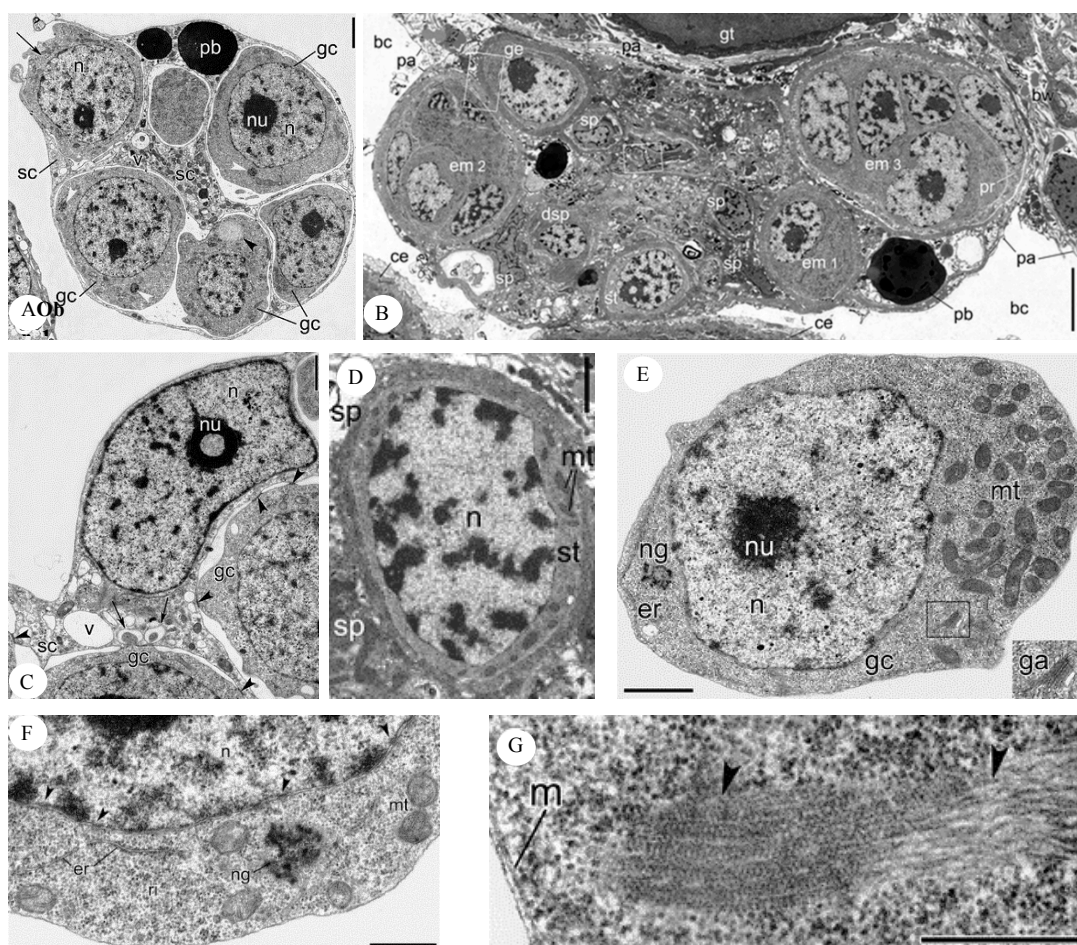
Morfologie zárodečné masy se liší v závislosti na druhu motolice. Tato struktura může být zanořena v parenchymu, může být přichycena ke stěně cytoplazmatickými výběžky buněk mateřského organismu nebo může volně plavat v tělní dutině (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). U některých druhů motolic nebyla zárodečná masa pozorována (Cort a kol., 1948; Van der Woude, 1954; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003).

V minulosti se objevilo několik teorií týkajících se původu zárodečných buněk a mechanismu rozmnožování motolic v mezihostiteli. Například Woodhead (1957) se domníval, že ve sporocystách motolice *Schistosomatium douthitti* dochází k sexuálnímu rozmnožování splynutím samčích a samičích pohlavních buněk.

V dnešní době existují dvě názorové skupiny na rozmnožování v mezihostiteli. První skupina upozorňuje na morfologickou a funkční podobnost zárodečné masy s ovarii dospělých jedinců a srovnatelný vývoj a ultrastrukturu (například přítomnost „nuage“ a anullární lamely) zárodečných buněk a samičích pohlavních buněk. Podle těchto autorů se motolice v mezihostiteli rozmnožují apomiktickou (ameiotickou) partenogenezí. (James a Bowers, 1930; Klag a kol., 1997; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014).

⁴ Pro kmenové buňky ploštěnek se používá označení neoblast (Shibata a kol., 1999; Willems a kol., 2000; Pfister a kol., 2008; Solana a Romero, 2009).

⁵ U schistosom není zmíněna lokalizace vasa-like proteinu v buňce.



Obr. 3. Struktura zárodečné masy. **A** – Zárodečná masa ve sporocystě *Prosorhynchoides borealis*. Měřítko 2 μm **B** – Zárodečná masa v redii *Himasthla elongata*. Měřítko 5 μm . **C** – Podpůrná buňka s elektron-lucentními vakuolami ve sporocystě *P. borealis*. Měřítko 1 μm . **D** – Kmenová buňka. Měřítko 1 μm . **E** – Zárodečná buňka. Měřítko 1 μm . **F** – Detail zárodečné buňky. Měřítko 0,5 μm . **G** – Detail na annulární lamelu (šipky). Měřítko 0,5 μm (Upraveno dle Podvyznaya, 2007; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). bc – tělní dutina redie, ce – vyvíjející se cercárie, dsp – diferencující se podpůrná buňky, em1 –shluk buněk, em2 – embryo s formujícím se primitivním epitelem, em3 – zárodečná koule s nově vytvořeným primitivním epitelem, er – endoplasmatické retikulum, ga – Golgiho aparát, gc – zárodečná buňka, m – mikrotubuly, mt – mitochondrie, n – jádro, ng – „nuage“, nu – jadérko, pa – výběžky parenchymatických buněk redie, pb – pyknotické tělísko, pr – primitivní epitel, ri – volné ribosomy, sc – podpůrná buňka, st – kmenová buňka, v - vakoula

Druhá skupina zastává názor, že se motolice v mezihostiteli rozmnožují polyembryonií, což je vznik více jedinců z jedné zygoty bez toho, že by docházelo k dalšímu vzniku gamet (Cheng a Bier, 1972; Reuter a Kreshchenko, 2004; Skinner a kol., 2012; Wang a kol., 2013).

V průběhu času se k sobě obě hypotézy přibližovaly a rozdíly mezi oběma názorovými skupinami mizely. Tyto dvě skupiny se v dnešní době rozcházejí v názoru, zda je

zárodečná buňka, jež dává vzniknout další generaci v mezihostiteli, homologická se zárodečnými buňkami generací z definitivního hostitele, či nikoliv. Velké nesrovnalosti jsou také v terminologii týkající se zárodečných buněk a vývoje zárodků.

Obě výše zmíněné názorové skupiny se v dnešní době shodují, že zárodečné buňky, jejichž dělením vzniká embryo, mají spojitost s kmenovými buňkami homologickými s kmenovými buňkami dospělých motolic (u larev historicky označovaných jako zárodečné buňky) (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Wang a kol., 2013; Podvyznaya a Galaktionov, 2014). O původu těchto kmenových (zárodečných) buněk však není mnoho informací. Obecně v rámci kmene Platyhelminthes je předmětem diskuzí, zda se linie zárodečných buněk odlišuje od somatické linie již v časně fázi embryogeneze nebo až v pozdních fázích vývoje. Původ kmenových buněk a buněk zárodečných je stále nejasný nejen u motolic, ale i v rámci kmene Platyhelminthes a obecně v rámci živočichů.

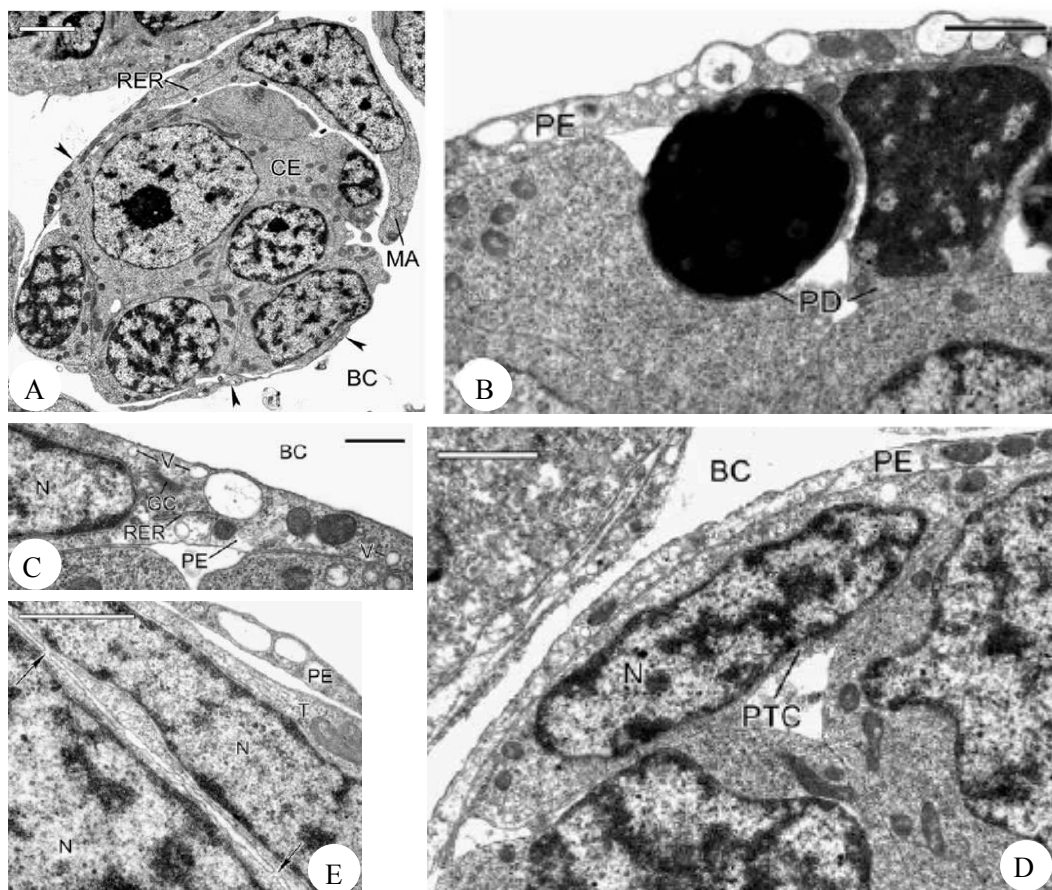
3.5. Časná embryogeneze sporocyst, rédií a cercárií, a vývoj jejich povrchu

Časná embryogeneze a morfogeneze tělní stěny probíhá prakticky identicky u sporocyst, rédií i cercárií (Chen, 1937; Pieper, 1953; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Velké rozdíly se pravděpodobně nevyskytují ani u zástupců různých skupin motolic (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Dělením zárodečné buňky vznikají dvě buňky různé velikosti (Chen, 1937; Pieper, 1953; Van der Woude, 1954; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003), jež dalším dělením dávají vzniknout několikabuněčnému zárodku (shluku buněk) s nepravidelným povrchem. Tato embrya se u většiny motolic vyvíjejí v zárodečné mase nebo jsou alespoň chráněna cytoplazmatickými výběžky mateřského organismu. Buňky tohoto zárodku se liší velikostí i strukturou (Cheng a James, 1960; Cheng a Bier, 1972; Rees a Day, 1976; Meuleman a Holzmann, 1975; Podvyznaya a Galaktionov, 2008; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Zastánci polyembryonie je historicky označují jako buňky somatické a zárodečné, přičemž, jak již bylo výše zmíněno, zárodečné buňky jsou charakteristické svým velkým jádrem, výrazným jadérkem, malým množstvím cytoplazmy a přítomností molekulárních markerů typických pro zárodečnou linii buněk živočichů (Cheng a James, 1960; Cheng a Bier, 1972; Skinner a kol., 2012; Collins a kol., 2013; Wang a kol., 2013). Zastánci apomiktické partenogeneze v tomto embryu dělí buňky na makromery, mezomery a mikromery. Makromera má, stejně jako samostatná zárodečná buňka, silně rozptýlený chromatin, který tvoří pouze tenkou síť, a je typická jasně

rozeznatelným jadérkem. Jádro mezomer má výrazně kondenzovaný chromatin, který tvoří četné kompaktní shluky. Jadérko je stále snadno pozorovatelné. V jádru mikromer je již chromatin těsně nahlouchen a tvoří shluky nepravidelného tvaru. Jadérko ve většině případů nelze rozeznat (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008).

Vzhledem k tomu, že druhá skupina autorů nemá terminologii pro diferencující se buňky v pozdějších fázích vývoje, budu dále pro přehlednost používat termíny zastánců polyembryonie, a to zárodečné a somatické buňky.

Ve stadiu, kdy embryo obsahuje přibližně 12–14 buněk, se několik povrchových zárodečných buněk zplošťuje a vytváří cytoplazmatické výběžky, které obalují zbytek zárodku. O něco starší embryo je již pokryto tenkým syncytiálním epitelem s několika jádry, tzv. primitivním epitelem (viz obr. 4A, 4B, 4C). Jakmile je primitivní epitel zformován, zárodek získává typický kulatý tvar. Toto vývojové stadium je označováno jako **zárodečná koule** (Cheng a James, 1960; Cheng a Bier, 1972; Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). Primitivní epitel obsahuje velké množství vakuol různé velikosti, některé elektron-lucentní, jiné obsahující elektron-denzní materiál. Mezi tímto obalem a periferními buňkami zárodku se vyskytují četné cytoplasmatické můstky (Rees a Day, 1976; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). Ve chvíli, kdy je primitivní epitel utvořen, dochází k intenzivní proliferaci embryonálních zárodečných buněk zajišťující rychlý růst. Zároveň dochází k degeneraci některých buněk, jejímž výsledkem je přítomnost tzv. pyknotických tělísek v zárodku. Se vzrůstajícím počtem buněk se pak vyvíjející larva prodlužuje (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). Později se pod primitivním epitelem zárodečných koulí objevují malé buňky se zploštělým jádrem, které expandují, navzájem se propojují a vytváří tenký tegument (viz obr. 4D, 4E). U prodlužující se zárodečné koule se pak primitivní epitel začíná postupně odlučovat. U cercárií s jasně rozlišitelným základem ocásku pak primitivní epitel zcela mizí. U tohoto stadia jsou ještě v tegumentu pozorovatelná degenerující jádra tegumentu a již je zřetelná bazální lamina a vlákna subtegumentální svaloviny. U stadia s prodlužujícím se ocáskem se objevují sekreční subtegumentální cytony v periferním parenchymu, které se později cytoplazmatickými můstky propojují s vnější cytoplazmatickou vrstvou tegumentu (Bils a Martin, 1966; Meuleman a Holzmann, 1975; Rees a Day, 1976; Meuleman a kol., 1980; Göbbel a Pan, 1985; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008).



Obr. 4. Vývoj povrchu cercárie (Převzato z Podvyaznaya a Galaktionov, 2008). **A** – Formování primitivního epitelu. Měřítka 2 μm . **B** – Degenerace embryonálních buněk pod primitivním epitelem. Měřítka 1 μm . **C** – Detail primitivního epitelu. Měřítka 0,5 μm . **D** – Primordiální tegumentální buňka. Měřítka 1 μm . **E** – Detail vrstvy vyvíjejícího se tegumentu a vrstvy primitivního epitelu na povrchu zárodku. Měřítka 1 μm . BC – tělní dutina, CE – embryo cercárie, GC – Golgiho komplex, MA – makromera, N – jádro, PD- pyknotická degenerace, PE – primitivní epitel, PTC – primordiální tegumentální buňka, RER – drsné endoplazmatické retikulum, T – tegument, V - vakuoly

U některých druhů motolic (například u *Schistosoma mansoni* a *Schistosoma japonicum*) byl pozorován vznik primitivního epitelu z tegumentálních buněk mateřského organismu (Meuleman a Holzmann, 1975; Meuleman a kol., 1980; Göbbel a Pan, 1985).

3.6. Morfologie a vývoj mateřské sporocysty schistosom

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2., miracidia penetrují do těla plže a migrují do cílových tkání, kde prochází zásadními morfologickými změnami vedoucími k přeměně na mateřskou sporocystu. (Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Sinha a Srivastava, 1960; Loker, 1978; Meuleman a kol., 1978; McGeachin, 1979; Loker 1979; Jourdan a Mingyi, 1987; Jourdan a Théron, 1987; Pan, 1996; Soomro a kol., 2005).

Ve volně organizovaných tkáních a dutinách (sinusy, ledviny a plicní vaky) pak dochází k vývoji těchto larev (Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Sinha a Srivastava, 1960;

Loker, 1978; McGeachin, 1979; Jourdane a Mingyi, 1987; Lo a Lee, 1995; Soomro a kol., 2005).

Kinoti (1971) pozoroval u motolice *Schistosoma mattheei*, že u mateřských sporocyst, které nepronikly do volného prostoru v plži a zůstaly v tkáních mimo tělní dutiny, se vývoj zastavil a sporocysty degenerovaly.

U motolice *Schistosoma japonicum* byly pozorovány vyvíjející se mateřské sporocysty téměř ve všech volně organizovaných tkáních mezihostitele, včetně hepatopankreatu. Jednalo se však o infekce, kdy bylo dvacet plžů vystaveno vysoké dávce miracidíí. Rozšíření obvyklého habitatu mateřských sporocyst by však mohlo snižovat vnitrodruhovou kompetici (Jourdane a Mingyi, 1987). Olivier a Mao (1949) pozorovali během experimentálních infekcí plže *Australorbis glabratus* motolicí *Schistosoma mansoni* pouze jeden případ výskytu mateřské sporocysty v hepatopankreatu. Tato lokalizace mateřských sporocyst je u schistosom vzácná.

Mateřskou sporocystu lze popsat jako vak červovitého tvaru naplněný zárodečným materiálem. Zpočátku obsahuje pouze samostatné těsně nahloučené zárodečné buňky, později embrya dceřiných sporocyst v různých fázích vývoje. Pro mladou mateřskou sporocystu je typická velmi tenká tělní stěna. Postupně se však její stěna výrazně ztlušťuje. Během svého vývoje se tato larva prodlužuje a rozšiřuje, čímž se zárodečný materiál rozestupuje a vznikají mezi jednotlivými zárodky volné prostory. S prodlužováním se objevují v některých oblastech sporocysty příčné konstriktce. (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Sinha a Srivastava, 1960; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1978; Jourdane a Mingyi, 1987).

Tělní stěna *S. mansoni* obsahuje tegument pokrytý glykokalyxem, bazální laminu a svalovinu. Tegument je tvořen vnější syncytiální vrstvou, která je spojena cytoplasmatickými výběžky (cytoplasmatické můstky) s těly buněk (cytony) umístěnými směrem do nitra sporocysty. Tyto subtegumentální buňky jsou typické velkými jádry a jadérky a jejich cytoplazma je zaplněna drsným endoplasmatickým retikulem. Cytoplasmatické můstky prochází bazální laminou a svalovinou tělní stěny. Povrch vnější vrstvy tegumentu se zvětšuje vývojem mikrovilů. Plně vyvinuté mikrovily jsou bohatě rozvětvené. Pravidelné vrstvy okružní a podélné svaloviny mizí. Zbytky svaloviny jsou rozptýleny podél vnitřní strany syncytiální vrstvy tegumentu a jsou tvořeny separovanými vlákny, jež se během vývoje sporocysty dále rozestupují. Svalová vlákna nemají jasnou orientaci a vytváří síťovitou strukturu (Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1979;

Meuleman a kol, 1980; Pan, 1996). Dle studie Bulantové a kol. (2011) na *T. regenti* se svalovina této larvy skládá z okružní a podélné svaloviny se separovanými svalovými vlákny, která se od sebe postupně vzdalují a vrstva tak získává síťovitý vzhled.

Obecně u schistosom byly pozorovány cytoplazmatické výběžky subtegumentálních buněk expandující různými směry podél vnitřní strany tělní stěny a do tělní dutiny sporocysty, kde tvoří síť ukotvující samostatné zárodečné buňky a embrya, nebo skupiny těsně přiléhajících buněk a zárodků (označované některými autory z 1. poloviny 20. století jako zárodečné masy) (Cort a Olivier, 1943, Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1954; Meuleman a kol., 1980; Coustau a kol., 1997).

3.7. Morfologie a vývoj dceřiné sporocysty schistosom

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.5., zárodečné buňky svým dělením vytváří shluk buněk. Kolem tohoto shluku buněk se objevuje primitivní epitel, čímž vzniká zárodečná koule. Intenzivní proliferací dochází k prodlužování zárodečné koule. Postupně se zvyšuje množství zárodečných buněk a na povrchu se vytváří tegument a subtegumentální svalovina. Dceřiná sporocysta připravená opustit mateřský organismus je podlouhlého červovitého tvaru a její tělní dutina je naplněná velkým množstvím samostatných zárodečných buněk (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1978; Meuleman a kol., 1980; Jourdane a Mingyi, 1987).⁶

Dceřiné sporocysty *S. mansoni* a *S. japonicum* v této fázi vývoje mají podobnou stavbu tělní stěny jako sporocysta mateřská. Je tvořena vnější vrstvou tegumentu (s mikrovily), subtegumentálními buňkami, bazální laminou a dvěma vrstvami svaloviny, jež ale nejsou zřetelně uspořádané do okružní a podélné svaloviny a mají spíše síťovitou strukturu (Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1980; Göbel a Pan, 1985). Stejně jako u mateřských sporocyst zde byly pozorovány cytoplazmatické výběžky subtegumentálních buněk ukotvujících zárodečné buňky a později vyvíjející se embrya. (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Meuleman a Holzman, 1975; Göbel a Pan, 1985). Tegument dceřiných sporocyst je, na rozdíl od mateřských sporocyst, charakteristický přítomností dozadu směřujících trnů, které jsou velmi výrazné obzvláště na předním konci (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Lee, 1962; Loker, 1978;

⁶ U motolice *Schistosomatium douthitti* byly pozorovány v některých dceřiných sporocystách, jež byly lokalizovány v dutině mateřské sporocysty, i již vyvíjející se zárodky ve formě shluků buněk (Cort a kol., 1944).

Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1980; Leite a kol., 1982; Jourdane a Théron, 1987). Tyto dceřiné sporocysty pak migrují do hepatopankreatu, kde pokračuje jejich vývoj. Dceřiné sporocysty se prodlužují a rozšiřují, čímž se opět vytváří v tělní dutině volné prostory. Záradečné buňky a vyvíjející se embrya cercárií se tak rozestupují. Tělní stěna postupně zesiluje a svalovina ustupuje. I u této sporocysty se vyskytují příčné konstriktory (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Lee, 1962; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Göbel a Pan, 1985).

3.8. Morfologie a vývoj cercárií schistosom

Cercárie motolice *Trichobilharzia regenti* jsou, stejně jako zbytek cercárií schistosom, ocelátními furkocercáriemi. Anteriorní část těla vyplňuje mohutný hlavový orgán. Acetabulum leží těsně za středem těla, přičemž v poloviční vzdálenosti mezi acetabulem a hlavovým orgánem je lokalizován jeden pár očních skvrn. Střevo s bifurkací a dvěma slepými větvemi začíná za začátkem těla v hlavovém orgánu a končí před cirkumacetabulárními žlázami. Kolem acetabula se vyskytují dva páry cirkumacetabulárních žláz a posteriorní část těla vyplňují tři páry postacetabulárních žláz. (Horák a kol., 1998).

3.8.1. Tegument

Struktura tegumentu byla u schistosom detailně popsána především u *Schistosoma mansoni* a *S. japonicum*. Tegument se skládá z vnější syncytiální vrstvy pokryté glykokalyxem. Tato syncytiální vrstva je bezjaderná a je spojena prostřednictvím cytoplazmatických můstků s těly buněk uložených hlouběji v parenchymu. Tyto buňky jsou také označovány jako buňky subtegumentální a obsahují granula různé velikosti, tvaru a elektrondenzity. V rámci jedné cercárie se vyskytuje více typů subtegumentálních buněk. Pod vnější vrstvou tegumentu se vyskytuje bazální lamina oddělující vnější vrstvu tegumentu od subtegumentální svaloviny. Teprve pod touto svalovinou se nacházejí těla subtegumentálních buněk. V tegumentu se vyskytují posteriorně orientované trny (Inatomi a kol., 1970; Dorsey a kol., 2002). U schistosomy *Trichobilharzia regenti* jsou tyto trny stejně dlouhé po celé délce těla, včetně ocásku (Horák a kol., 1998).

3.8.2. Svalová soustava

Subtegumentální svalovina schistosom je tvořena vnější okružní a vnitřní podélnou svalovinou. V první třetině těla je pod podélnou svalovinou lokalizována šikmá svalovina. (Bulantová a kol., 2011; Collins a kol., 2011; Tolstenkov a kol., 2012). Svalovina ocásku *T. regenti* obsahuje vnější okružní svalovinu kmene ocásku, jeden pár vláken dorzální, jeden pár ventrální podélné svaloviny a čtyři pásy (dva levé a dva pravé) příčně-pruhované svaloviny. Okružní svalovina furky je mnohem řidší než v kmeni ocásku. Svalovina hlavového orgánu *T. regenti* je složena z vnější a vnitřní vrstvy podélné svaloviny přichycené k vnější a vnitřní straně bazální laminy konusu. Tato lamina odděluje celý konus od zbytku těla a napojuje se na bazální laminu tělní stěny. Hlavovým orgánem procházejí svalovinou zpevněné výběžky penetračních žláz a trávicí soustava. Z šikmé svaloviny cercárie vede radiální svalovina do oblasti vnitřních orgánů (Bulantová a kol., 2011).

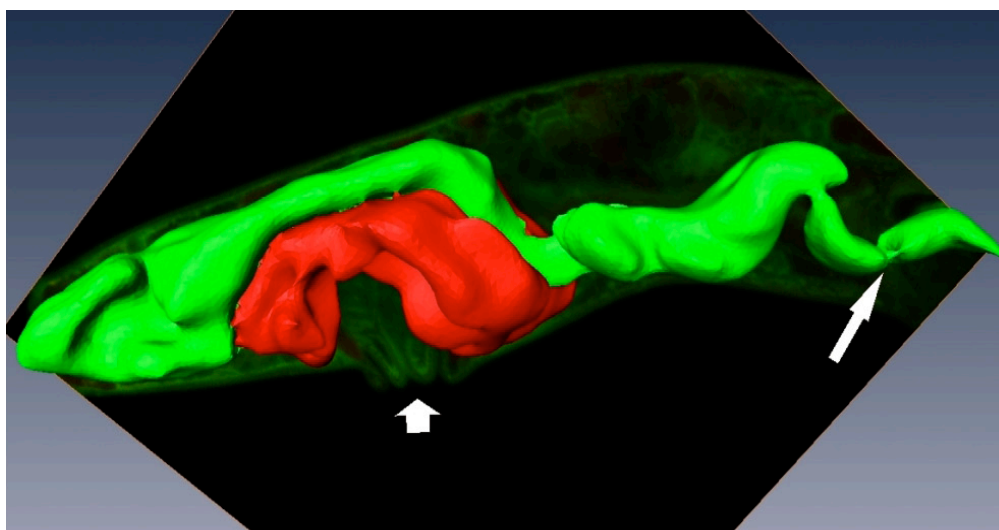
3.8.3. Sekreční žlázy

U schistosomy *T. regenti* byly doposud pozorovány tři typy jednobuněčných sekrečních žláz: cirkumacetabulární penetrační žlázy, postacetabulární penetrační žlázy a hlavová žláza. Každý tento typ žlázy obsahuje odlišná granula.

Posteriorně od acetabula jsou lokalizovány tři páry **postacetabulárních žláz**. Jednotlivé buňky se částečně překrývají tak, že anteriorní část zadní buňky překrývá posteriorní část přední buňky. Na anterodorsální části těchto buněk je cytoplazmatický výběžek tvořící vývod penetrační žlázy. Na každé straně cercárie se tak vytváří svazek triplet vývodů postacetabulárních žláz.

Posteriorní pár **cirkumacetabulárních žláz** je lokalizován za acetabulem a anteriorní pár před acetabulem. Na dorzální straně jsou tyto buňky překryty vývody postacetabulárních žláz. Na každé straně cercárie se k tripletu vývodů postacetabulárních žláz připojuje pár vývodů cirkumacetabulárních žláz. Vytváří se tak dva separované svazky, přičemž každý obsahuje triplet vývodů postacetabulárních žláz a dva vývody cirkumacetabulárních žláz. Zde se svazky stáčí ventrálně a až k jejich výstupu z těla cercárie (na anteriorním konci) se vyskytují pouze ve ventrální až mediální oblasti (viz obr. 5).

Hlavová žláza vyplňuje hlavový orgán a svými četnými výběžky obklopuje vývody penetračních žláz a jádra svalových buněk tvořících hlavový orgán (Ligasová a kol., 2011).



Obr. 5. Trojrozměrný model penetračních žláz (Převzato z Ligasová a kol., 2011). Postacetabulární žlázy zeleně, cirkumacetabulární žlázy červeně, široká šipka označuje acetabulum, úzká šipka zúžení vývodů v oblasti hlavového orgánu.

U motolice *Schistosoma mansoni* byl kromě těchto tří typů popsán i jeden pár drobných jednobuněčných žláz nazvaných **únikové žlázy**. Jejich těla jsou umístěna společně na jedné straně těla za svalovinou ústní přísavky. Vývody těchto žláz se připojují ke svazku vývodů penetračních žláz a společně ústí na anteriorní straně těla cercárie. Během migrace z hostitele se únikové žlázy vyprazdňují. Ve volně plovoucích cercáriích jsou jejich jedinými výraznými pozůstatky vývody v ústní přísavce (Dorsey, 1974). Podobné žlázy byly pozorovány i u dalších druhů schistosom (Talbot, 1936; Leigh, 1953; Abdul-Salam a Sreelatha, 2004).

U schistosom *Trichobilharzia szidati* a *Austrobilharzia* sp. byl pozorován další typ žláz. Tyto četné jednobuněčné žlázy tvoří dvě laterální větve a jejich vývody směřují k hlavovému orgánu (Abdul-Salam a Sreelatha, 2004; Kolářová a Horák, 1996).

3.8.4. Vylučovací soustava

Uspořádání vylučovací soustavy cercárií se u různých druhů liší. V minulosti dokonce vývoj a rozdíly této soustavy měly velký význam v taxonomii (Kuntz, 1950). Například vylučovací soustavu cercárie *Schistosoma mansoni* tvoří šest párů plaménkových buněk a dva páry shluků cílů v hlavních sběrných kanálcích (Collins a kol., 2011), zatímco u cercárií *Trichobilharzia regenti* ji tvoří sedm párů plaménkových buněk a dva páry cíliárních shluků (Horák a kol., 1998). Každá plaménková buňka se napojuje na anteriorní nebo posteriorní sběrný kanálek, který vede do středu těla cercárie. Tam se tyto kanálky

sbíhají do dvou hlavních sběrných kanálků (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Hlavní sběrné kanálky *T. regenti* se pak spojují v zadní části těla cercárie, a dále pokračují kmenem ocásku a furkou (Horák a kol., 1998).

3.8.5. Nervová soustava

U motolic obecně se nervová soustava skládá z cerebrálního ganglia tvořeného několika neurony, tří párů nervových provazců (ventrální, dorsální a laterální) a komisur. S nervovou soustavou úzce souvisí i smyslové orgány, mezi něž patří například senzorické papily a oční skvrny (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Tolstenkov a kol. (2012) detailně popsali nervovou soustavu cercárií schistosom *Bilharziella polonica*, *Trichobilharzia szidati* a *T. franki*. Struktura nervové soustavy všech tří druhů je velmi podobná. Jejich tělo obsahuje dvoulaločné hlavové ganglium, dva ventrální (hlavní) nervové provazce, dva dorzální, dva laterální, pět komisur a šestnáct neuronů, z nichž čtyři páry se vyskytují v gangliu. Jeden z těchto párů neuronů vytváří výběžky vedoucí do hlavového orgánu. Výběžky neuronů v blízkosti acetabula se spojují a vytváří neurální pletenec přísavky. V ocásku se vyskytují čtyři nervové provazce a dva bipolární neurony (Tolstenkov a kol., 2011).

3.8.6. Vývoj cercárie

Časná embryogeneze a vývoj povrchu již byl popsán v kapitole 3.5. Pozdní vývoj cercárií schistosom však detailněji popsali pouze Cheng a Bier (1972) u motolice *S. mansoni*. Tito autoři během vývoje cercárie popsali sedm stadií. Stadium 1 je samostatná zárodečná buňka, stadium 2 shluk buněk, stadium 3 zárodečná koule, stadium 4 prodlužující se zárodečná koule, stadium 5 cercárie se základem ocásku, stadium 6 cercárie s prodlužujícím se ocáskem a stadium 7 plně vyvinutá cercárie. U stadia se základem ocásku (stadium 5) jsou již rozeznatelné přísavky. U vývojově pokročilejší cercárie se pak objevuje primordiální trávicí trakt skládající se z provazce velkých buněk. U cercárie s prodlužujícím se ocáskem (stadium 6) jsou již pozorovatelné prekurzory penetračních žláz a v postacetabulární oblasti se vyskytuje shluk zárodečných buněk, genitální primordium. V průběhu vývoje cercárie byla pozorována linie somatických a zárodečných buněk, přičemž velikost zárodečných buněk se postupně snižovala (Cheng a Bier, 1972).

4. Metodika

4.1. Získávání materiálu

Modelovým organismem byla schistosoma *T. regenti*, které v naší laboratoři jako mezipositel slouží plž *R. lagotis* a jako definitivní hostitel kachna domácí *Anas platyrhynchos* f. *domestica*. Pro účely diplomové práce byla použita larvální stadia vyvíjející se v mezipositeli, tedy sporocysty a cercárie, přičemž byly tkáně plže s larvami zpracovány na histologické řezy nebo byly vyvíjející se cercárie vypreparovány z hepatopankreatu.

4.1.1. Sběr cercárií

Nakažení plži byli na jednu hodinu umístěni do kádinek s vodou pod zdroj světla. Během této doby se z plžů uvolňovaly cercárie, jež byly přelity do Erlenmayerovy baňky zakryté alobalem. Hrdlo baňky bylo poté osvětleno a fototaktické cercárie se koncentrovaly u hladiny, odkud byly odebírány. Cercárie byly poté zpracovány na pokusy nebo byly využity k nákaze kachen.

4.1.2. Nákaza kachen

K získání miracidíí, jimiž byli posléze plži infikováni, bylo nejdříve potřeba infikovat kachny. Cercárie uvolněné z plže byly spočítány a infekční dávka na jednu kachnu čítající kolem 1000 cercárií byla odebrána do kádinky s vodou, do které byly na hodinu ponořeny nohy přibližně týden staré kachny (Meuleman a kol., 1984).

4.1.3. Nákaza plžů

Miracidia byla získávána z nazální tkáně kachen 20.–22. den po infekci kachen. Poté byla na dobu pěti hodin umístěna do vody společně s plžem. Infekční dávka byla patnáct miracidíí na jednoho plže. Tkáně plže byly poté různé dny po infekci zpracovávány pro histologické hodnocení nebo byly larvy z plžů vypreparovány.

4.2. Použité roztoky

SSS pufr (pH 7,8, 110–120 mOsm)

- 1,192 g HEPES
- 0,14 g NaOH
- 2,103 g NaCl
- 0,1491 g KCl
- 0,19 g MgCl₂
- 0,443 g CaCl₂
- Chemikálie byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

4.3. Fixace tkání

K fixaci materiálu byly použity dvě fixační tekutiny, a to 4% paraformaldehyd a Bouinův roztok. Bouinův roztok byl použit k fixaci tkání určených pro běžné histologické zpracování a paraformaldehyd byl využit při fixaci tkání zpracovávaných pro imunohistochemické hodnocení, značení faloidinem konjugovaným s FITC, značení lektiny konjugovanými s FITC a pro barvení celých červů pomocí histologických barviv.

4.3.1. Fixace pomocí Bouinova roztoku

Chemikálie:

- Bouinův roztok (Sigma)
- 70% etanol

Postup:

Tkáně plže, jež byly zpracovávány pro běžné histologické metody, byly po dobu 24 hodin fixovány při pokojové teplotě v Bouinově roztoku, jehož objem byl minimálně 10x větší než objem fixované tkáně. Po fixaci byly vzorky promývány v 70% etanolu, dokud nedošlo k vymytí kyseliny pikrové obsažené ve fixačním roztoku.

4.3.2. Fixace pomocí paraformaldehydu

Chemikálie:

- 4% paraformaldehyd (Sigma) v SSS
- SSS

Postup:

Tkáň plže a vypreparovaní celí červi, jež byli zpracovávaní pro imunohistochemické hodnocení, značení faloidinem konjugovaným s FITC, značení lektiny konjugovanými s FITC a pro barvení celých červů pomocí histologických barviv, byli fixováni po dobu 12 hodin při teplotě 4 °C v čerstvě připraveném 4% paraformaldehydu. Paraformaldehyd byl rozpuštěn v SSS za stálého míchání při 60 °C. Po fixaci bylo fixační činidlo z tkání vymýváno v roztoku SSS 3x 30 minut.

4.4. Zalévání tkání

Hepatopankreas infikovaného plže byl pro histochemické a imunohistochemické metody zaléván do parafínu, glykolmetakrylátové pryskyřice JB-4 a do média pro mrazové zalévání tkání OCT.

4.4.1. Zalévání tkání do parafínu

Zalévání vzorků do parafínu bylo vhodné pro barvení hematoxylinem a eosinem, Malloryho trichromem a pro značení některými protilátkami.

Chemikálie:

- 75% etanol
- 96% etanol
- 100% etanol
- xylen
- směs xylenu a parafínu (nasycený roztok parafínu v xylenu)
- parafín (Paraplast Plus, Leica Microsystems)

Postup:

Po vymytí fixáže byla tkáň plže odvodňována 3x 30 minut v 75%, 96% a 100% etanolu a následně projasněna 2x 15 minut v xylenu, poté byla na 15 minut převedena do směsi xylenu a parafínu. Následovalo prosycování tkáně parafínem v termostatu při teplotě 56 °C, přičemž byl parafín vyměněn po 1 hodině, po 6 hodinách a po 12 hodinách byl

vzorek přenesen do silikonové formy a zalit parafínem. Parafín pak tuhl při pokojové teplotě. Následně byla tkáň nakrájena pomocí žiletkových nožů (Thermo Scientific) na mikrotomu (Shandon Finess ME) na řezy o tloušťce 4–5 μm v případě běžných histologických barvení a 20 μm v případě imunohistochemického značení. Parafínové řezy pak byly pokládány na kapku vody na nahřátém sklíčku. Před barvením nebo histochemickým či imunohistochemickým značením pak bylo nutné řezy odparafinovat 2x 10 minut v xylenu a zavodnit v 100%, 96% a 75% etanolem, přičemž v každé lázni byly řezy ponechány 3x 5 minut. Nakonec byly ponořeny do destilované vody.

4.4.2. Zalévání tkání do JB-4

Chemikálie:

- JB-4 (Polysciences, Inc.):

Infiltrační roztok 1 (10 ml JB-4 plus solution A + 0,125 g benzoyl peroxid)

Infiltrační roztok 2 (5 ml JB-4 plus solution A + 0,0625 g benzoyl peroxid + 0,2 ml JB-4 plus solution)

Postup:

Po vymytí fixačního činidla byla tkáň přenesena do infiltračního roztoku 1, přičemž infiltrační roztok byl vyměněn po 90 minutách, pak po 12 hodinách a po dalších 90 minutách byla tkáň přemístěna do želatinové kapsle a zalita infiltračním roztokem 2, zcentrifugována (centrifuga Eppendorf minispin) a pryskyřice pak polymerovala při pokojové teplotě přibližně 48 hodin. Poté byla želatinová kapsle odstraněna a tkáň byla krájena na mikrotomu (Shandon Finess ME) pomocí skleněných nožů na řezy o tloušťce 4 μm v případě běžných histologických barvení a 8 μm v případě imunohistochemického značení. Řezy byly přenášeny na kapku vody na nahřátém mikroskopickém sklíčku. Po zaschnutí nebylo řezy třeba zavodňovat a mohly být rovnou značeny.

4.4.3. Zalévání tkání do OCT

Zalévání tkání do OCT a následné krájení na kryomikrotomu bylo použito pro imunohistochemické značení vasa-like proteinu.

Chemikálie:

- OCT (Sakura)
- isopentan (2-methylbutan) (Sigma)
- dusík (N₂)
- 4% sacharóza (C₁₂H₂₂O₁₁) (v SSS)
- 30% sacharóza (v SSS)
- 30% sacharóza (v OCT)
- 100% etanol

Postup:

Po vymytí paraformaldehydu byl hepatopankreas infikovaného plže ponořen do 4% sacharózy v SSS na 3x 15 minut. Následně byl vzorek přemístěn do 30% sacharózy v SSS na 3x 15 minut a ve čtvrtém roztoku byl ponechán přes noc. Poté byla tkáň přenesena na 1 hodinu do 30% sacharózy rozpuštěné v OCT, a na další hodinu pak do čistého OCT. Poté bylo OCT kápnuto na kousek korku a do OCT byl vložen vzorek. Poté byl celý vzorek zakryt pomocí OCT a ze zalévacího média byly odstraněny bubliny. Na stojan byla upevněna kádinka s isopentanem, pod ní byla položena polystyrenová nádoba s tekutým dusíkem tak, aby dno kádinky bylo ponořeno v isopentanu. Kousek korku se vzorkem zalitým v OCT byl ponořen do isopentanu a byl tam ponechán tak dlouho, dokud OCT nebylo bílé a neprůhledné. Vzorek byl následně uchovávan do zpracování při teplotě -80 °C. Tkáň na imunohistochemické značení byla krájena na kryomikrotomu pomocí žiletek (Thermo Scientific) na řezy o tloušťce 20 μm, přičemž řezy byly umístěny na sklíčka Superfrost plus (Thermo Scientific). Poté se řezy nechaly do druhého dne zaschnout a následně byly fixovány ve 4 °C 15 minut v předchlazeném 100% etanolu.

4.5. Histologické metody

4.5.1. Barvení řezů

Pro pozorování vývoje jednotlivých larválních stadií a výskytu sporocystogeneze či cercáriogeneze byly odebrány v pětidenních intervalech plži infikovaní 15 miracidii od 5. dpi do 45. dpi., kdy se z mezihostitele uvolňovaly cercárie, přičemž byli vždy odebráni dva jedinci. Pro zachycení sporocystogeneze v dceřiných sporocystách v pozdější fázi infekce pak byli zpracováni dva plži 60. dpi. a 70. dpi. Následně byly tkáně plže⁷ fixovány v Bouinově roztoku a zality do parafínu, jenž byl vybrán jako vhodnější zalévací medium než JB-4, neboť do tkání zalitých v parafínu pronikal anilin a bylo možné tyto řezy barvit Malloryho trichromem. Mimoto parafínové řezy přilnuly k podložnímu sklíčku a během dalšího zpracování neodplavávaly. Byly proto vhodné k přípravě sériových řezů.

Poté byly tkáně plže nakrájeny na řezy o tloušťce 4–5 μm , přičemž bylo nutné udělat sériové řezy, aby při následném pozorování zárodků bylo možné sledovat návaznost řezů. Dále byly řezy odparafinovány, zavodněny a barveny. Z několika různých vyzkoušených barvení (HaE, Malloryho trichrom, toluidinová modř, giemsa, azan a kombinace barev metylenová modř – azur II – bazický fuchsin) bylo nakonec jako nejvhodnější vybráno barvení hematoxylinem a eosinem a Malloryho trichrom.

Vývoj mateřských sporocyst byl pozorován v pětidenních intervalech od průniku miracidia do plže. U jednotlivých dceřiných sporocyst a cercárií nebylo možné určit přesný čas, kdy došlo k prvnímu dělení zárodečné buňky a jejich embryogenezi. Byla proto popsána jednotlivá vývojová stadia definovaná podle nově vznikajících struktur.

Struktury pak byly měřeny pomocí programu ImageJ, přičemž uvedené rozměry buněk a larev jsou pouze orientační, neboť byly měřeny na řezech.

4.5.1.1. Barvení hematoxylinem a eosinem

Hematoxylin a eosin barvil jádra buněk modře až fialově a cytoplazmu podle jejího obsahu růžově až tmavě fialově. Při barvení hematoxylinem a eosinem vynikly na histologických řezech především jádra. Toto histologické barvení bylo proto vhodné obzvláště pro pozorování časné embryogeneze larev a vývoj sporocyst.

⁷ Při pitvě plžů bylo nutné vyjmout žaludek plže, velkou část trávicí soustavy a jejich okolí kvůli výskytu velkého množství krystalů nahromaděných v plži.

Složení Ehrlichova kyselého hematoxylinu:

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

Příprava Ehrlichova kyselého hematoxylinu:

Ve 100 ml 96% etanolu byly rozpuštěny 2 g hematoxylinu. Do vzniklého roztoku bylo přidáno 100 ml destilované vody, 100 ml glycerolu a 10 ml ledové kyseliny octové. Posléze byl roztok nasycen síranem hlinito-draselným a bylo přidáno 0,4 g jodičnanu sodného. Připravený roztok byl přefiltrován, přelit do tmavé nádoby a za stálého přístupu vzduchu 7 dní oxidoval.

Složení eosinuY:

- eosinY (Sigma)
- 96% etanol
- 75% etanol
- ledová kyselina octová

Příprava eosinuY:

Ve 100 ml 96% etanolu byl rozpuštěn 1 g eosinuY. Vzniklý roztok byl naředěn přimícháním 300 ml 75% etanolu a poté byly přidány 2 ml ledové kyseliny octové.

Chemikálie:

- Ehrlichův kyselý hematoxylin (Sigma)
- 0,1% eosin (Polysciences, Inc.)
- destilovaná voda
- xylen
- 75%, 96% a 100% etanol
- kyselý ethanol (50 ml 75% etanolu + 3 kapky kyseliny chlorovodíkové)
- DPX – montovací medium (Sigma)

Postup:

Zavodněné řezy byly barveny 5 minut v hematoxylinu, poté opláchnuty pod tekoucí vodou. Vyplachování probíhalo, dokud se voda zbarvovala do modra. Poté následovala

diferenciace v kyselém etanolu do zmodrání jader, přičemž byla sklíčka ihned po diferenciaci opláchnuta vodou. Následovalo 30 sekund barvení eosinem, jenž byl posléze vymýván pod tekoucí vodou, dokud se voda zbarvovala do oranžova. Poté byly řezy odvodněny etanolovou řadou: 2x 20 sekund 75% etanol, 2x 20 sekund 96% etanol a 2x 20 sekund 100% etanol. Dále byly řezy projasněny ve dvou lázních xylenu, přičemž v každé lázni byly ponechány 30 sekund. Nakonec byly preparáty zamontovány do montovacího media DPX, přikryty krycím sklíčkem a stlačeny, abych došlo k vytlačení vzduchových bublin.

4.5.1.2. Barvení Malloryho trichromem

Malloryho trichrom je barvení skládající se ze tří různých barviv: kyselý fuchsin, anilin a oranž G. Malloryho trichrom barvil jádra buněk oranžově až hnědě, cytoplazmu podle jejího obsahu světle modře až hnědě a různá granula a fibrily v široké škále barev. Malloryho trichrom zvýraznil především diferencující se buňky, proto toto barvení bylo vhodné hlavně pro pozdní vývoj cercárií.

Složení směsi anilin – oranž G:

- 0,5 g anilinová modř
- 2 g oranž G
- 1 g kyselina fosfowolframová
- 8 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml destilované vody

Chemikálie:

- 1% kyselý fuchsin (v H₂O)
- směs anilin – oranž G
- 1% kyselina fosfowolframová (v H₂O)
- destilovaná voda
- 75%, 96% a 100% etanol
- xylen
- DPX

Postup:

Zavodněné řezy byly barveny 30 sekund kyselým fuchsinem a poté 60 sekund opláchnovány pod tekoucí vodou. Následně na sklíčka byla kápnuta 1% kyselina fosfowolframová a nechala se působit 30 sekund. Kyselina poté byla slita ze sklíčka a nevyplachovala se. Následovalo 10 minut barvení směsí anilin – oranž G a 30 sekund

vyplachování vodou. Nakonec byly řezy odvodněny a zamontovány do DPX (viz kapitola 3.5.1.1.).

4.5.2. Barvení celých červů

Pro komplexnější představu o jednotlivých vývojových stádiích cercárií získaných z histologických řezů a o žlázách typu I a II byly výsledky o vývoji cercárií doplněny o mikroskopické zpracování celých červů barvených lithium-karmínem, apomorfinem, acetokarmínem, Malloryho trichromem a kombinací neutrální červeně a nilské modři.

Vyvíjející se zárodky cercárií byly získány vytažením částí sporocyst z hepatopankreatu a porušením jejich povrchu. Poté byly zárodky fixovány v 4% paraformaldehydu, fixáž byla vymyta a poté byli červi barveni.

4.5.2.1. Barvení lithium-karmínem

Chemikálie:

- lithium-karmín (Sigma)
- uhličitan lithný (Li_2CO_3)
- SSS

Příprava lithium-karmínu:

Ve 100 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného (v SSS) bylo za varu rozpuštěno 2,5 g karmínu. Vzniklý roztok byl před barvením 50x naředěn 70% etanolem.

Postup:

Po vymytí fixáže byly zárodky barveny lithium-karmínem 15 minut. Poté byly zárodky promyty v SSS 3x 15 minut, přendány na podložní sklíčko a překryty krycím sklem.

4.5.2.2. Barvení acetokarmínem

Chemikálie:

- 0,5% acetokarmín (v 45% kyselině octové)
- 45% kyselina octová (v SSS)
- SSS

Postup:

Po vymytí paraformaldehydu byly zárodky barveny 15 minut v acetokarmínu. Následně byla barva vymývána 3x 15 minut v SSS. Červi byly poté přeneseni na podložní sklo a překryti krycím sklíčkem.

4.5.2.3. Barvení apomorfinem

Chemikálie:

- 1 mM apomorfin (Sigma)
- SSS

Příprava apomorfinu:

Apomorfin byl rozpuštěn v SSS a za stálého míchání se nechal 24 hodin oxidovat na světle při pokojové teplotě.

Postup (dle Brucknera a kol., 1974):

Po vymytí fixačního činidla byly zárodky barveny 4 hodiny v roztoku apomorfinu, poté byly promyty 3x 15 minut v SSS, přendány na podložní sklo a překryty krycím sklíčkem.

4.5.2.4. Barvení Malloryho trichromem

Chemikálie:

- 1% kyselý fuchsin (v H₂O)
- směs anilin – oranž G (složení viz kapitola 3.5.1.2.)
- 1% kyselina fosfowolframová (v H₂O)
- SSS

Postup:

Po vymytí fixáže byli červi barveni 5 minut v kyselém fuchsinu, poté byli promyti 3x 15 minut v SSS a následně barveni ve směsi anilin-oranž G 20 minut. Posléze byla barva odmyta v SSS 3x 15 minut a červi byly přeneseni na podložní sklo a překryti krycím sklíčkem.

4.5.2.5. Barvení nilskou modří a neutrální červení

Kombinace nilské modří a neutrální červeně barví specificky únikové žlázy cercárií některých druhů schistosom (Talbot, 1936).

Chemikálie:

- 1% neutrální červeň (v H₂O)
- 1% nilská modř (v H₂O)
- SSS

Postup (dle Talbota, 1936):

Zárodky, z nichž byla vymyta fixáž, byly barveny 5 minut v neutrální červení, poté byl přidán stejný objem nilské modří jako neutrální červeně (poměr 1:1), a dále byly cercárie

barveny dalších 5 minut. Nakonec byly barvy odmývány v SSS 3x 15 minut a pak byly cercárie přeneseny na podložní sklo a překryty krycím sklíčkem.

4.6. Fluorescenční imunohistochemické a histochemické metody

Imunohistochemické a histochemické fluorescenční metody byly použity k pozorování vývoje svalové, vylučovací a nervové soustavy cercárií, ke značení žláz a k označení vasa-like proteinu, jenž se vyskytuje v buňkách zárodečné linie živočichů a v kmenových buňkách ploštěnek, případně motolic (Lasko a Ashburner, 1988; Raz, 2010; Shibata a kol., 1999; Extavour a Akam, 2003; Pfister a kol., 2008; Solana a Romero, 2009; Willems a kol., 2010; Skinner a kol., 2012; Wang a kol., 2013). Veškeré fluorescenční imunohistochemické a histochemické metody byly modifikovány dle Collinse a kol. (2011). U těchto fluorescenčních metod byli označení červi montováni do montovacího média Vectashield obsahujícího DAPI, který specificky značí jádra buněk. Poté byli červi pozorováni na konfokálním mikroskopu (Leica TCS SP2) a na fluorescenčním mikroskopu (Olympus Cell-R).

4.6.1. Histochemické metody

Z fluorescenčních histochemických metod byly použity tyto metody značení: značení svaloviny pomocí faloidinu konjugovaného s fluorescein isothiokyanátem (FITC), jenž se váže na F-aktin vyskytující se ve velké koncentraci ve svalových vláknech, a značení pomocí lektinů, které se specificky váží na různé sacharidy. Značení lektiny se běžně používá ke značení některých žláz cercárií.

Faloidin byl aplikován na řezy hepatopankreatem infikovaného plže, který byl zalit v JB-4 a parafínu, a dále i na celé červy, zatímco lektiny byly aplikovány pouze na celé červy.

4.6.1.1. Značení svalové soustavy

Pro sledování vývoje svaloviny cercárií byla svalová soustava značena pomocí faloidinu konjugovaného s FITC.

Chemikálie:

- faloidin konjugovaný s FITC v blokačním roztoku (200 ng/ml)
- SSS
- blokační roztok
- permeabilizační roztok
- 4% paraformaldehyd (v SSS)
- Vectashield

Složení blokačního roztoku (k blokování nespecifických vazeb a permeabilizaci tkání):

- 1% BSA (bovine serum albumine) (Sigma)
- 0,3% Triton X 100 (Sigma)
- 0,05% Tween 20 (BIO-RAD)
- Chemikálie byly v požadované výsledné koncentraci rozpuštěny v SSS pufru.

Složení permeabilizačního roztoku:

- 0,5% SDS
- proteináza K (2 μ m/ml)
- 0,3% Triton X (Sigma)
- 0,05% Tween 20 (BIO-RAD)
- 1% BSA (bovine serum albumine)
- Chemikálie byly rozpuštěny v SSS.

Postup:

Celé zárodky fixované v 4% paraformaldehydu byly promyty v SSS obsahujícím 0,3% Triton X 3x 15 minut. Následně byl jejich povrch permeabilizován pomocí permeabilizačního roztoku, v němž byly ponechány 5 minut. K zablokování aktivity proteinázy K, jež tento roztok obsahuje, pak byly zárodky cercárií zality 4% paraformaldehydem, jenž byl posléze vymýván blokačním roztokem 3x 15 minut, přičemž byly zároveň zablokovány nespecifické vazby s použitými fluorescenčními sondami. Poté byli červi inkubováni v temné vlhké komůrce s faloidinem (v blokačním roztoku) při 4 °C 48 hodin. Po 48 hodinách byli oplachováni v SSS 3x 15 minut, přeneseni na podložní sklo, zamontováni do montovacího media.

Při značení svaloviny na řezech byl postup obdobný jako při značení celých červů. Byl však vynechán krok inkubace s permeabilizačním roztokem a následná postfixace paraformaldehydem.

4.6.1.2. Značení žláz

K lepší představě o rozložení žláz typu I a II a jejich vzhledu byly vyvíjející se cercárie značeny pomocí těchto lektinů: PNA, WGA a RCA-I, přičemž byli značeni pouze celí červi vypreparovaní z hepatopankreatu plže.

Tabulka 1.: Lektiny použité ke značení žláz

Lektin	Původ
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>
WGA	<i>Triticum vulgare</i>
RCA - I	<i>Ricinus communis</i>

Chemikálie:

- lektiny WGA, PNA, RCA-I konjugované s FITC (Vector Laboratories)
- SSS
- blokační roztok (viz kapitola 3.2.)
- permeabilizační roztok (složení viz kapitola 3.2.)
- 4% paraformaldehyd (v SSS)
- Vectashield

Postup:

Po vymytí fixáže z červů blokačním roztokem 3x 30 minut byly zárodky inkubovány s permeabilizačním roztokem 5 minut, jenž byl posléze vyměněn za 4% paraformaldehyd, ve kterém byli červi ponecháni 10 minut. Následně byl paraformaldehyd vymýván blokačním roztokem 3x 30 minut, a poté byly zárodky cercárií inkubovány s lektiny WGA, PNA nebo RCA-I v poměru 1:400 (v blokačním roztoku) v tmavé vlhké komůrce 24 hodin. Posléze byly lektiny vymývány roztokem SSS 3x 30 minut, červi byli přeneseni na sklíčko a zamontováni do Vectashiieldu.

4.6.2. Imunohistochemické metody

Imunohistochemie je metoda, která umožňuje detekci konkrétní látky pomocí protilátek. Imunohistochemické metody byly použity ke sledování vývoje vylučovací a nervové soustavy a k detekci zárodečných buněk, přičemž ke značení vylučovací soustavy byly použity protilátky proti α -tubulinu, ke značení nervové soustavy protilátky proti serotoninu a ke značení zárodečných buněk protilátky proti vasa-like proteinu. Protilátky k detekci vylučovací a nervové soustavy byly nejprve aplikovány na řezy hepatopankreatem nakaženého plže zalitého v pryskyřici JB-4 nebo v parafínu, a dále na celé červy. Protilátky určené k detekci zárodečných buněk (proti vasa-like proteinu) byly aplikovány na celé červy i na řezy.

Tabulka č.2.: Struktury značené pomocí protilátek

Značená struktura	Sonda
Vylučovací soustava	Protilátky proti α -tubulinu
Nervová soustava	Protilátky proti serotoninu
Zárodečná buňka	Protilátky proti vasa-proteinu

4.6.2.1. Značení celých červů

Postup pro značení celých červů se u jednotlivých typů protilátek prakticky nelišil. Rozdíly byly pouze v aplikaci jiných protilátek, případně koncentrací (viz tabulka č.3).

Chemikálie:

- primární protilátky (viz tabulka 3)
- sekundární protilátky (viz tabulka 3)
- SSS
- blokační roztok (viz kapitola 3.6.1.1.)
- permeabilizační roztok (složení viz kapitola 3.6.1.1.)
- 4% paraformaldehyd (v SSS)
- Vectashield

Postup:

Vypreparovaní červi byli promyti v blokačním pufru 3x 30 minut, inkubováni v tmavé vlhké komůrce s primárními protilátkami v blokačním pufru (viz tabulka č.3) 24 hodin, poté byli zaliti do permeabilizačního roztoku na 5 minut s následnou blokací proteinázy K v 4% paraformaldehydu 10 minut. Paraformaldehyd byl posléze vymýván

3x 30 minut a zárodky byly inkubovány v tmavé vlhké komůrce se sekundárními protilátkami v blokačním pufu (viz tabulka č.3) 24 hodin. Nakonec byly protilátky vymyty v SSS 3x 30 minut a červi zamontováni na sklíčko montovacím médiem Vectashield.

Tabulka č. 3.: Použité protilátky

	Vylučovací soustava	Nervová soustava	Zárodečné buňky
Primární protilátky	proti α -tubulinu	proti serotoninu	proti vasa-like proteinu
Původ pr. protilátky	myš	králík	králík
Výrobce pr. protilátky	Sigma	Sigma	Gene Tech
Koncentrace pr. protilátky	1 : 400	1 : 400	1 : 400
			1 : 1000
Sekundární protilátky	proti myším protilátkám konjugované s FITC	proti králičím protilátkám konjugované s cy3 (cyanin 3)	proti králičím protilátkám konjugované s cy3 (cyanin 3)
Původ sek. protilátky	koza	koza	koza
Výrobce sek. protilátky	Life Technologies	Life Technologies	Life Technologies
Koncentrace sek. protilátky	1 : 400	1 : 400	1 : 400
			1 : 1000

4.6.2.2. Značení řezů

Protilátky proti α -tubulinu a proti serotoninu byly aplikovány na řezy tkáněmi zalitými v JB-4 a v parafínu. Protilátky proti vasa-like proteinu byly aplikovány na řezy hepatopankreatem zalitého v parafínu a na kryořezy.

Chemikálie:

- primární protilátky (viz tabulka 3)
- sekundární protilátky (viz tabulka 3)
- blokační roztok (viz kapitola 3.6.1.1.)
- permeabilizační roztok (viz kapitola 3.6.1.1.)
- SSS
- 4% paraformaldehyd (v SSS)
- Vectashield

Postup:

Řezy hepatopankreatu byly blokovány v blokačním roztoku 3x 30 minut, poté inkubovány s primární protilátkou v blokačním roztoku (viz tabulka č. 3) v tmavé vlhké komůrce při 4 °C 24 hodin, jež poté byla vymývána v blokačním roztoku 3x 30 minut a posléze inkubována se sekundárními protilátkami (viz tabulka č. 3) 24 hodin. Nakonec byly protilátky vymyty v SSS (3x 30 minut) a zamontovány na sklíčko pomocí média Vectashield.

4.7. Elektronová mikroskopie

Pro detailnější pozorování vývoje cercárií a diferenciacie jejich zárodečných buněk byla využita transmisní elektronová mikroskopie. Pro studium vyvíjejících se cercárií byl použit hepatopankreas infikovaného plže, zatímco ke studiu zralé cercárie byly zpracovány larvy, jež se uvolnily z mezihostitele.

Chemikálie:

- 2,5% glutaraldehyd (v SSS)
- 1% oxid osmičelý (OsO_4) (v SSS)
- SSS
- 50%, 75%, 96% a 100% etanol
- 100% aceton
- pryskyřice Spurr (SPI-ChemTM) – namíchána dle pokynů výrobce

Postup:

Vzorky byly fixovány nejdříve 12 hodin v 2,5% glutaraldehydu, poté byla fixáž vymývána v SSS 3x 30 minut. Po vymytí následovala fixace v 1% oxidu osmičelém, jenž byl vymýván v SSS 3x 30 minut. Následovalo odvodňování alkoholovou řadou v tomto pořadí: 50%, 75%, 96% a 100% etanol, přičemž každé promývání probíhalo 1x 15 minut, pouze u 100% etanolu 3x 15 minut. Poté byl vzorek převeden do 100% acetonu (3x 15 minut). Dále byly tkáně přenášeny do směsí spurru a acetonu v různých poměrech v následujícím pořadí: aceton se spurrem 2:1 na 2 hodiny, aceton se spurrem 1:1 na 6 hodin, aceton se spurrem 1:3 na 12 hodin, čistý spurr na 3x 12 hodin. Po prosycení byly vzorky přeneseny do BEEM kapslí (SPI Supplies), zality čistou pryskyřicí a zcentrifugovány. Následně byly umístěny do termostatu, kde při 60 °C 2 dny polymerovaly. Poté byly v laboratoři transmisní elektronové mikroskopie nakrájeny na 60-70 nm. Dále byly vzorky 20 minut kontrastovány 3% octanem uranylu, 20 minut citrátem olovnatým a pozorovány pod transmisním elektronovým mikroskopem (JEOL 1011).

5. Výsledky

5.1. Použití histologického barvení pro sledování diferenciací zárodečných buněk a vývoje larválních stadií *Trichobilharzia regenti*

5.1.1. Vývoj mateřské sporocysty

Mateřské sporocysty byly zachyceny ve tkáních plže 5. dpi, 10. dpi, 15. dpi a 20. dpi., přičemž 5. dpi. byly v těle nalezeny tři sporocysty, 10. dpi. dvě sporocysty a 15. a 20. dpi. jedna sporocysta.

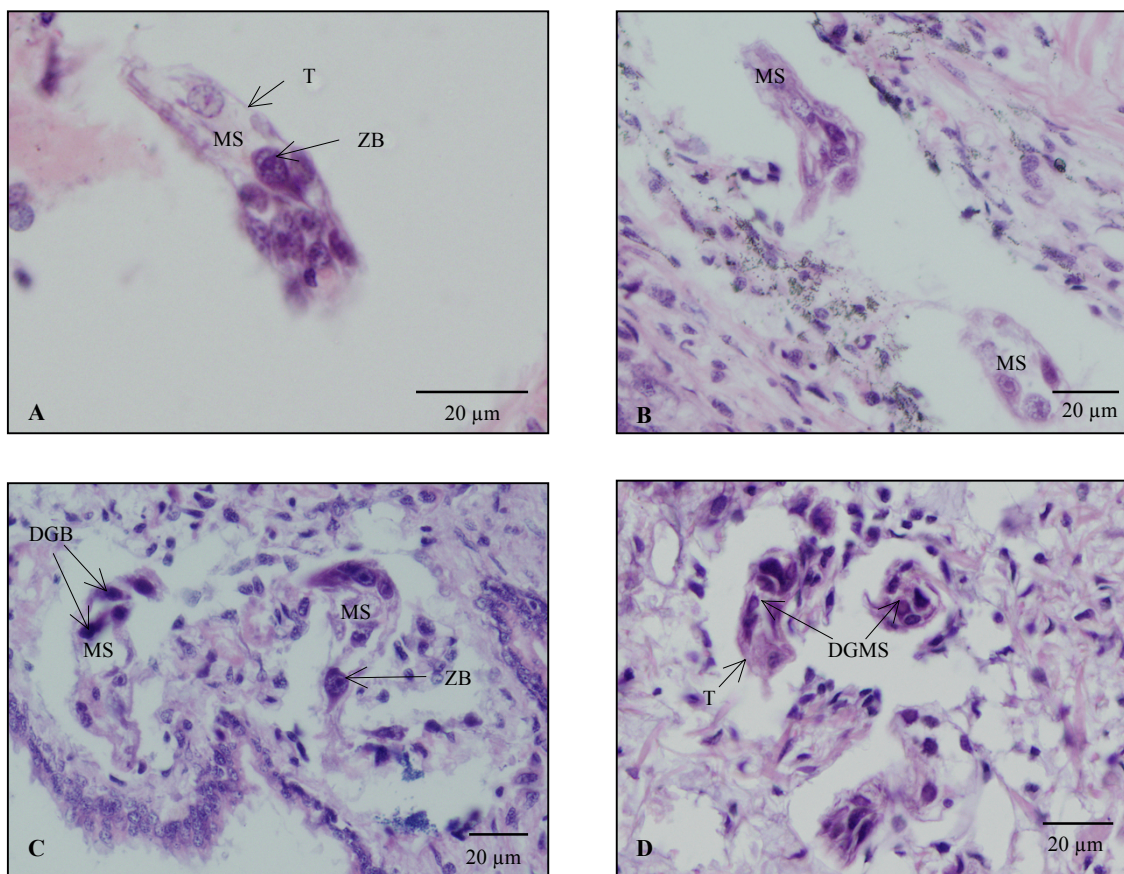
5.1.1.1. Mateřská sporocysta v těle plže 5. den po infekci

Pátý den po průniku miracidii byly v noze plže nalezeny tři mateřské sporocysty. První sporocysta se vyvíjela v sinu nohy plže (viz obr. 6A, 6B). Tato sporocysta byla úzká (max. 22,5 μm) a podlouhlá. Její délku však nebylo možné určit, neboť na jednotlivých histologických řezech byly zachyceny pouze její části. Jejich tegument se barvil HaE jasně růžově a tenká tělní stěna (max. 5,5 μm) pod tegumentem světle růžově. Šířka sporocysty a její stěny se v různých částech organismu lišila. Mateřská sporocysta obsahovala jednotlivé zárodečné buňky (velikost 6–10,5 μm). Tyto buňky se vyznačovaly velkým jádrem (5,5–8,5 μm) s výrazným jadérkem. Jaderný obsah měl modro-fialový nádech. Kondenzovaný chromatin v jádře byl pozorovatelný podél jaderného obalu a v několika tenkých provazcích směřujících od jadérka. Pro zárodečné buňky je charakteristické malé množství bazofilní cytoplazmy, jež se barví tmavě fialově. Tyto buňky byly ve sporocystách buď těsně nahloučeny nebo se kolem nich vytvořily volné prostory. Některá jádra zárodečných buněk obsahovala dvě jadérka, z čehož vyplývá, že byly právě ve fázi dělení.

Druhá sporocysta se vyskytovala v noze plže těsně pod povrchovým epitelem a oproti předchozí sporocystě byla kratší (viz obr. 6C). V dutině této sporocysty byly pozorovány zárodečné buňky s charakteristickým velkým jádrem a výrazným jadérkem, ale i stejnoměrně tmavě zbarvené buňky, s nerozlišitelnými jadernými strukturami.

Třetí sporocysta byla lokalizována přímo ve svalovině nohy plže (viz obr. 6D). Tato sporocysta byla svaštělá a obsahovala pouze buňky s tmavě zbarveným jádrem

a nerozlišitelnými vnitřními strukturami. Na povrchu byla stále rozeznatelná vrstva tegumentu.



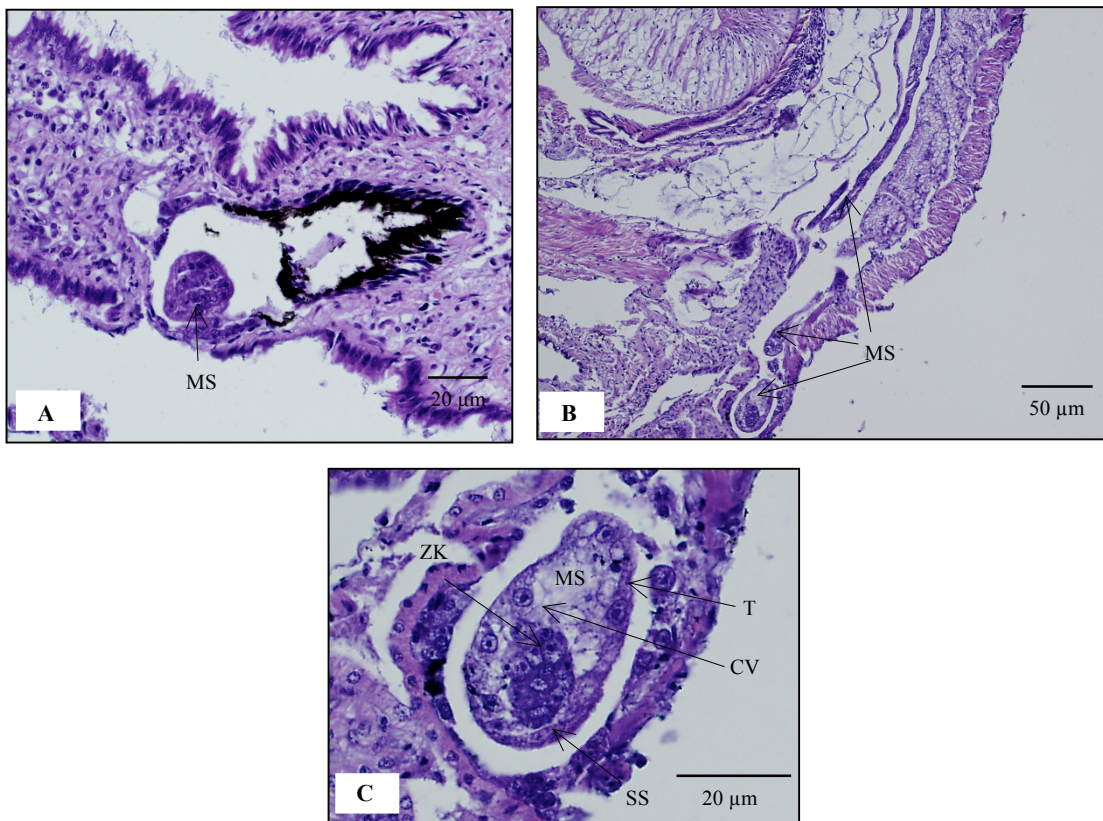
Obr. 6. Mateřská sporocysta v tkáni plže 5. dpi. **A, B** – Normální vývoj mateřské sporocysty (HaE). **C** – Mateřská sporocysta s degenerujícími buňkami.(HaE) **D** – Degenerující mateřská sporocysta (HaE). DGB – degenerující buňka, DGMS – odumřelá mateřská sporocysta, MS – mateřská sporocysta, T – tegument, ZB – zárodečná buňka

5.1.1.2. Mateřská sporocysta v těle plže 10. den po infekci

Desátý den po infekci byly v tkáních plže nalezeny dvě mateřské sporocysty. Jedna byla lokalizována v tykadle, druhá v dutině cefalopedální oblasti plže.

Sporocysta v tykadle měla šířku těla 47 µm a tělní stěny 7,2 µm. Její dutina byla vyplněna těsně nahloučeným zárodečným materiálem (viz obr. 7A).

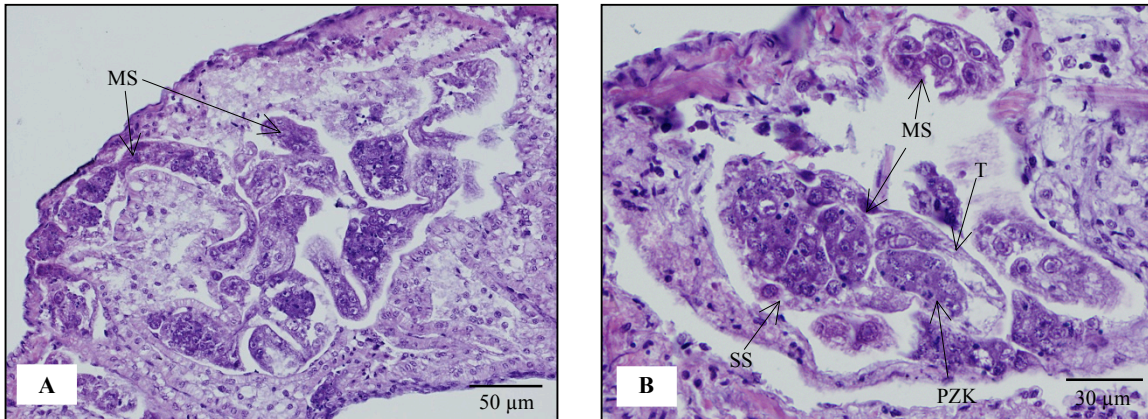
Sporocysta v cefalopedální oblasti (viz obr. 7B, 7C) obsahovala samostatné zárodečné buňky i již vyvíjející se zárodky ve stadiu zárodečné koule. Sporocysta byla v některých oblastech úzká (konstrikce), v jiných se rozšiřovala a tvořila ve své tělní dutině volné prostory kolem zárodků. Dutiny prolínalo velké množství cytoplazmatických výběžků, jejichž původ nelze pomocí světelné mikroskopie určit. Šířka její tělní stěny dosahovala až 9,5 µm, šířka těla až 49 µm.



Obr. 7. Mateřská sporocysta 10. dpi. **A** – Mateřská sporocysta v tykadle (HaE). **B** – Mateřská sporocysta v plášti plže (HaE). **C** – Detail mateřské sporocysty v plášti (HaE). CV – cytoplasmatické výběžky, MS – mateřská sporocysta, SS – stěna sporocysty, T – tegument, ZK – zárodečná koule

5.1.1.3. Mateřská sporocysta v těle plže 15. den po infekci

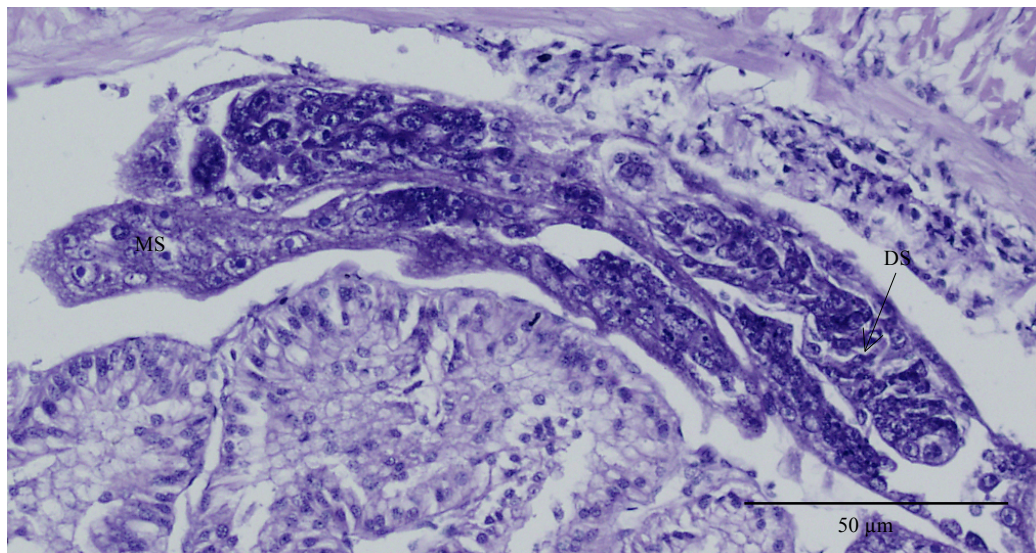
Patnáctý den po průniku miracidia do plže byla mateřská sporocysta nalezena v sinu pláště (viz obr. 8A, 8B). Tato sporocysta byla větších rozměrů než sporocysta 10. dpi. Tloušťka její stěny byla až 10 µm a šířka těla až 59 µm. Stejně jako předchozí sporocysty se místy zužovala (konstrikce) a místy rozšiřovala. V širších oblastech vznikaly dutiny s vyvíjejícími se zárodky ve stadiu samostatných zárodečných buněk, agregátů buněk, zárodečných koulí i již se prodlužujících zárodečných koulí (viz kapitola 5.1.2.3.). Mezi některými zárodky a tělní stěnou byly viditelné cytoplasmatické spoje.



Obr. 8. Mateřská sporocysta v plášti plže 15. Dpi (HaE). MS – mateřská sporocysta, SS – stěna sporocysty, T – tegument, PZK – prodlužující se zárodečná koule

5.1.1.4. Mateřská sporocysta v těle plže 20. den po infekci

Dvacátý den po průniku miracidia byla nalezena jedna mateřská sporocysta, jež byla lokalizována v sinu pláště (viz obr. 9). Tato larva zaujímala více prostoru než sporocysta 15. dpi. Její tělní stěna dosahovala tloušťky až 19 µm, přičemž byla naměřena šířka sporocysty až 69 µm. V této sporocystě byly kromě mladších zárodků zachycené již i dceřiné sporocysty s vyvinutým tegumentem (viz kapitola 5.1.2.5.).



Obr. 9. Mateřská sporocysta v plášťové dutině plže 20. dpi obsahující dceřiné sporocysty (HaE). DS – dceřiná sporocysta, MS – mateřská sporocysta

5.1.2. Vývoj dceřiné sporocysty

Dceřiné sporocysty byly rozděleny podle nově vznikajících struktur do pěti vývojových stadií (viz tabulka č. 4). Kritériem bylo, zda se jedná o jednobuněčný či mnohobuněčný zárodek, zda je přítomen primitivní epitel či tegument, a zda již došlo k prodlužování těla.

Tabulka č. 4:

Vývojová stadia dceřiných sporocyst					
	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5
Mnohobuněčnost	0	X	X	X	X
Primitivní epitel	0	0	X	X	0
Prodlužování těla	0	0	0	X	X
Tegument	0	0	0	0	X

X - Struktura detekována

0 - Struktura nedetekována

5.1.2.1. Stadium 1: zárodečná buňka

Stadium 1 je samostatná zárodečná buňka (viz obr. 10A, 10E), jež se nachází v tělní dutině mateřské sporocysty. Byly zachyceny i zárodečné buňky ve fázi dělení. Mezi některými zárodečnými buňkami a stěnou mateřského organismu byly zřetelné cytoplasmatické spoje. Zárodečná buňka již byla popsána v kapitole 5.1.1.1.

5.1.2.2. Stadium 2: agregát buněk

Stadium 2 je shluk dvou a více buněk, u něhož nebyla pozorována jádra primitivního epitelu a jež je charakteristický svým nepravidelným povrchem (viz obr. 10C, 10D). Dvoubuněčný zárodek vzniklý dělením zárodečné buňky se skládá z buněk morfologicky připomínajících samostatné zárodečné buňky. Některé zárodečné buňky se nacházely ve fázi dělení. Zárodky byly spojeny cytoplazmatickými výběžky se stěnou mateřské sporocysty a se zárodky v tělní dutině.

5.1.2.3. Stadium 3: zárodečná koule

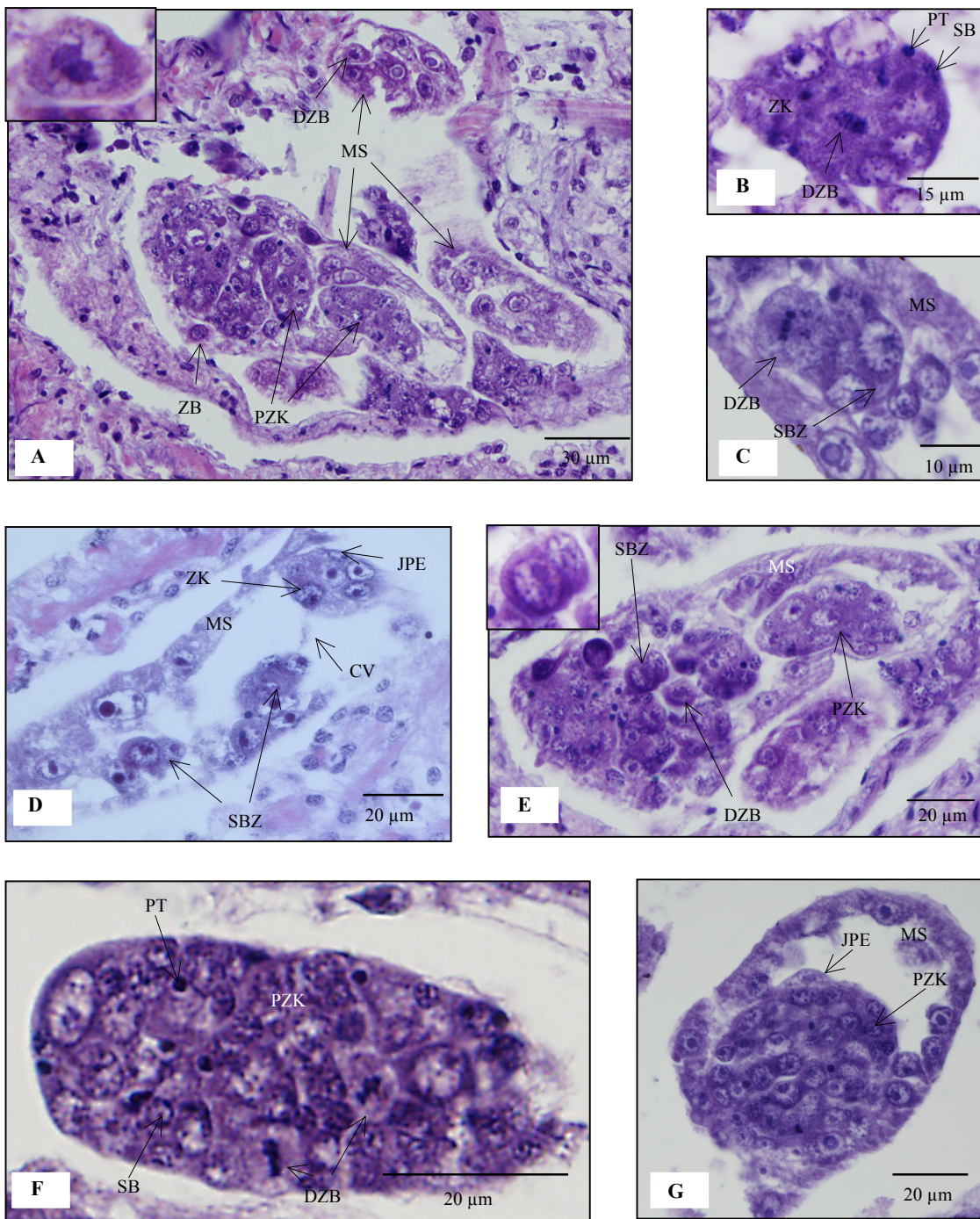
Stadium 3 je u motolic obecně označováno jako zárodečná koule (viz obr. 10B, 10C). Zárodečné koule jsou kulatého až oválného tvaru a jsou charakteristické svým pravidelným povrchem. Na povrchu zárodečných koulí byla zachycena plochá jádra (délka cca 6 μm , šířka cca 3 μm) primitivního epitelu, jehož cytoplasmatické výběžky obalují embryo (viz obr. 10C). Jádra primitivního epitelu se vyznačují, stejně jako jádra zárodečných buněk, výrazným jadérkem a rozptýleným chromatinem pozorovatelným především podél

jaderného obalu. U zárodečných koulí byly již mimo zárodečné buňky pozorovány i buňky somatické (viz obr. 10B). Tyto buňky jsou oproti zárodečným buňkám výrazně menší a v jejich jádře se nachází velké shluky heterochromatinu rozprostírající se po celé nukleoplazmě. Jejich jádérko je špatně rozeznatelné nebo jej vůbec nelze rozlišit. Tyto buňky byly pozorovány především směrem k povrchu zárodku, zatímco zárodečné buňky se vyskytovaly spíše ve středu embrya. V zárodku se již se vyskytují pyknotická tělíska, která představují degenerované buňky. Na histologických řezech se jeví jako kulaté tmavé homogenní struktury. V embryích byly pozorovatelné dělicí se zárodečné buňky. Zárodečné koule byly zachyceny v dutině mateřské sporocysty 10. dpi.

5.1.2.4. Stadium 4: prodlužující se zárodečná koule

Pro stadium 4 je typické prodlužování těla (viz obr. 10E). Z výskytu velkého množství dělicích se zárodečných buněk a pyknotických tělísek vyplývá, že v tomto stadiu dochází nejen k intenzivní proliferaci, ale i k výrazné degeneraci embryonálních buněk. V počáteční fázi prodlužování zárodku se výrazně snižuje poměr počtu zárodečných buněk/somatických buněk.

S postupným prodlužováním zárodku však začínají převažovat zárodečné buňky a embryo získává červovité vzezření. Na povrchu jsou však stále pozorovatelná jádra primitivního epitelu a zárodek je spojen se stěnou mateřské sporocysty cytoplazmatickými výběžky (viz obr. 10F). Prodlužující se zárodečné koule byly poprvé zachyceny 15. dpi.

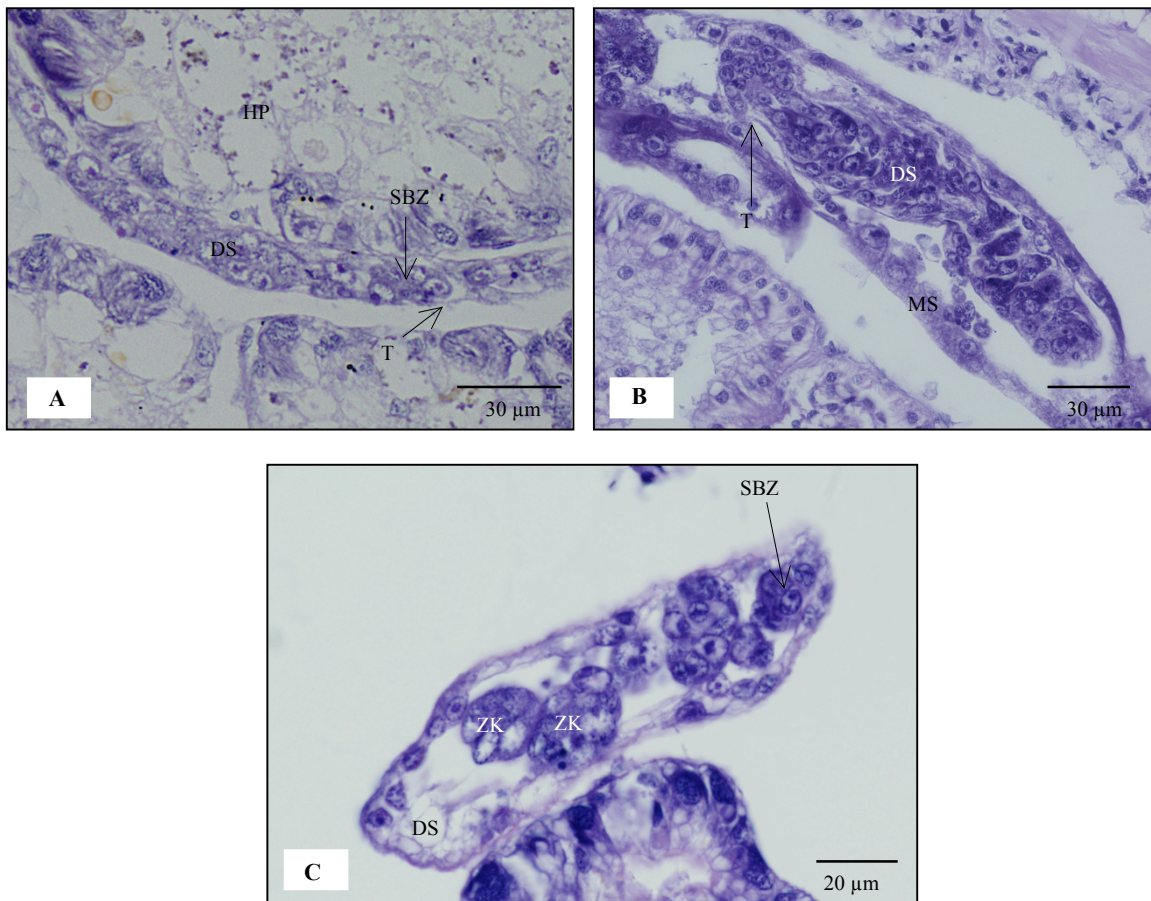


Obr. 10. Vývoj dceřiných sporocyst. **A** – Mateřská sporocysta se zárodky. V rámečku detail dělící se zárodečné buňky (HaE). **B** – Zárodečná koule (HaE). **C** – Shluk buněk zárodku. **D** – Mateřská sporocysta se zárodky. V rámečku detail jádra primitivního epitelu (HaE). **E** – Mateřská sporocysta se zárodky. V rámečku detail dvoubuněčného zárodku (HaE). **F, G** – Prodlužující se zárodečná koule (HaE). CV – cytoplazmatický výběžek, DZB – dělící se zárodečná buňka, JPE – jádro primitivního epitelu, MS – mateřská sporocysta, PT – pyknotické tělísko, PZK – prodlužující se zárodečná koule, SB – somatická buňka, SBZ – shluk buněk zárodku, ZB – zárodečná buňka, ZK – zárodečná koule

5.1.2.5. Stadium 5: Sporocysta s tegumentem

Pro stadium 5 je typická přítomnost tegumentu. Dva typy dceřiných sporocyst v této fázi vývoje byly zachyceny 20. dpi. Jedna dceřiná sporocysta byla zachycena v interlobulárních prostorech hepatopankreatu (viz obr. 11A). Tato sporocysta byla podlouhlá a úzká (šířka max. 17 μm). V její dutině se vyskytovaly samostatné zárodečné buňky a zárodky ve stadiu shluků buněk (viz kapitola 5.1.3.1. a 5.1.3.2.).

Další sporocysty s přítomností tegumentu byly nalezeny v mateřské sporocystě. Některé tyto larvy však byly oproti larvě v hepatopankreatu širší (šířka max. 36 μm) (viz obr. 11B). Jejich tělní dutina obsahovala pouze samostatné zárodečné buňky nevykazující známky proliferace.



Obr. 11. Dceřiné sporocysty s vyvinutým tegumentem. **A** – Dceřiná sporocysta v hepatopankreatu, 20. Dpi (HaE). **B** – Dceřiná sporocysta v tělní dutině mateřské sporocysty, 20. Dpi (HaE). **C** – Dceřiná sporocysta v hepatopankreatu, 35. Dpi (HaE). DS – dceřiná sporocysta, HP – hepatopankreas, MS – mateřská sporocysta, SBZ – shluk buněk zárodku, T – tegument, ZK – zárodečná koule

Během dalšího vývoje se dceřiné sporocysty v hepatopankreatu prodlužovaly, rozšiřovaly a docházelo k zesilování jejich tělní stěny a vzniku volných prostorů kolem vyvíjejících se zárodků (viz obr. 11C).

5.1.3. Vývoj cercárie

Cercárie byly rozděleny podle nově vznikajících struktur do deseti vývojových stadií (viz tabulka č. 5), a to podle následujících kritérií: mnohobuněčnost, přítomnost primitivního epitelu, prodlužování těla zárodku, přítomnost tegumentu, postacetabulárních žláz, cirkumacetabulárních žláz, ocásku, furky, kmene ocásku, acetabula, hlavového orgánu, očních skvrny, žláz typu I, žláz typu II a hlavové žlázy.

Tabulka č. 5:

Vývojová stadia cercárií										
	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
Mnohobuněčnost	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Primitivní epitel	0	0	X	X	0	0	0	0	0	0
Prodlužování těla	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X
Tegument	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X
PA žlázy	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X
CA žlázy	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X
Ocásek	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X
Furka	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X
Kmen ocásku	0	0	0	0	0	0	X	X	X	X
Acetabulum	0	0	0	0	0	0	X	X	X	X
Hlavový orgán	0	0	0	0	0	0	X	X	X	X
Oční skvrny	0	0	0	0	0	0	0	X	X	X
Žlázy typu I	0	0	0	0	0	0	0	X	X	X
Žlázy typu II	0	0	0	0	0	0	0	0	X	X
Hlavová žláza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X

X - Struktura nalezena

0 - Struktura nenalezena

PA - Postacetabulární

CA - Cirkumacetabulární

St. - Stadium

5.1.3.1. Stadium 1: zárodečná buňka

Stadium 1 je samostatná zárodečná buňka vyskytující se v tělní dutině dceřiné sporocysty. Zárodečná buňka je se stěnou sporocysty spojena pomocí cytoplasmatických výběžků (viz obr. 12A). Zárodečné buňky v dceřiných sporocystách morfologicky i velikostí odpovídají zárodečným buňkám, jež se vyskytují v tělní dutině mateřských sporocyst (viz kapitola 5.1.1.1.). V dceřiných sporocystách byly zárodečné buňky zachyceny i ve fázi dělení (viz obr. 12A, 12C). Kromě zárodečných buněk však byl v několika případech pozorován ve fázi dělení i jiný typ buněk. Tyto buňky obsahovaly výrazná jádra, jež se

hematoxylinem barvila fialově, a v nich dvě výrazná jádérka. Kolem jádra bylo malé množství bazofilní cytoplazmy. Oproti zárodečným buňkám byly však tyto buňky malé. Ve fázi dělení jejich jádro měřilo kolem 4,8 μm (viz obr. 12B).

5.1.3.2. Stadium 2: agregát buněk

Stadium 2 je shluk buněk zárodku s nepravidelným povrchem (viz obr. 12A, 12B). Tyto zárodky se skládají z buněk zárodečných připomínajících morfologicky samostatné zárodečné buňky. Některé byly zachyceny ve stadiu dělení.

5.1.3.3. Stadium 3: zárodečná koule

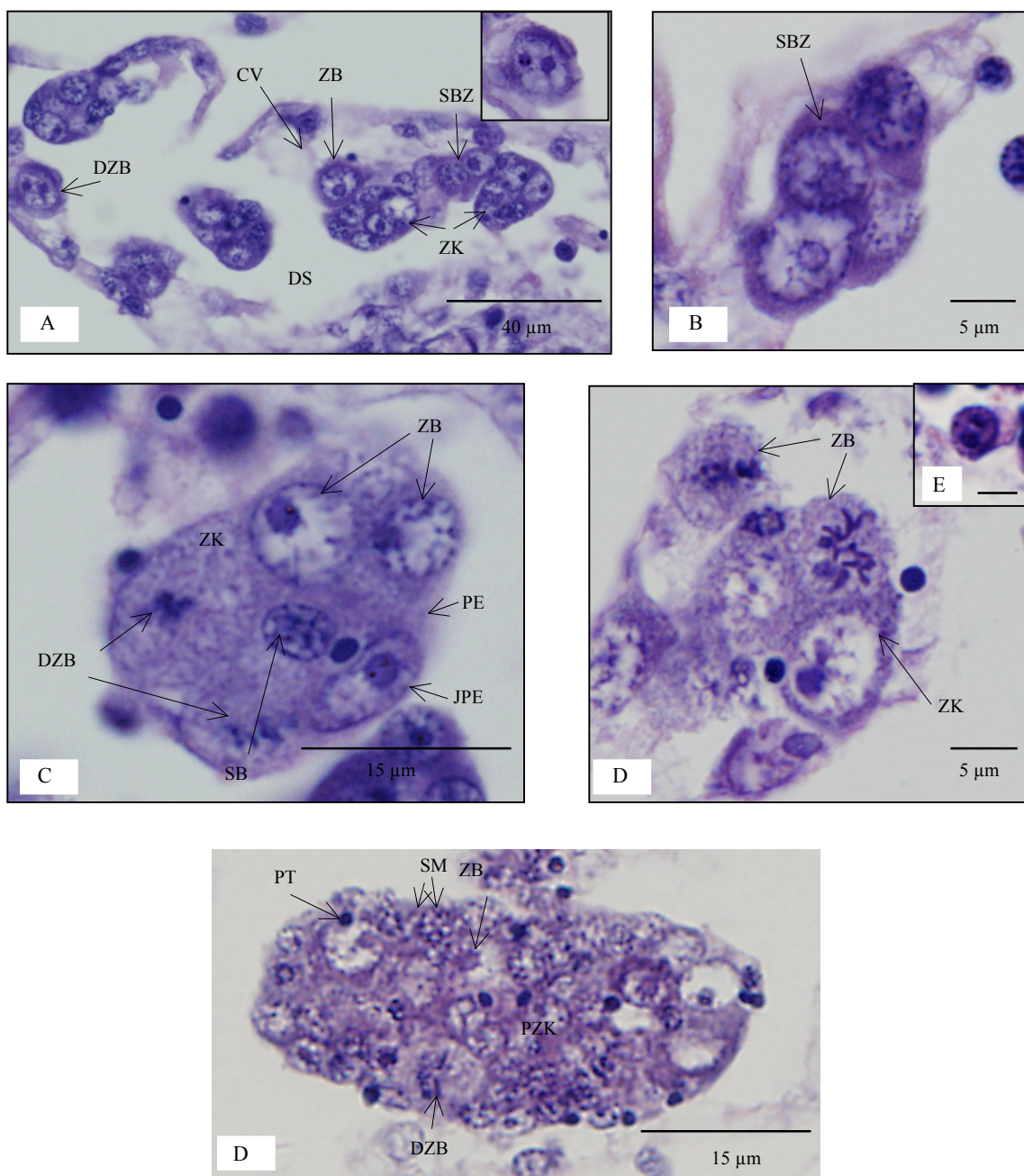
Stadium 3 je zárodek skládající se ze zárodečných a somatických buněk (viz obr. 12A, 12C, 12D). Somatické buňky vzhledově připomínají somatické buňky časných embryí dceřiných sporocyst (viz kapitola 5.1.2.3.). Zárodečná koule je typická pravidelným kulatým tvarem. Na povrchu těchto zárodečných koulí byla pozorována jádra primitivního epitelu podobná zárodečným koulím vyvíjejících se sporocyst (viz obr. 12C a kapitola 5.1.2.3.).

I zde byly pozorované zárodečné buňky během dělení (viz obr. 12C, 12D). U vývojově pokročilejších zárodečných koulí se snižoval poměr počtu zárodečných buněk/somatických buněk.

Kromě somatických a zárodečných buněk byla v zárodečných koulích pozorována pyknotická tělíska, což naznačuje, že v tomto stadiu již dochází k odumírání některých embryonálních buněk. Zárodečné koule jsou, stejně jako předchozí stadia, propojeny se stěnou sporocysty cytoplazmatickými výběžky. Taková spojení byla pozorována i mezi jednotlivými zárodky.

5.1.3.4. Stadium 4: prodlužující se zárodečná koule

Pro stadium 4 je charakteristické prodlužování těla (viz obr. 12D). V zárodku se vyskytuje velké množství proliferujících buněk i pyknotických tělísek. Velikost jader zárodečných buněk se pohybuje mezi 7–9 μm . U prodlužující se zárodečné koule se výrazně zvyšuje množství somatických buněk. Do tohoto vývojového stadia je zárodek cercárie od zárodku sporocysty prakticky nerozeznatelný.



Obr. 12. Časná vývojová stadia cercarií. **A** – Zárodky cercarií v dceřině sporocystě. V rámečku detail dělící se zárodečné buňky (HaE). **B** – Shluk buněk zárodku (HaE). **C** – Zárodečná koule (HaE). **D** – Zárodečná buňka v metafázi a část zárodečné koule, jejíž zárodečná buňka se nachází v anafázi (HaE). **E** – Dělicí se buňka morfologicky odlišná od zárodečných buněk (HaE). Měřítko 4 μm. **F** – Prodlužující se zárodečná koule HaE). CV – cytoplazmatický výběžek, DS – dceřině sporocysta, DZB – dělící se zárodečná buňka, JPE – jádro primitivního epitelu, PE – primitivní epitel, PT – pyknotické tělíčko, PZK – prodlužující se zárodečná koule, SBZ – shluk buněk zárodku, SM – somatická buňka, ZB – zárodečná buňka, ZK – zárodečná koule

5.1.3.5. Stadium 5: cercárie se základem ocásku

Stadium 5 se odlišuje od předchozího stadia přítomností tegumentu, základu ocásku a cirkumacetabulárních (2 páry) a postacetabulárních žláz (3 páry) (viz obr. 13A–E). Tegument tvoří tenkou, těsně přiléhající vrstvu na povrchu zárodku, přičemž se barví HaE

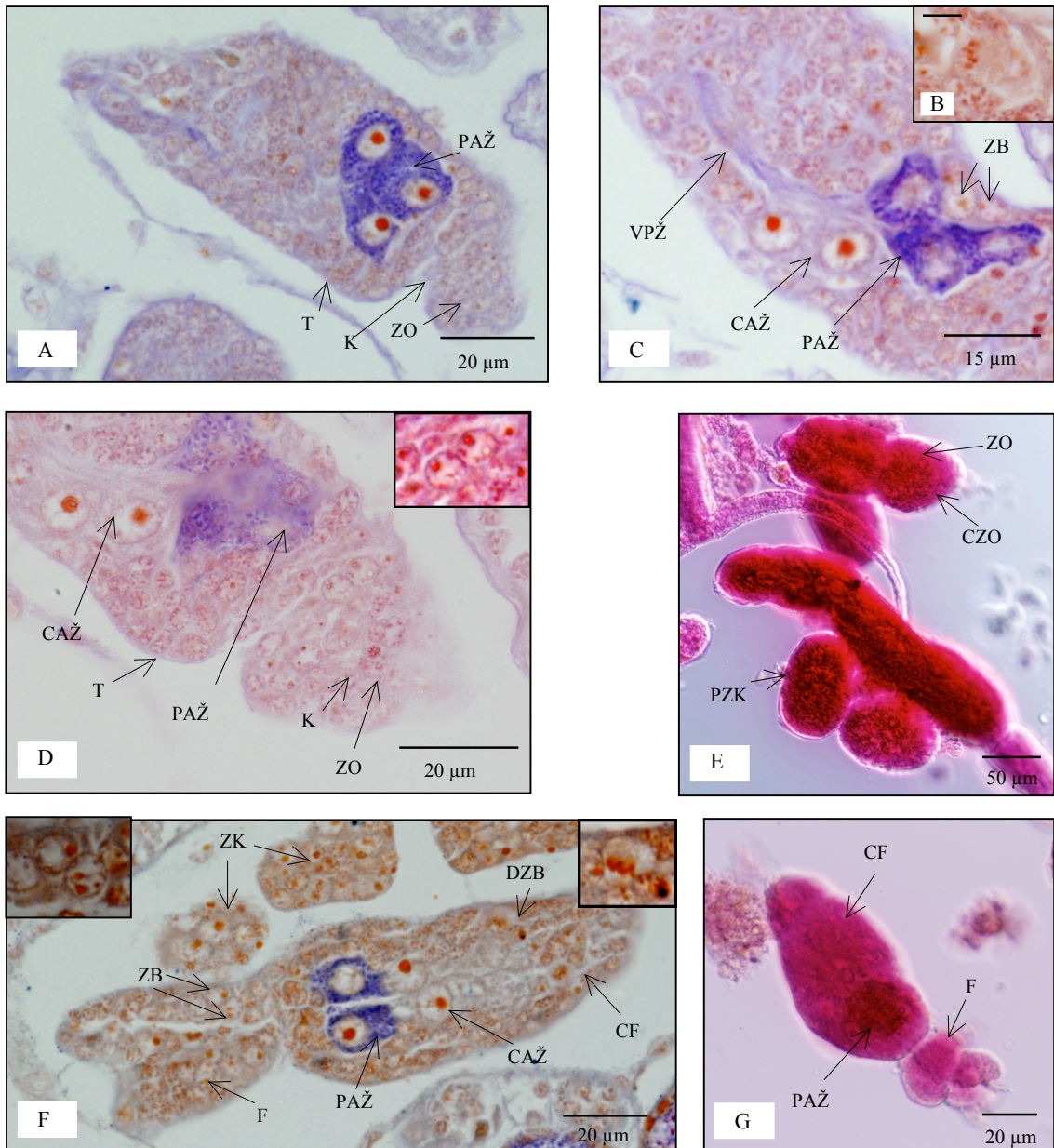
růžově a Malloryho trichromem světle modře. Ocásek v tomto stadiu je oddělen od zbytku těla konstrikcí v zadní části zárodku. Pro cirkumacetabulární a postacetabulární žlázy je charakteristické velké jádro (8–10 μm) s výrazným jadérkem. Nukleoplazma těchto jader obsahuje rozptýlený chromatin. Cytoplazma postacetabulárních žláz obsahuje granula, která se HaE barví fialově a Mallory trichromem modře. Granula cirkumacetabulárních žláz se neobarvila ani jedním histologickým barvením, a cytoplazma žláz tak měla bílé až béžové zbarvení. U obou typů penetračních žláz již byly rozeznatelné vývody směřující anteriorním směrem.

Somatické buňky zárodku mají, stejně jako předchozí stadia, charakteristické jádro (4–5,5 μm) se shluky chromatinu v nukleoplazmě a jejich jadérko je téměř nerozlišitelné. Somatické buňky byly v zárodku těsně nahloučeny. Kromě somatických buněk však byly pozorovány i buňky, jejichž jádra byla jen o něco větší, případně stejně velká (5–6 μm) (viz obr. 13F). Jejich jádra byla typická výrazným jadérkem a rozptýleným chromatinem pozorovatelným v malých shlucích především podél jaderného obalu. Některá jádra obsahovala dvě jadérka, z čehož vyplývá, že tyto buňky byly ve fázi dělení (telofáze). V oblastech jejich hojného výskytu byly pozorovány i buňky ve fázi metafáze (viz obr. 13B). Vzhledem k neostrým hranicím mezi cytoplazmou sousedících buněk nebylo možné změřit velikost celé buňky. Tyto buňky schopné proliferace byly v zárodku pozorovány ve větším množství především v oblasti ocásku, budoucího hlavového orgánu a v okolí penetračních žláz. Vzhledem k jejich schopnosti proliferace budou tyto buňky dále označovat jako buňky zárodečné, přestože jsou výrazně menší než zárodečné buňky předchozích stadií.

Toto vývojové stadium cercárie se základem ocásku lze již s jistotou rozlišit od vyvíjející se sporocysty, která ve vývojové fázi, kdy je přítomen tegument, obsahuje velké množství morfologicky odlišných zárodečných buněk a postrádá žlázy typické pro cercárii.

5.1.3.6. Stadium 6: cercárie s furkou

Stadium 6 je typické přítomností ocásku ve formě furky. U cercárie s furkou bylo pozorované velké množství zárodečných buněk především v této oblasti (viz obr. 13F, 13G).



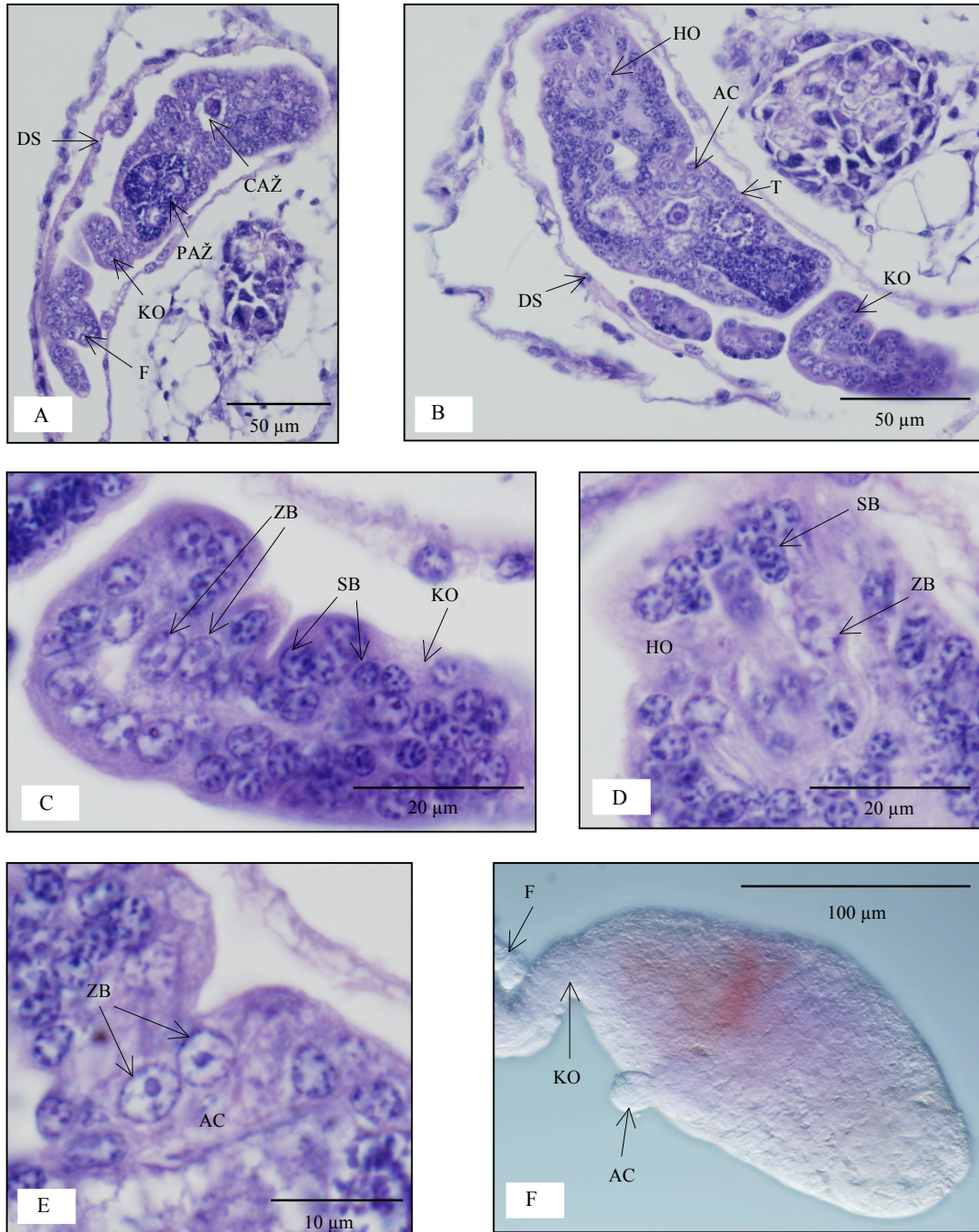
Obr. 13. Vývojová stadia cercárií. A – F – Stadium 5. G, H – Stadium 6. **A** – Cercárie se základem ocásku (stadium 5) (Mallory). **B** – Zárodečná buňka v metafázi. Měřitko 5 μm (Mallory). **C** – Penetrační žlázy a jejich vývody (stadium 5) (Mallory). **D** – Detail na penetrační žlázy a ocásek. V rámečku detail zárodečných buněk v ocásku (Mallory). **E** – Celé zárodky barvené acetokarmínem (stadia 4, 5 a 8). **F** – Cercárie s furkou (stadium 6). V rámečku vlevo nahoře detail na zárodečné buňky v ocásku, z nichž jedna je ve fázi dělení. V rámečku vpravo nahoře detail zárodečné buňky v metafázi (Mallory). **G** – Celý zárodek (stadium 6) barvený lithium-karminem. CAŽ – cirkumacetabulární žláza, CF – cercárie s furkou (stadium 6), CZO – cercárie se základem ocásku (stadium 5), DZB – dělicí se zárodečná buňka, F – furka, K – konstriktce, PAŽ – postacetabulární žláza, PZK – prodlužující se zárodečná koule, T – tegument, VPŽ – vývody penetračních žláz, ZB – zárodečná buňka, ZK – zárodečná koule, ZO – základ ocásku

5.1.3.7. Stadium 7: cercárie s kmenem ocásku

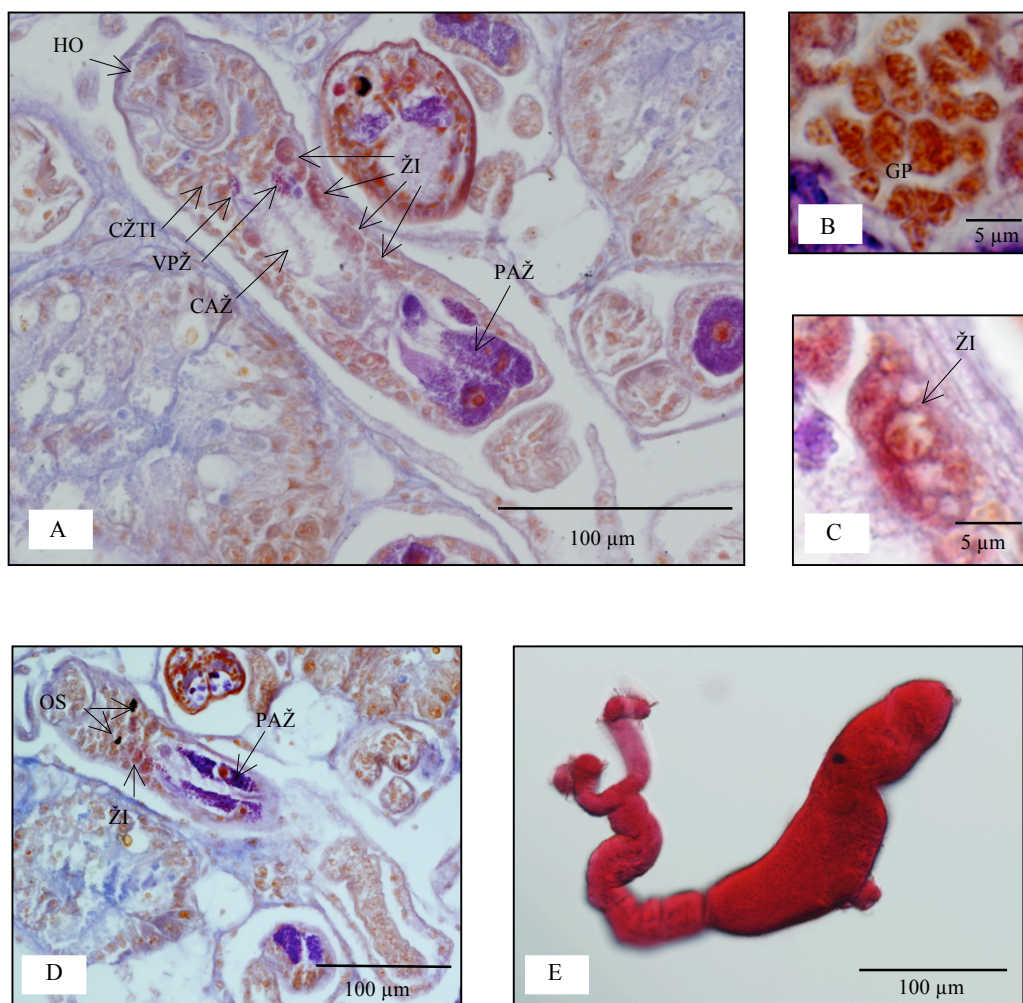
U stadia 7 byly na histologických řezech rozeznány tyto nově vzniklé struktury: kmen ocásku, acetabulum a hlavový orgán (viz obr. 14A–F). U tohoto stadia se již ocásek skládá z kmene a furky (viz obr. 14A). V hlavovém orgánu a acetabulu jsou již zřetelná jemná svalová vlákna (HaE – světle růžová, Mallory trichrom – světle modrá). Zárodečné buňky v tomto stadiu byly pozorovány v okolí penetračních žláz, acetabula a ve velkém množství v kmeni ocásku (především v proximální části kmene) (viz obr. 14C, 14D, 14E).

5.1.3.8. Stadium 8: Cercárie se žlázami typu I

U stadia 8 se již vytváří dvě oční skvrny složené ze shluků hnědých až černých granul (viz obr. 15A). Nově se v tomto zárodku objevuje další typ žláz, tzv. žlázy typu I (viz obr. 15A, 15C, 15D). Žlázy typu I jsou jednobuněčné žlázy nepravidelného tvaru. Jejich jádra morfologicky připomínají jádra penetračních žláz (velikost 4 - 5 μm) a jejich cytoplazma obsahuje jemná granula, jež se hematoxylinem barví jasně růžově a Malloryho trichromem červeně. Žlázy typu I jsou jednobuněčné žlázy (10–15 μm) vyskytující se v hojném počtu v oblasti mezi očními skvrnami a postacetabulárními žlázami. Za očními skvrnami jsou lokalizovány pod dorzální stěnou těla cercárie, poté se rozdělují do dvou větví, jež se na laterální straně těla stáčí ventrálně. Větve za acetabulem pokračují po ventrální straně až k postacetabulárním žlázám. V těchto žlázách se již objevují granula, v některých buňkách v malém množství a některé se již zdají naplněné. U zárodku nebyly pozorovány vývody žláz typu I.



Obr. 14. Cercárie s kmenem ocásku (stadium 7). **A, B** – Řez cercárií. Na obrázku A je rozeznatelný kmen a furka, na obrázku B hlavový orgán a acetabulum (HaE). **C** – Detail kmene ocásku se zárodečnými buňkami v bazi kmene (HaE). **D** – Detail hlavového orgánu (HaE). **E** – Detail acetabula (HaE). **F** – Celý červ barvený Malloryho trichromem. AC – acetabulum, CAŽ – cirkumacetabulární žláza, DS – dceřiná sporocysta, F – furka, HO – hlavový orgán, KO – kmen ocásku, PAŽ – postacetabulární žláza, SB – somatická buňka, T – tegument, ZB – zárodečná buňka,



Obr. 15. Cercárie se žlázami typu I (stadium 8). **A** – Průřez cercárií. Na řezu jsou vidět žlázy typu I podél cirkumacetavulárních žláz (Mallory). **B** – Genitální primordium (Mallory). **C** – Detail žlázy typu I (Mallory). **D** – Průřez cercárií. Na řezu jsou zřetelné oční skvrny a žlázy typu I v dorzální části těla cercárie (Mallory). **E** – Celý červ barvený acetokarminem. CAŽ – cirkumacetabulární žlázy, CŽI – cercárie se žlázami typu I, GP – genitální primordium, HO – hlavový orgán, OS – oční skvrna, PAŽ – postacetabulární žlázy, VPŽ - vývody penetračních žláz, ŽI – žlázy typu I

U cercárie se žlázami typu I bylo již pozorováno genitální primordium (viz obr. 15B) vyskytující se na ventrální straně cercárie posteriorně od acetabula. Genitální primordium je tvořeno shlukem nepravidelných tmavých buněk o velikosti 2,5–3 µm. Jejich jádro obsahuje velké shluky chromatinu a téměř nezřetelné jádro. Cytoplazmu těchto buněk nelze pod světelným mikroskopem rozlišit.

Jádra somatických buněk jsou již velmi heterogenní, přibývá buněčné cytoplazmy a mezi jednotlivými buňkami vznikají větší prostory. Buňky s jádrem typickým pro zárodečné buňky byly zachyceny v malém množství v hlavovém orgánu a ocásku.

5.1.3.9. Stadium 9: cercárie se žlázami typu II

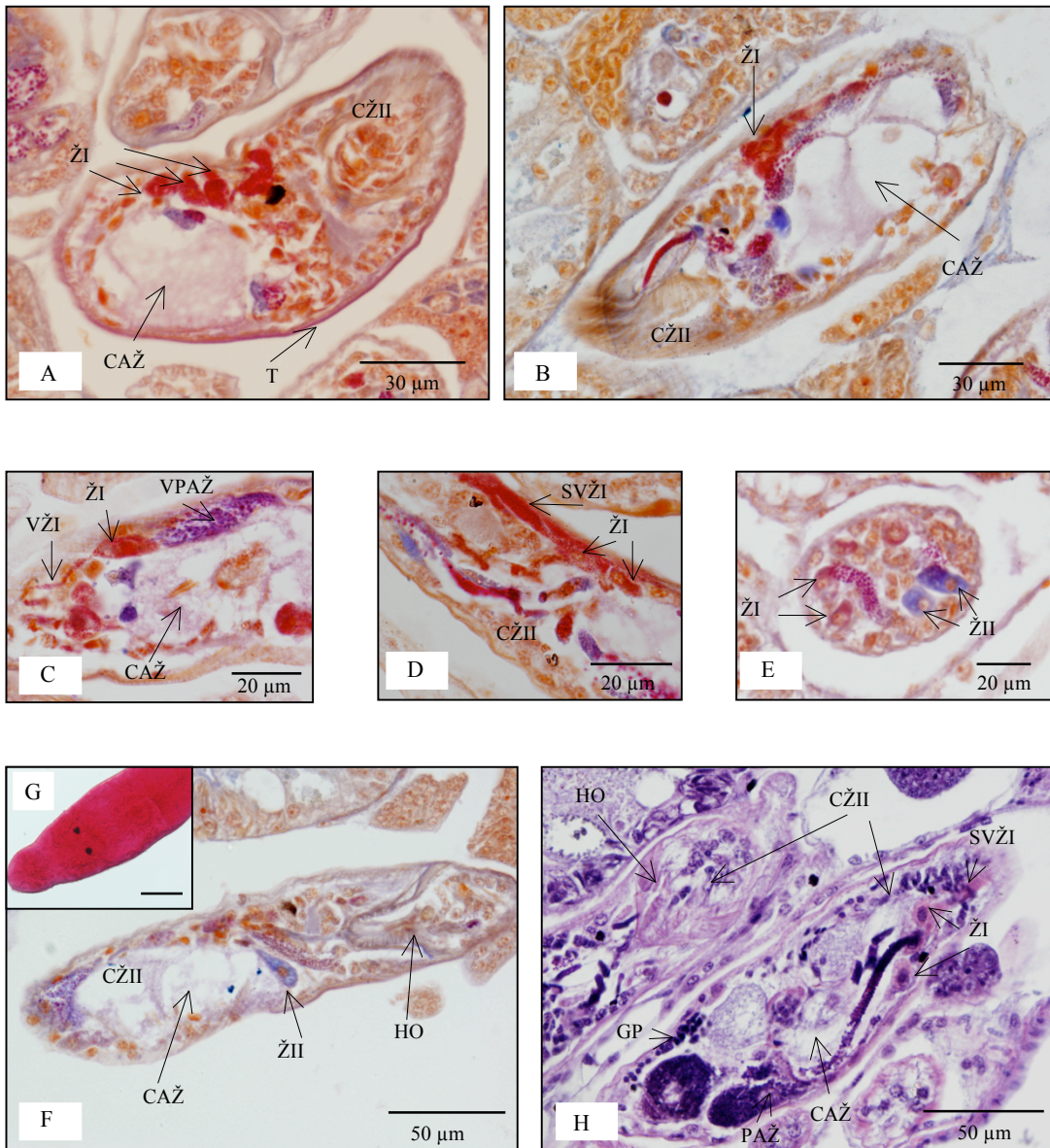
U stadia 9 se nově objevují žlázy typu II (viz obr. 16E, 16F). Jedná se o pár jednobuněčných žláz vyskytujících se na ventrální straně cercárie před cirkumacetabulárními žlázami. Tyto žlázy mají jádro (4–5 μm) morfologicky podobné ostatním typům žláz a jejich cytoplazma obsahuje jemná granula, jež se Malloryho trichromem barví světle modře. Jsou to protáhlé buňky o rozměrech 10x20 μm . Při barvení hematoxylinem a eosinem nebyly tyto žlázy zachyceny. Jejich vývody nebyly nalezeny.

Žlázy typu I jsou v tomto vývojovém stadiu mnohem výraznější a jejich vývody obsahují granula (viz obr. 16A, 16B, 16C). Vývody jsou tenké výběžky, jež se na obou stranách cercárie sbíhají do silných svazků vedoucích pod dorzální stěnou cercárie dopředu do hlavového orgánu (viz obr. 16D). Vývody nebyly v předchozím stadiu zachyceny. U cercárií, jejichž vývody jsou výrazně naplněny granuly, obsahují žlázy typu I menší množství granul.

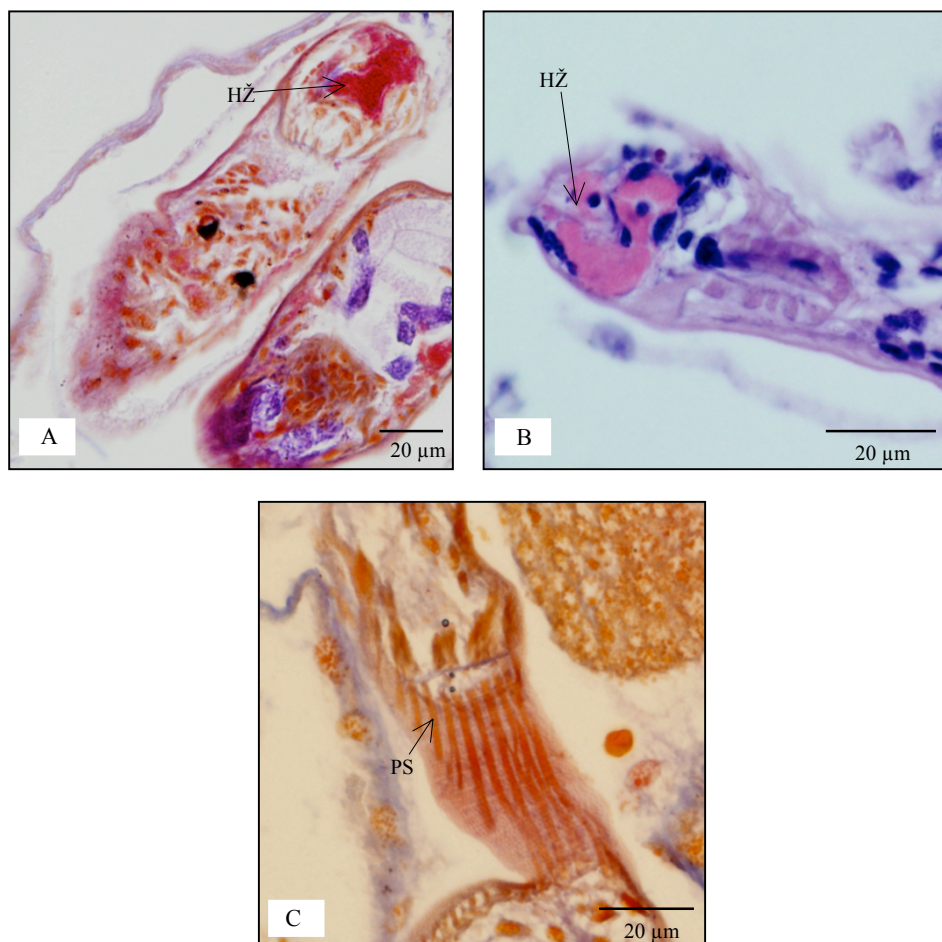
Svalovina se Malloryho trichromem barví hnědě a tegument modře až fialově. Hematoxylinem a eosinem se svalovina barví stejně jako u předchozích stadií světle růžově.

5.1.3.10. Stadium 10: cercárie s hlavovou žlázou

U stadia 10 se nově vyskytuje hlavová žláza, jež doposud během vývoje cercárie nebyla zaznamenána (viz obr. 17A, 17B). Hlavová žláza vyplňuje hlavový orgán. Její drobná granula se barví hematoxylinem a eosinem jasně růžově a Malloryho trichromem červeně.



Obr. 16. Cercárie se žlázami typu II (stadium 9). **A** - Žlázy typu I naplněné granuly v dorzální části cercárie (Mallory). **B** - Žlázy typu I podél cirkumacetabulárních žláz (Mallory). **C** - Tenké vývody žláz typu I (Mallory). **D** - Svazek vývodů žláz typu I (Mallory). **E** - Pár žláz typu II (Mallory). **F** - Žláza typu II lokalizovaná před cirkumacetabulárním žlázami (Mallory). **G** - Celá cercárie barvená acetokarmínem. Měřítko 50 μ m. **H** - Průřez cercárií. Na obrázku jsou vidět tři typy žláz a genitální primordium (HaE). CAŽ - cirkumacetabulární žláza, CŽII - cercárie se žlázami typu II (stadium 9), GP - genitální primordium, HO - hlavový orgán, PAŽ - postacetabulární žláza, SVŽI - svazek vývodů žláz typ, T - tegument, VŽI - vývod žláz typu I, ŽI - žláza typu I, ŽII - žláza typu II



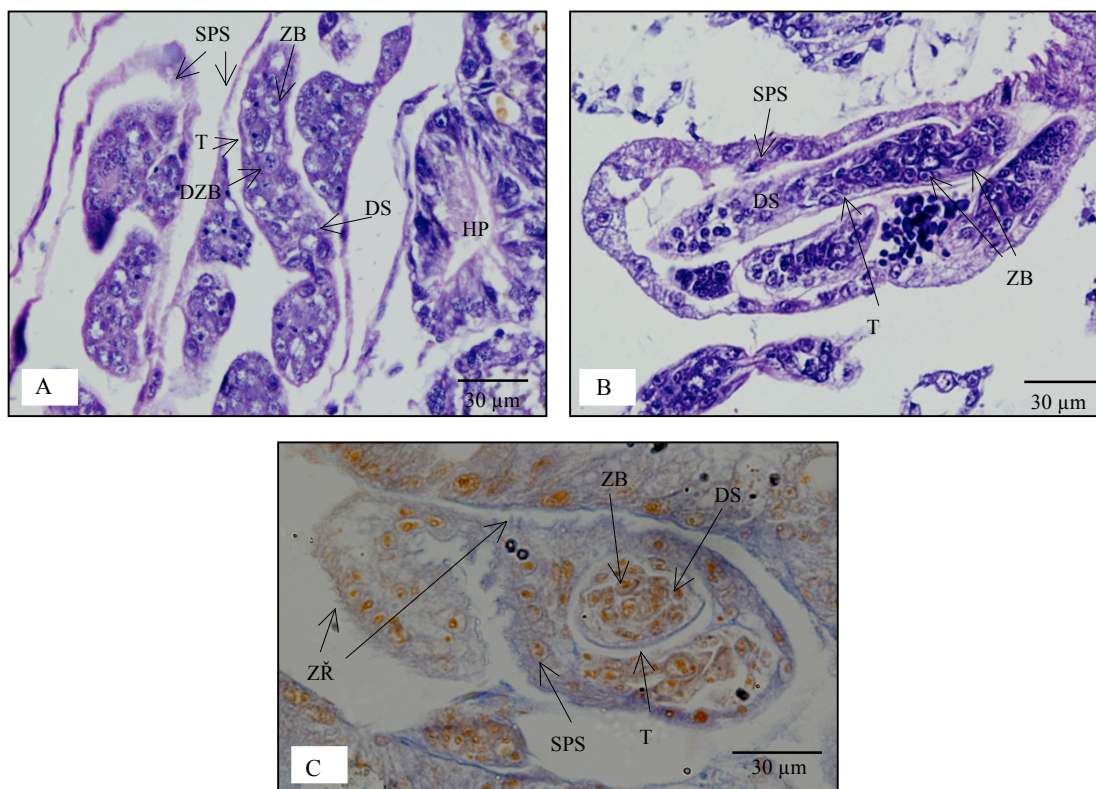
Obr. 17. Cerkárie s hlavovou žlázou (stadium 10). **A** – Hlavová žláza barvená hematoxylinem a eosinem. **B** – Hlavová žláza barvená Malloryho trichromem. **C** – Podpovrchová svalovina cercárie (Mallory). HŽ – hlavová žláza, PS – podélná svalovina

5.1.4. Atypická lokalizace sporocystogenních sporocyst

V hepatopankreatu plže byly nalezeny sporocystogenní sporocysty (jedna 20. den, jedna 25. den), jež se od cercáriogenních sporocyst lišily výrazně silnější stěnou a zřasením tělní stěny na povrchu přední části (viz obr. 18A–18C).

V dutině jedné sporocysty byly dvacátý den po infekci pozorovány dceřiné sporocysty s jasně rozeznatelným tegumentem a dutinou obsahující těsně nahloučené zárodečné buňky, z nichž velké množství bylo ve fázi dělení (viz obr. 18A).

Druhá sporocystogenní sporocysta obsahovala 25. den po infekci sporocysty, v nichž se vyskytovaly dceřiné sporocysty s rozptýlenými zárodečnými buňkami bez známek proliferace (viz obr. 18B).



Obr. 18. Sporocystogenní sporocysty v hepatopankreatu. **A** – Sporocysta 20. dpi obsahuje dceřiné sporocysty s již utvořeným tegumentem. Dutina dceřiných sporocysty obsahuje velké množství dělících se zárodečných buněk (HaE). **B** – Sporocysta 25. dpi obsahující dceřinou sporocystu. Dceřiná sporocysta je kryta tegumentem a v její dutině jsou lokalizovány zárodečné buňky (HaE). **C** – Sporocysta 25. dpi obsahující dceřinou sporocystu. Na povrchu jsou viditelné trnovité výběžky (Mallory). DS – dceřiná sporocysta, DZB – dělící se zárodečná buňka, HP – hepatopankreas, SPS – sporocystogenní sporocysta, T – tegument, ZR- zřasení stěny sporocysty, ZB – zárodečná buňka

5.2. Značení celých červů

5.2.1. Použití histologických barviv na celé cercárie

Pro komplexnější představu o vyvíjejících se zárodcích cercáriích pozorovaných na řezech a o žlázách typu I a II (viz kapitola 5.1.3) byly barveny také celé zárodky cercárií, a to apomorfinem, acetokarmínem, lithium-karmínem, Malloryho trichromem a kombinací neutrální červeně a nilské modři, přičemž byly pozorovány zárodky od zárodečné koule až po cercárii se žlázami typu II (vývody žláz typu I). Při pozorování celých červů bylo zachyceno acetabulum již u cercárie se základem ocásku.

Celí červi byli ke stádiím cercárií pozorovaných na histologických řezech přiřazováni podle následujících pozorovaných struktur: prodlužování těla zárodka, vytvořený základ ocásku, furka, kmen ocásku, oční skvrny, žlázy typu I, vývody žláz typu I (viz tabulka č. 6). Vývody žláz typu I byly na histologických řezech poprvé pozorovány ve stadiu, kdy

se nově objevily žlázy typu II. Vzhledem k tomu, že žlázy typu II se na celých červech nepodařilo označit, byly k odlišení stadií cercárií použity vývody žláz typu I. Použité histologické barvení zvýraznilo struktury vyvíjejících se celých červů takto (viz tabulka č.7):

Apomorfin barvil postacetabulární žlázy cercárií zeleně a cirkumacetabulární hnědě (viz obr. 19G). Nebarvil však žlázy typu I ani typu II. Barvení apomorfinem se neosvědčilo k pozorování vývoje cercárií, neboť se žlázy mladých cercárií barvily velmi slabě.

Acetokarmín nebarvil žádný druh žláz. Při tomto barvení však vynikly žlázy typu I. Toto barvení bylo vhodné k odlišení stadií se žlázami typu I (viz obr. 19A) a vývody žláz typu I.

Při barvení cercárií **lithium-karmínem** se obarvily červeně postacetabulární žlázy. Barvením lithium-karmínem bylo možné zachytit vyvíjející se postacetabulární žlázy již u cercárie se základem ocásku, kdy byly tyto žlázy poprvé zachyceny i na histologických řezech (viz obr. 19C, 19D).

Malloryho trichrom barvil žlázy variabilně podle vývoje cercárie (viz obr. 19E, 19F). V časných fázích vývoje se penetrační žlázy barvily pouze červeně. Později se postacetabulární žlázy barvily žlutě a cirkumacetabulární nejprve do oranžova a později červeně až růžově. Granula žláz typu I se buď nebarvila vůbec nebo jen velmi slabě do růžova až červena. Žlázy typu II se nepodařilo obarvit.

Kombinace barvení **neutrální červení a nilskou modří** barvilo postacetabulární žlázy červeně. Žlázy typu I ani typu II se nepodařilo označit.

Tabulka č. 6. Vývojová stadia cercárií

	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9
Prodlužování těla	0	X	X	X	X	X	X
Ocásek	0	0	X	X	X	X	X
Acetabulum	0	0	X	X	X	X	X
Furka	0	0	0	X	X	X	X
Kmen ocásku	0	0	0	0	X	X	X
Žlázy typu I	0	0	0	0	0	X	X
Oční skvrny	0	0	0	0	0	X	X
Vývody žláz typu I	0	0	0	0	0	0	X

0 - struktura nezachycena

St. - stadium

X - struktura zachycena

Tabulka č. 8. Barvení žláz

	Apomorfin	Lithium-karmín	Acetokarmín	Malloryho trichrom	Neutrální červeň + nilská modř
CA žlázy	+++	-	-	+++	-
PA žlázy	+++	+++	+	+++	++
Žlázy typu I	-	-	++	-	-
Vývody žláz typu I	-	-	+	+	-
Žlázy typu II	-	-	-	-	-

- struktura neoznačena

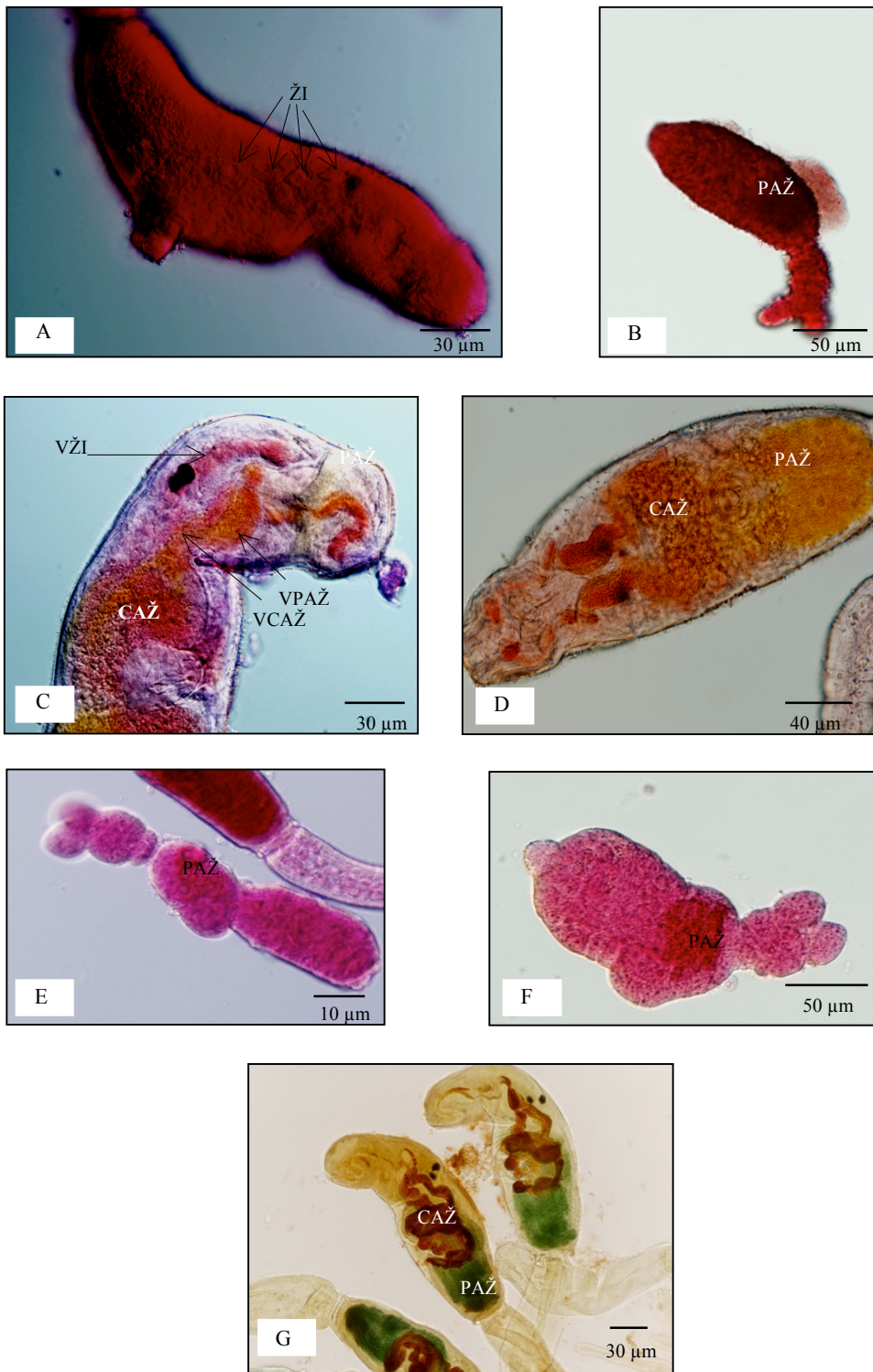
+ struktura označena velmi slabě

++ struktura označena

středně

+++ struktura označena

silně



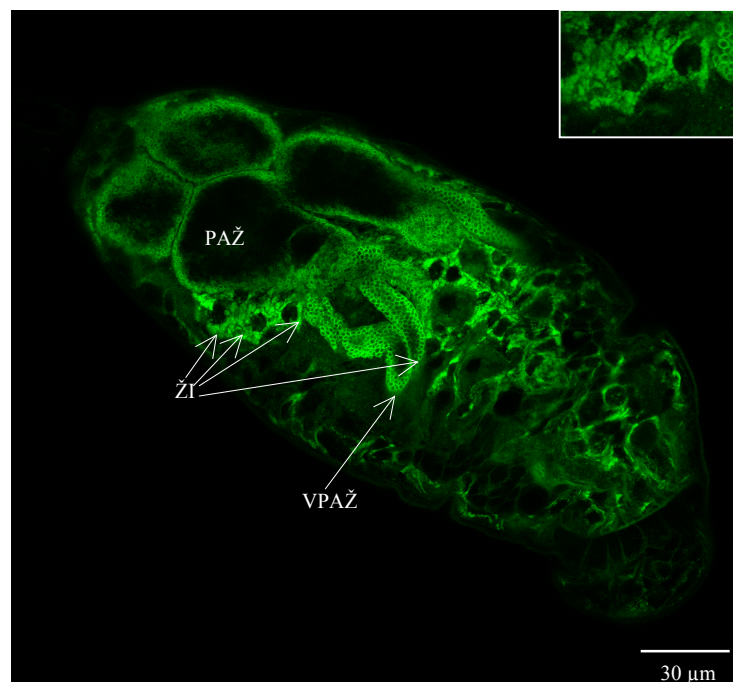
Obr. 19. Žlázy cercárií. **A** – Cercárie se žlázami typu I (acetokarmín). **B** – Cercárie se základem ocásku (acetokarmín). **C** – Cercárie s vývody žláz typu I (Mallory trichrom). **D** – Mladá cercárie (Mallory trichrom). **E, F** – Cercárie s furkou (lithium-karmín). **G** – Zralá cercárie (apomorfín). CAŽ – cirkumacetabulární žlázy. PAŽ – postacetabulární žlázy, VCAŽ – vývody žláz typu I, VPAŽ – vývody postacetabulárních žláz, VŽI – vývody žláz typu I, ŽI – žlázy typu I

5.2.2. Fluorescenční značení

5.2.2.1. Značení žláz lektiny

K získání komplexnější představy o žlázách typu I a typu II popisovaných v kapitole 5.1.3. byly tyto žlázy značeny pomocí lektinů PNA, WGA a RCA. Z těchto použitých lektinů pouze lektin WGA označil žlázy typu I. Žlázy typu II se nepodařilo označit.

Lektin WGA se vázal na granula postacetabulárních žláz, subtegumentálních buněk a žláz typu I, přičemž tyto četné jednobuněčné žlázy ve fázi, kdy byly naplněny granuly, vynikaly na pozadí ostatních sekrečních buněk. Od těchto buněk se odlišovaly také velikostí granul. Pomocí tohoto značení bylo prokázáno, že se tyto žlázy vyskytují pod dorzální stěnou cercárie za očními skvrnami, poté se rozdělují do dvou větví a každá větev pak směřuje po laterálních stranách ventrálně do zadní části cercárie a dosahují až pod postacetabulární žlázy. Žlázy typu I mají množství výběžků, jež směřují k sousedním žlázovým buňkám.



Obr. 20. Značení žláz typu I pomocí lektinu WGA. V rámečku detail žlázových buněk. PAŽ – postacetabulární žlázy, VPAŽ – vývody postacetabulárních žláz, ŽI – žlázy typu I

5.2.2.2. Vývoj svalové soustavy cercárií

Pomocí značení faloidinem, jež se vyskytuje ve velké koncentraci ve svalových vláknech, byla značena svalová soustava cercárií.

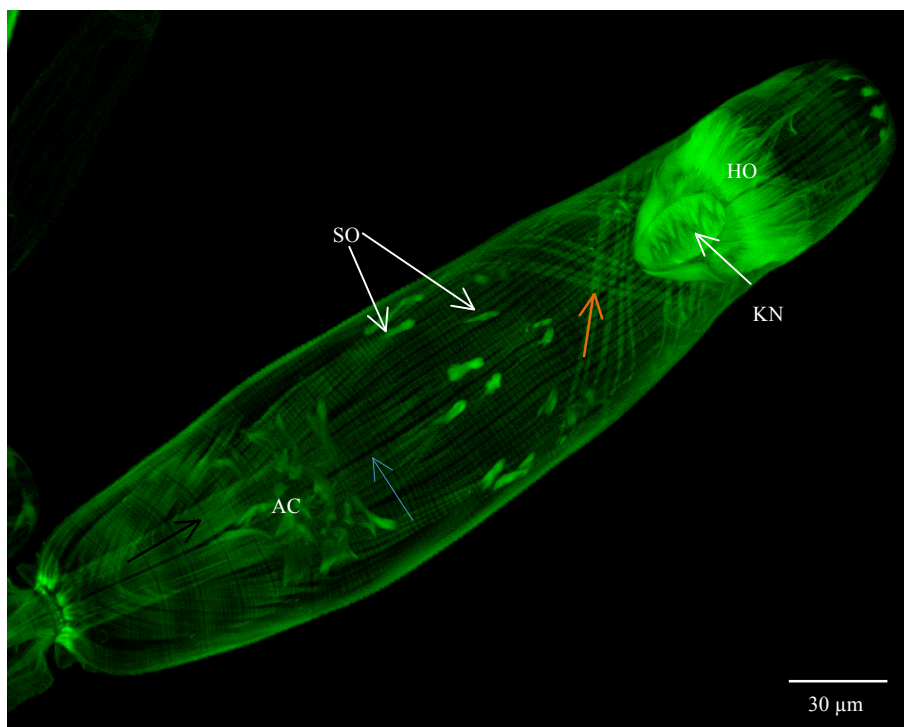
Faloidinem se podařilo označit svalovinu na řezech JB-4 i na celých červech. Značení svaloviny na parafinových řezech bylo neúspěšné. Ke sledování vývoje svaloviny nakonec bylo zvoleno pro lepší orientaci a ucelenou představu o svalové soustavě jednotlivých vývojových stadií značení celých červů.

Svalová soustava zralé cercárie se skládá ze subtegumentální svaloviny, svaloviny hlavového orgánu, přísavky a vnitřních orgánů, přičemž se vyskytuje i podél vývodů penetračních žláz.

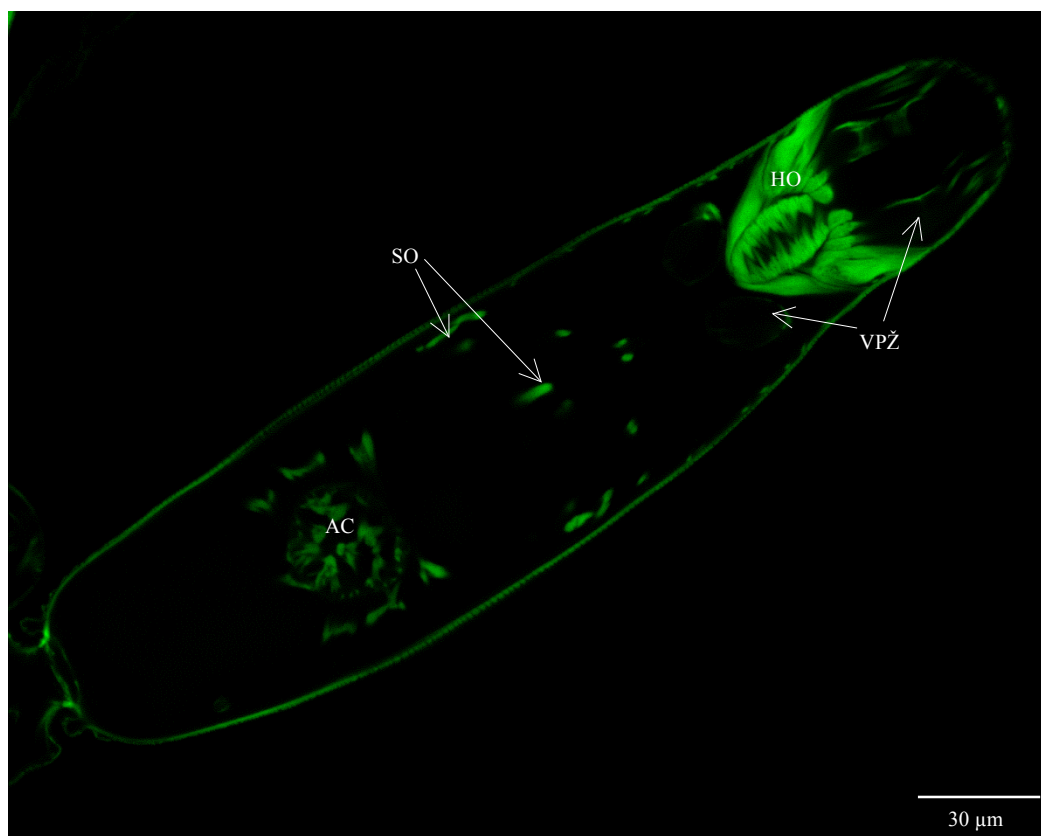
Subtegumentální svalovinu tvoří vnější vrstva okružní svaloviny, pod níž se nachází podélná svalovina a pod podélnou svalovinou se v přední třetině těla vyskytuje šikmá svalovina. Svalová vlákna šikmé svaloviny v párech směřují z jedné strany cercárie na druhou a navzájem se tak tyto páry kříží (viz obr. 21, 22).

Svalovina byla poprvé pomocí značení faloidinem zaznamenána u zárodku se základem ocásku s náznakem furky. U tohoto zárodku bylo pozorováno několik velmi jemných slabě značených vláken okružní a podélné svaloviny a již se vyvíjela i svalovina hlavového orgánu.

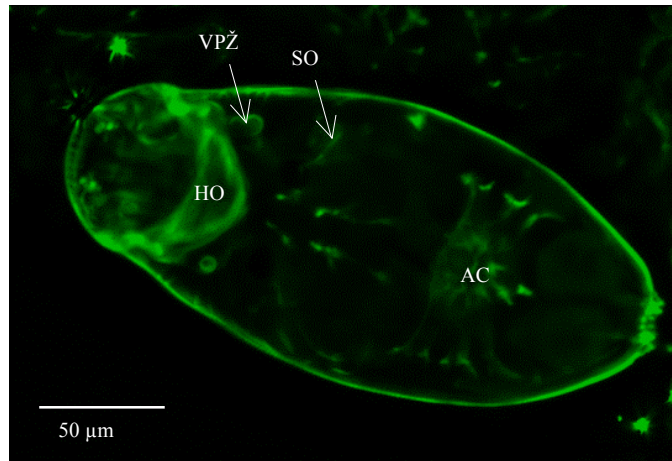
Vyvíjející se svalovina acetabula byla pozorována až u zárodku, u něž se mimo furky vyskytoval i kmen ocásku. Svalovina penetračních žláz a vnitřních orgánů byla zaznamenána u cercárií, u nichž byly přítomny oční skvrny (viz obr. 23).



Obr. 21. Svalová soustava cercárie značená faloidinem. Na obrázku je vidět subtegumentální svalovina, hlavový orgán, acetabulum, uchycené k tělní stěně svalovými vlákny, a svalovina vnitřních orgánů. AC – acetabulum, HO - hlavový orgán, KN – konus hlavového orgánu, SO – svalovina vnitřních orgánů, modrá šipka – okružní svalovina, černá šipka – podélná svalovina, oranžová šipka – šikmá svalovina.



Obr. 22. Svalovina zralé cercárie. Na obrázku je vidět hlavový orgán, acetabulum a vývody penetračních žláz. AC – acetabulum, HO – hlavový orgán, SO – svalovina vnitřních orgánů, VPŽ – vývody penetračních žláz



Obr. 23. Vývoj svaloviny. Mladá cercárie s již vytvořenou svalovinou vnitřních orgánů a vývodů penetračních žláz. AC – acetabulum, HO – hlavový orgán, OS – okružní svalovina, PS – podélná svalovina, SO – svalovina vnitřních orgánů, VPŽ – vývody penetračních žláz

5.2.2.3. Vývoj vylučovací soustavy

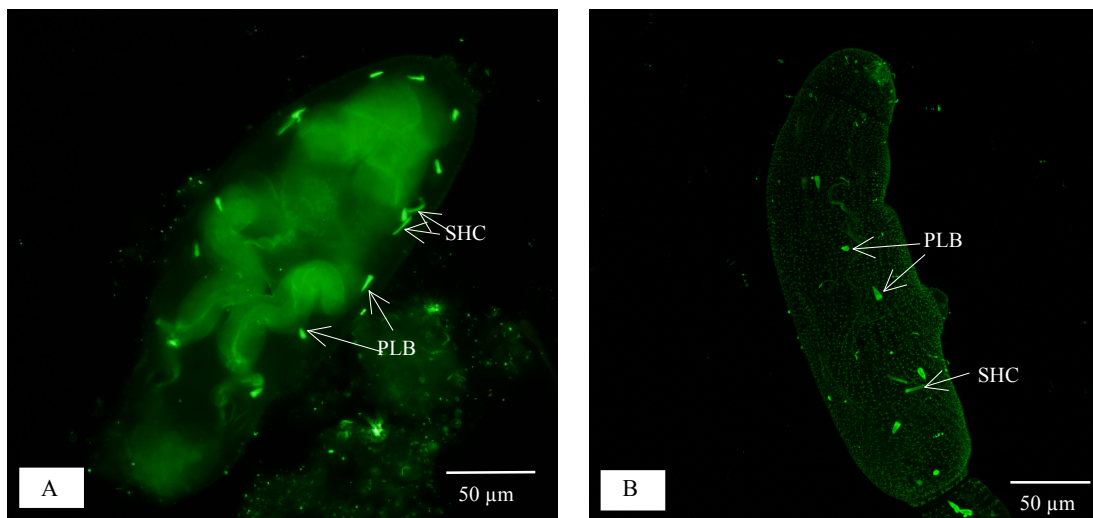
Pomocí značení protilátkami proti α -tubulinu, jenž se vyskytuje ve velké koncentraci v cíliích plaménkových buněk a v části hlavních sběrných kanálků, byl pozorován vývoj vylučovací soustavy cercárií. Kromě vylučovací soustavy se tyto protilátky ve velké míře vázaly na vývody penetračních žláz a senzorické cílie na povrchu cercárií.

Protilátky byly nejprve aplikovány na řezy hepatopankreatem nakaženého plže zalitého v pryskyřici JB-4 nebo v parafínu, a dále na celé červy. Protilátky značily α -tubulin u celých červů i na parafinových řezech. Na řezech tkání zamontovaných do JB-4 bylo značení neúspěšné. Pro lepší orientaci a komplexní představu o vylučovací soustavě bylo nakonec zvoleno jako optimální značení celých červů.

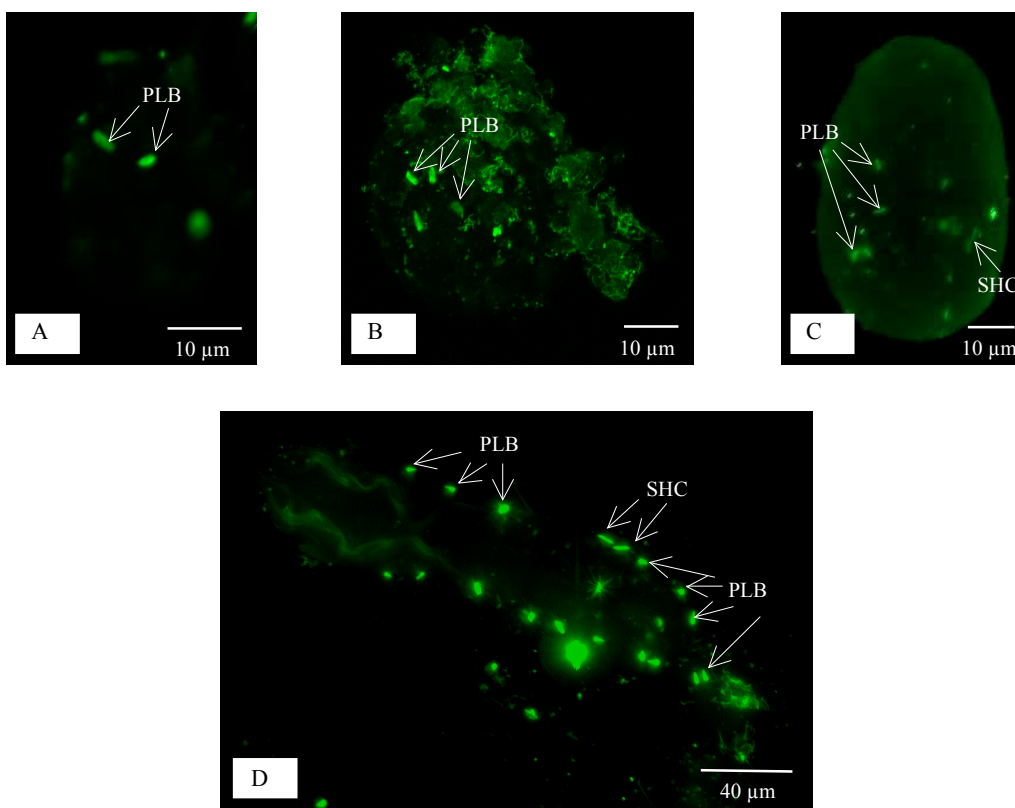
Vylučovací soustava cercárií obsahuje šest párů plaménkových buněk lokalizovaných v těle a jeden pár v ocásku. Oba hlavní sběrné kanálky se vyznačují přítomností dvou párů shluků cílií (24 A, B).

První plaménkové buňky se během vývoje vyskytují již ve stadiu zárodečných koulí (25A, 25B). Byly pozorovány zárodečné koule s jedním a se dvěma páry plaménkových buněk. Během prodlužování zárodečné koule plaménkové buňky přibývaly a objevily se shluky cílií v hlavních vývodných kanálcích (25C). Plaménkové buňky byly pozorované buď samostatně nebo v páru. U zárodku s ocáskem složeným z kmene a furky již bylo všech sedm párů plaménkových buněk a dva páry shluků cílií ve vývodných kanálcích (25D). Šest párů plaménkových buněk se vyskytovalo v těle cercárie a jeden pár v ocásku.

Toto rozložení cílií vylučovací soustavy již bylo během vývoje cercárie stálé a odpovídalo výskytu u vyvinutých cercárií.



Obr. 24. Vylučovací soustava cercárií. Na obrázkách je vidět šest párů plaménkových buněk v těle cercárie, jeden pár v ocásku a dva páry shluků cílií ve sběrných kanálcích. **A, B** – Plaménkové buňky a shluky cílií vývodných kanálků cercárie. PLB – plaménková buňka, SHC – shluk cílií hlavního kanálku

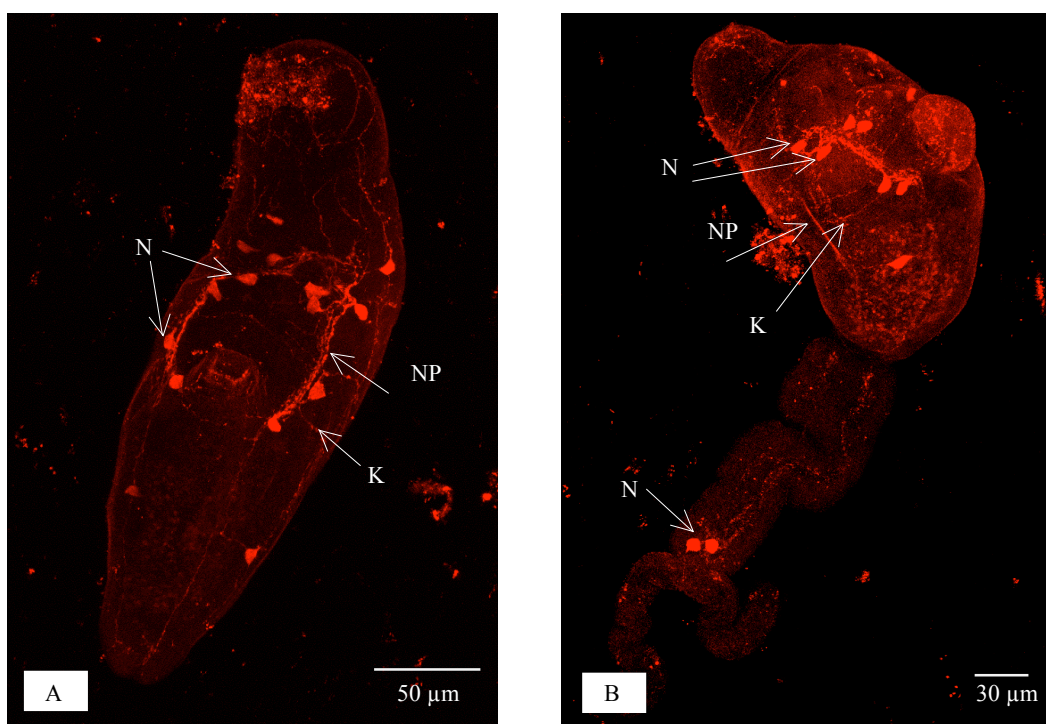


Obr. 25. Vývoj vylučovací soustavy. **A** – Zárodečná koule s jedním párem plaménkových buněk. **B** – Zárodečná koule s dvěma páry plaménkových buněk. **C** – Prodlužující se zárodečná koule. **D** – Cercárie s ocáskem složeným z kmene a furky. PLB – plaménková buňka, SHC – shluk cílií hlavního vylučovacího kanálku

5.2.2.4. Vývoj nervové soustavy

Pomocí protilátek proti serotoninu, jenž se vyskytuje v nervových buňkách, byla značena nervová soustava cercárií. Protilátky byly nejprve aplikovány na řezy hepatopankreatem nakaženého plže zalitého v pryskyřici JB-4 a v parafínu, a dále na celé červy. Protilátky značily nervovou soustavu u celých červů i na parafinových řezech. Na řezech tkání zamontovaných do JB-4 bylo značení neúspěšné. Pro lepší orientaci a komplexní představu o nervové soustavě cercárií bylo nakonec zvoleno jako optimální značení celých červů. Z důvodu nedostatku materiálu však byla zachycena až stadia s přítomnými očními skvrnami.

Nervová soustava cercárií se skládá z 8 párů neuronů v těle cercárie, z jednoho páru v ocásku a z nervových provazců, jež jsou spojeny pomocí komisur (viz obr. 26A). Nervová soustava byla během vývoje poprvé zachycena u cercárií s očními skvrnami, přičemž se již skládala z neuronů, nervových provazců i komisur. Byla již rozeznatelná i nervová vlákna v acetabulu. Počet neuronů se však u různých zárodků lišil dle vývoje (viz obr. 26B), přičemž nejmenší zárodek, u něž byla zachycena nervová soustava, měřil 180 μm a obsahoval šest párů neuronů, z čehož jeden se vyskytoval v ocásku. U cercárie o velikosti 230 μm bylo pozorováno již 8 párů neuronů a u cercárie o velikosti 280 μm 9 párů.



Obr. 26. Nervová soustava cercárie. **A** – Nervová soustava dospělé cercárie. **B** – Nervová soustava mladé cercárie. K – komisure, N – neuron, NP – nervový provazec

5.2.2.5. Značení zárodečných buněk

K označení zárodečných buněk byly použity protilátky proti vasa-like proteinu, jenž je přítomný v zárodečné linii buněk živočichů a v zárodečných (kmenových) buňkách kmene Platyhelminthes. Protilátky byly aplikovány na řezy hepatopankreatem zalitého v parafínu, na kryorezy a dále na celé červy. Značení na řezech tkání zalitých v pryskyřici JB-4, vzhledem k předchozím neúspěchům se značením jinými typy protilátek na této pryskyřici, nebylo prováděno. Značení vasa-like proteinu na řezech i na celých červech bylo neúspěšné.

5.3. Elektronová mikroskopie

5.3.1. Struktura stěny dceřině sporocysty

Ke spolehlivému rozlišení buněk sporocysty od samostatných zárodečných buněk a ke sledování původu struktur vyskytujících se na povrchu zárodků cercárií bylo nejprve potřeba popsat jednotlivé buněčné typy lokalizované ve stěně sporocysty.

Stěna dceřině sporocysty se skládá z tegumentu s mikrovily, svaloviny a buněk, jejichž cytoplazmatické výběžky tvoří podstatnou část stěny sporocysty, přičemž podpovrchovou vrstvu svaloviny tvoří tenká, široce rozestoupená vlákna okružní a podélné svaloviny (viz obr. 27A).

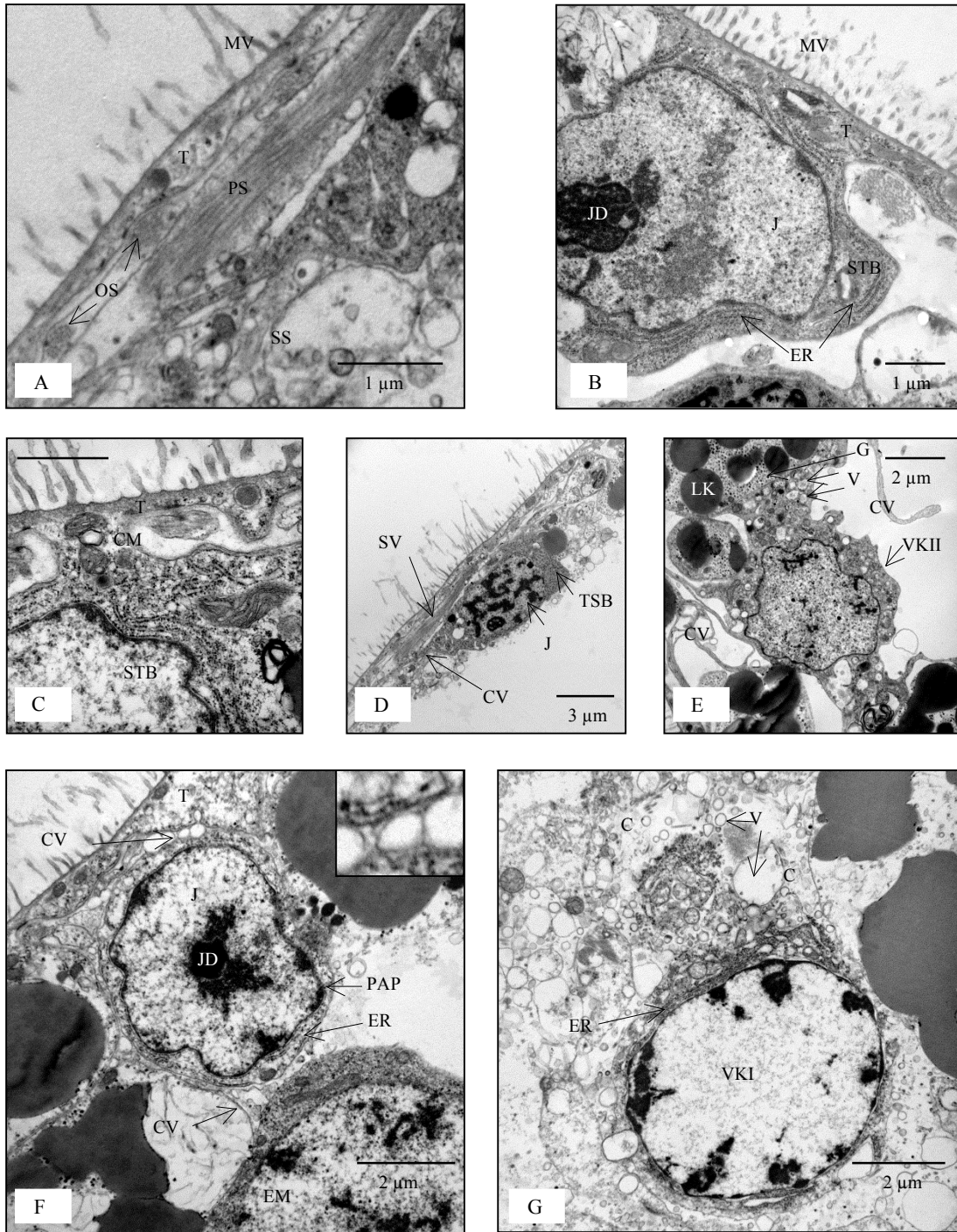
Ve stěně dceřině sporocysty bylo pozorováno pět typů buněk: subtegumentální buňky, svalové buňky, paprscíté buňky a vakuolizované buňky typu I a II.

Prvním typem jsou **subtegumentální buňky**. Tyto buňky jsou 9–10 μm velké a obsahují velké nepravidelné jádro (6–7 μm) s výrazným jadérkem a malým množstvím velkých shluků chromatinu. Tyto buňky jsou charakteristické svou cytoplazmou vyplněnou drsným endoplazmatickým retikulem. V cytoplazmě některých subtegumentálních buněk jsou lokalizovány lipidové kapénky. Tyto buňky tvoří vnější syncytiální vrstvu tegumentu buď rozšířením svého buněčného těla (viz obr. 29B) nebo jsou se syncytiem spojeny pomocí cytoplazmatických výběžků (cytoplazmatické můstky) (viz obr. 27C).

Svalové buňky se nacházejí pod tegumentálním syncytiem. Velikost těla této buňky byla 7,5 μm a velikost jádra 4,7 μm , přičemž jádro obsahovalo četné velké shluky chromatinu a malé jadérko. Tělo buňky se zužovalo do cytoplazmatických výběžků vedoucích pod tegumentem (viz obr. 27D). Cytoplazmatické výběžky svalových buněk obsahují myofibrily.

Paprsčité buňky (5–5,5 μm) obsahují malé jádro (4–4,5 μm) s drobným jádérkem a malým počtem velkých shluků chromatinu především v blízkosti jádérka a jaderného obalu. Jádro obaluje malé množství cytoplazmy obsahující množství endoplazmatického retikula a volných ribozomů. Na povrchu se vyskytují úzké cytoplazmatické výběžky, jimiž jsou tyto buňky propojeny s okolními buňkami sporocysty (viz obr. 27F).

Vakuolizované buňky typu I mají podobné jádro jako paprsčité buňky. Jejich jádro je obklopeno tenkou vrstvou drsného endoplazmatického retikula a jejich cytoplazma tvoří rozsáhlou síť cytoplazmatických výběžků naplněnou vakuolami a obsahující ve své cytoplazmě lipidové kapénky (viz obr. 27G).



Obr. 27. Struktura tělní stěny dceřiné sporocysty. **A** – Stavba tělní stěny. Na obrázku lze rozlišit tegument, okružní a podélnou svalovinu a vnitřní vrstvu stěny tvořenou především cytoplazmatickými výběžky buněk sporocysty. **B, C** – Subtegumentální buňka. Měřítko 1 μm . **D** – Tělo svalové buňky. **E** – Strukturní buňka typu III. **F** – Strukturní buňka typu I. V rámečku detail cytoplazmatických spojů. **G** – Strukturní buňka typu II. C – cytoplazma, CM – cytoplazmatický můstek, CV – cytoplazmatický výběžek, EM – embryo, ER – endoplazmatické retikulum, G – granula, LK – lipidová kapénka, J – jádro, JD – jadérko, MV – mikrovily, OP – okružní svalovina, PS – podélná svalovina, SS – stěna sporocysty, STB – subtegumentální buňka, PAP – paprscitá buňka, SV – svalové vlákno, T – tegument, TSB – tělo svalové buňky, V – vakuola, VKI – vakuolová buňka I, VKII – vakuolová buňka II

Vakuolizované buňky typu II obsahují nepravidelné jádro (4,5–5 μm) s rozptýleným chromatinem a v cytoplazmě se vyskytuje velké množství volných ribozomů, mitochondrií a vakuol. Tato buňka vytváří cytoplazmatické výběžky, jenž jsou v kontaktu s dalšími typy buněk (viz obr. 27E).

Cytoplazmatické výběžky vakuolizovaných buněk typu I a II tvoří podstatnou část stěny sporocysty vyběhající i do dutiny sporocysty (viz obr. 29 A).

5.3.2. Diferenciace zárodečných buněk, vývoj cercárií a jejich povrchu

V dutině dceřiné sporocysty byla nalezena jedna **zárodečná buňka** a to ve fázi dělení (telofáze) (viz obr. 28 A–D). Tato buňka měřila 10,7 μm a obsahovala jádro (7,8 μm) se dvěma jádérky a rozptýleným chromatinem tvořícím pouze malé množství velmi drobných shluků. V cytoplazmě se vyskytovalo velké množství volných ribozomů, výrazný Golgiho komplex (viz obr. 28D) a shluk elektrodenzního materiálu zvaného „nuage“ (viz obr. 28A, B). Mnohobuněčné zárodky byly tvořeny zárodečnými buňkami a somatickými buňkami, přičemž somatické buňky obsahovaly jádro s velkými shluky chromatinu a nevýrazným jádérkem (viz obr. 28 A, B). Zárodečné buňky byly během časně embryogeneze morfologicky téměř neodlišitelné od samostatné zárodečné buňky. U těchto buněk však nebyl pozorován výrazný Golgiho komplex a „nuage“. „Nuage“ (struktura typická pro linii zárodečných buněk živočichů) bylo pozorováno pouze v jedné dělící se zárodečné buňce u prodlužující se zárodečné koule, přestože v tomto zárodku bylo velké množství zárodečných buněk (viz obr. 28A, B). Ve stadiu zárodečných koulí a prodlužujících se zárodečných koulí se objevovaly v zárodcích kulaté elektron-denzní objekty – pyknotická tělíška.

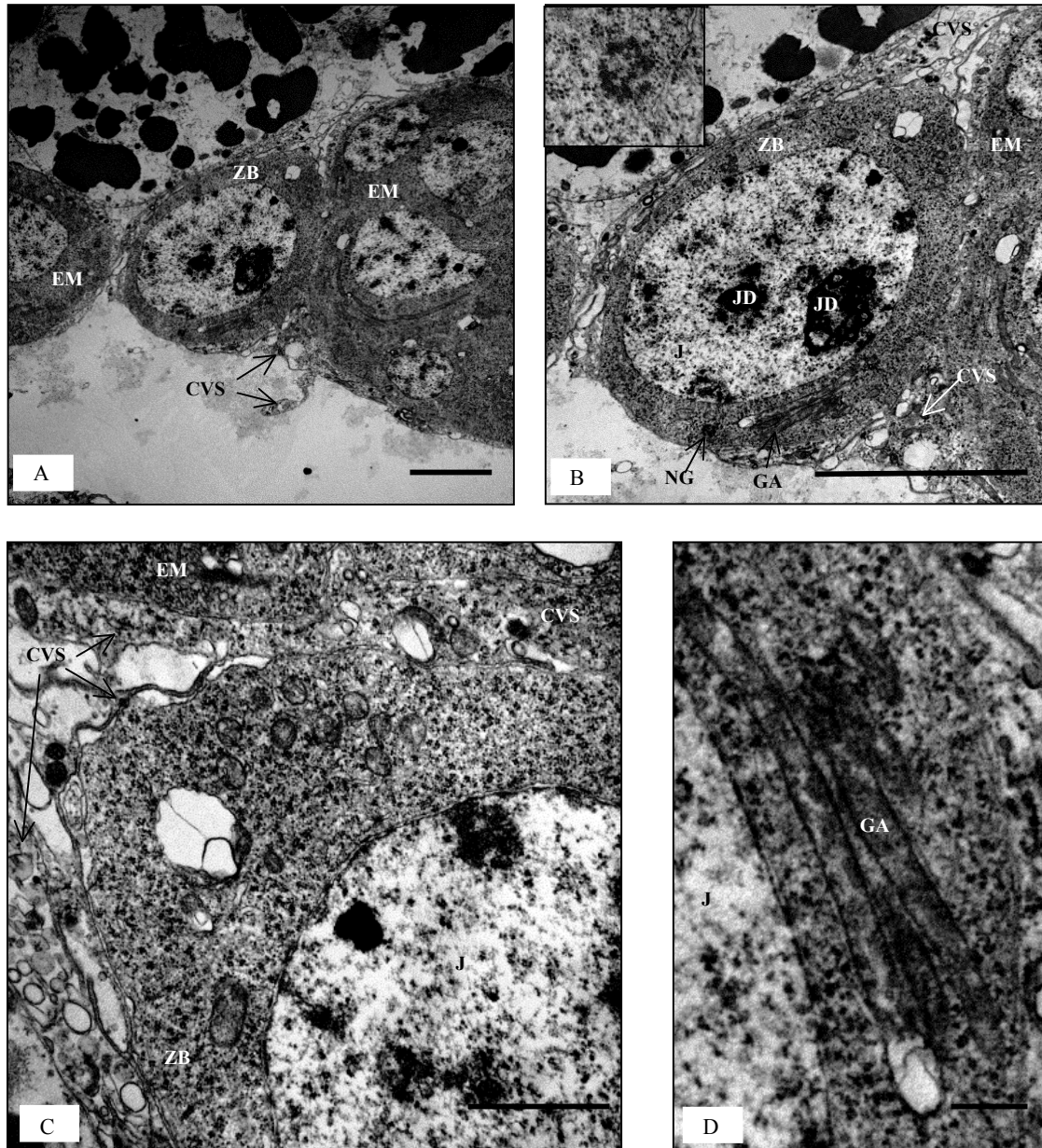
Zárodečná buňka a vyvíjející se embrya cercárií byla uchycena spolu s pokročilejšími vývojovými stadii cercárií v síti cytoplazmatických výběžků buněk sporocysty, přičemž tyto výběžky ji oddělovaly od sousedních embryí (viz obr. 28C). Cytoplazmatické výběžky sporocysty obsahovaly velké množství vakuol a mitochondrií. Byly však pozorovány i cytoplazmatické spoje mezi buňkou embrya a paprscitou buňkou (viz obr. 27F). Takové spoje se však vyskytovaly při těsném kontaktu zárodku se stěnou sporocysty.

U vývojově pokročilejších stadií cercárií byly pozorovány dva obaly na povrchu embryí (viz obr. 30A, B). Svrchní vrstvu tvořily cytoplazmatické výběžky buněk sporocyst a pod nimi se nacházela vrstva primitivního epitelu obsahující plochá jádra s výrazným

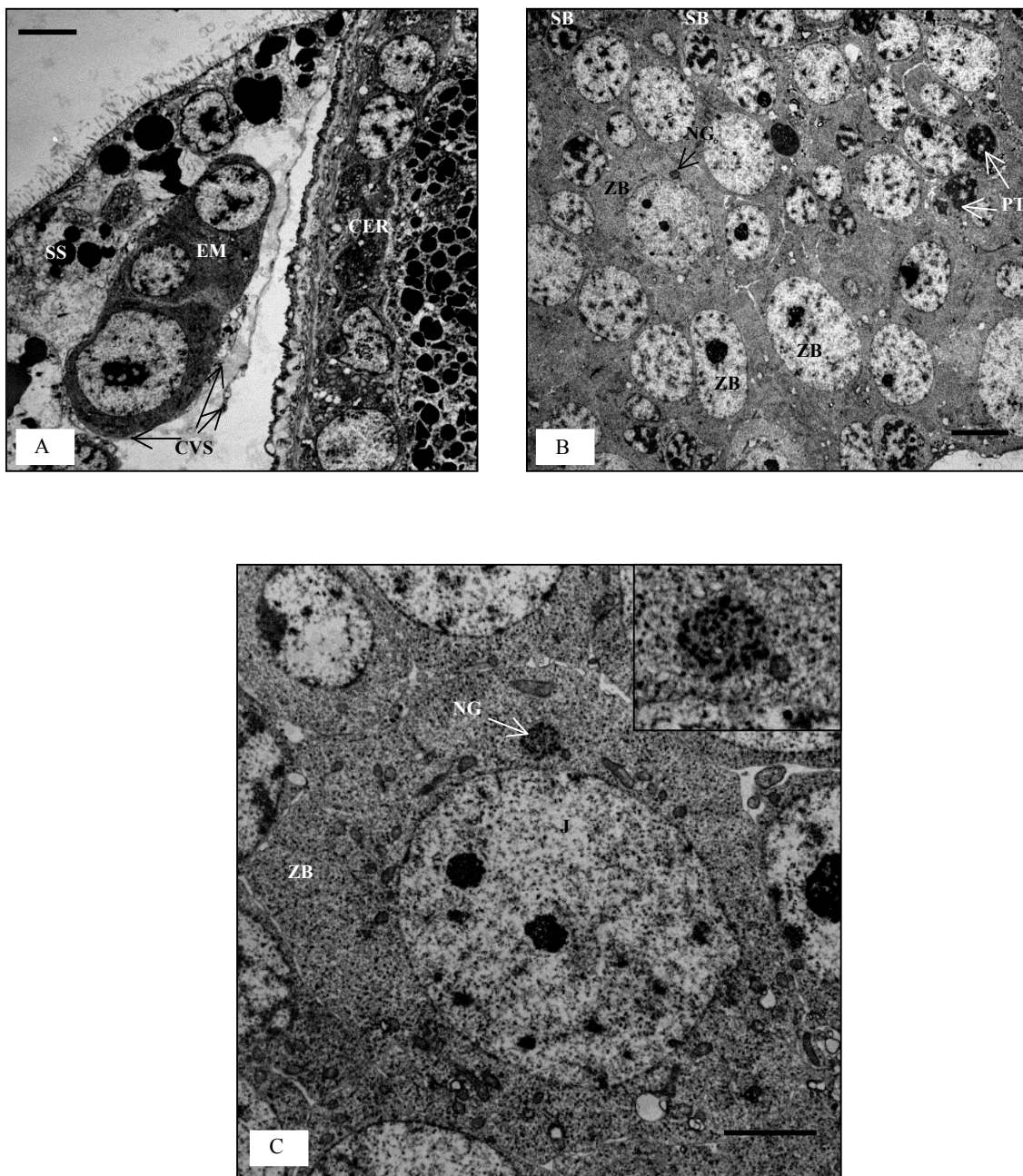
jadérkem a rozptýleným chromatinem. V cytoplazmě primitivního epitelu bylo pozorováno velké množství mitochondrií a volných ribozomů (30B).

Později se pod vrstvou primitivního epitelu vytvořil tegument a primitivní epitel byl odloučen. U mladé cercárie byla již pod vrstvou tegumentu bazální lamina a vyvíjející se okružní a podélná svalovina, přičemž v tegumentu se již objevovaly trny.

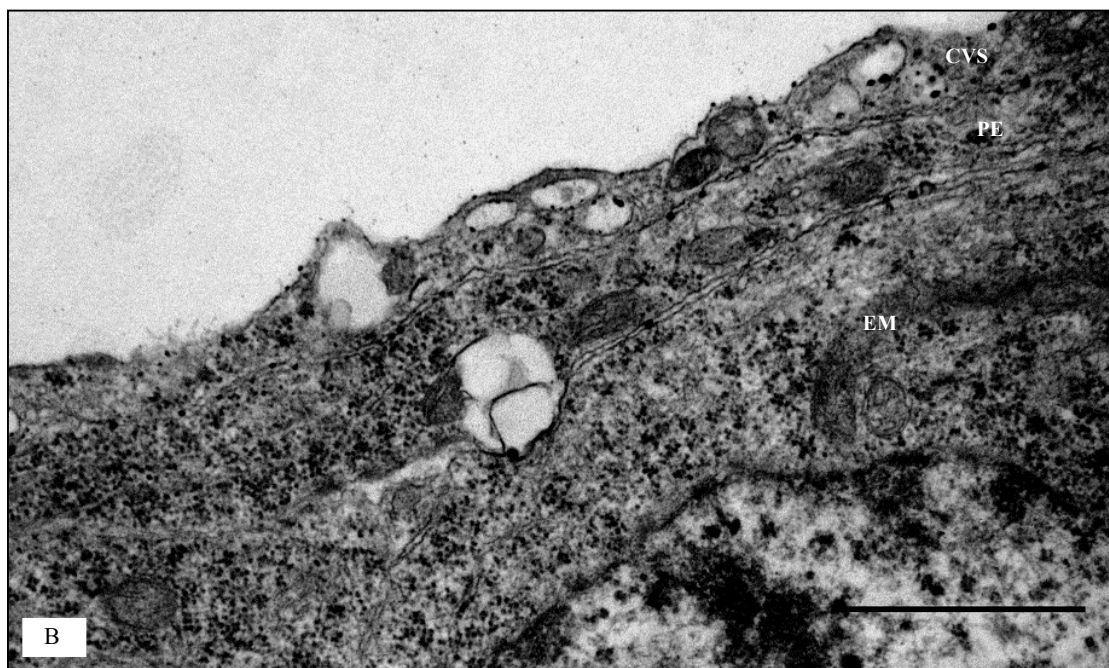
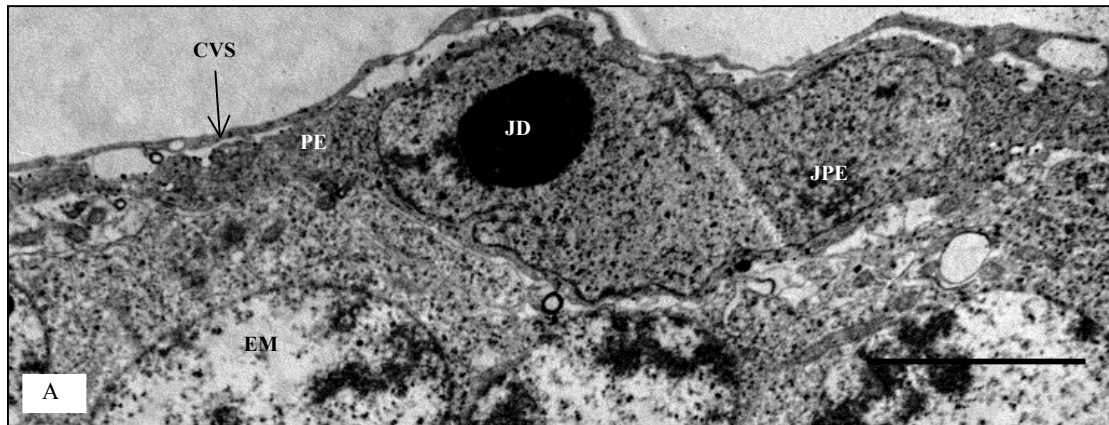
Povrch zralé cercárie byl tvořen glykokalyxem, tegumentem, bazální laminou, okružní a podélnou svalovinou.



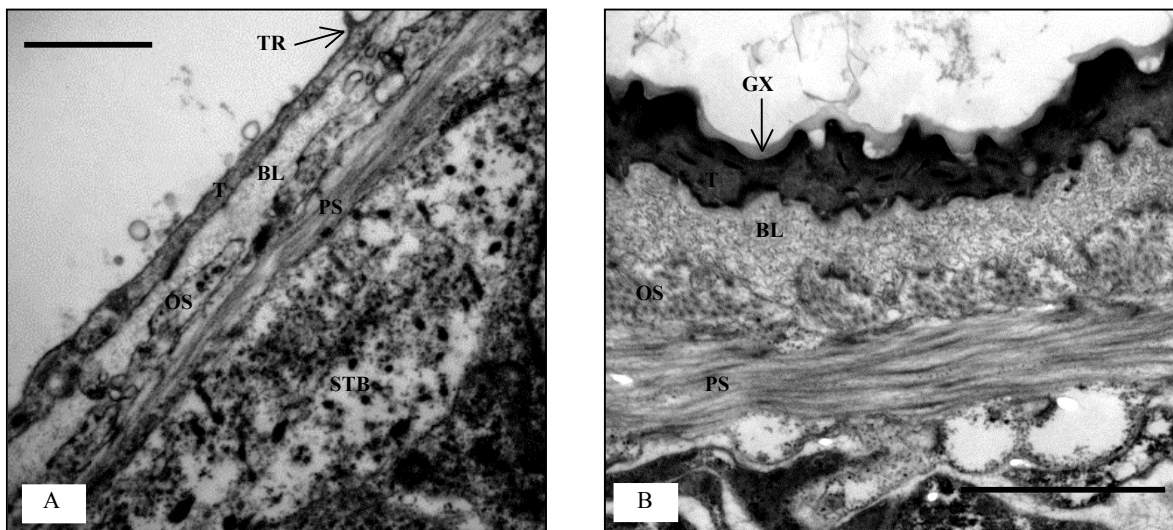
Obr. 28. Dělicí se zárodečná buňka. **A** – Zárodečná buňka je spolu se zárodky cercárií ukotvena v dutině sporocysty pomocí cytoplazmatických výběžků buněk mateřského organismu. Měřítko 5 μ m. **B** – Zárodečná buňka. V rámečku detail struktury zvané „nuage“. Měřítko 5 μ m. **C** – Detail na cytoplazmatické výběžky sporocysty. Zárodečnou buňku od přiléhajícího embrya odděluje jeden z těchto výběžků. Měřítko 3 μ m. **D** – Detail na výrazný Golgiho aparát zárodečné buňky. Měřítko 1 μ m. CVS – cytoplazmatické výběžky buněk sporocysty, EM – embryo cercárie, GA – Golgiho aparát, J – jádro, JD – jáderko, NG – „nuage“, ZB – zárodečná buňka



Obr. 29. Vývoj zárodků cercárii. **A** – Zárodek cercárie zachycený v tělní dutině pomocí cytoplazmatických výběžků dceřiné sporocysty. Měřítko 5 μm . **B** – Diferencující se buňky v prodlužující se zárodečné kouli. Jedna ze zárodečných buněk obsahuje ve své cytoplazmě „nuage“. Měřítko 5 μm . **C** – Detail zárodečné buňky obsahující „nuage“. V rámečku detail „nuage“. Měřítko 2 μm . CER – cercárie, CVS – cytoplazmatické výběžky buněk sporocysty, EM – embryo cercárie, J – jádro, NG – „nuage“, PT – pyknotické tělísko, SB – somatická buňka, SS – stěna sporocysty, ZB – zárodečná buňka



Obr. 30. Primitivní epitel. **A** – Primitivní epitel s jádrem. Nad primitivním epitelem se nachází cytoplazmatické výběžky sporocysty. Měřítko 2 μm . **B** – Vrstvy cytoplazmatických výběžků sporocysty a primitivního epitelu obalující zárodek cercárie. Měřítko 1 μm . CVS – cytoplazmatické výběžky buněk sporocysty, EM – embryo cercárie, JD – jádro, JPE – jádro primitivního epitelu, PE – primitivní epitel

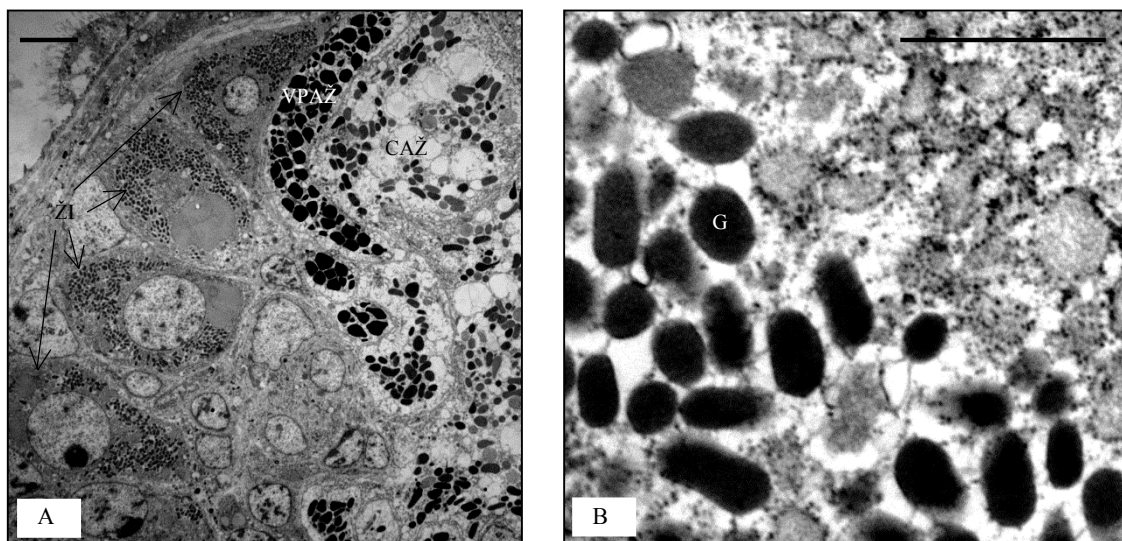


Obr. 31. Vývoj tělní stěny. **A** - Tělní stěna mladé cercárie tvořená syncytiální vrstvou tegumentu, bazální laminou, drobnými vlákny okružní a podélné svaloviny a subtegumentálními buňkami. V tegumentu jsou již pozorovatelné trny. Měřítko 1 μm . **B** - Tegument zralé cercárie. Měřítko 1 μm . BL – bazální lamina, GX – glykokalyx, J – jádro, OS – okružní svalovina, PS – podélná svalovina, STB – subtegumentální buňka, T – tegument, TR – trn

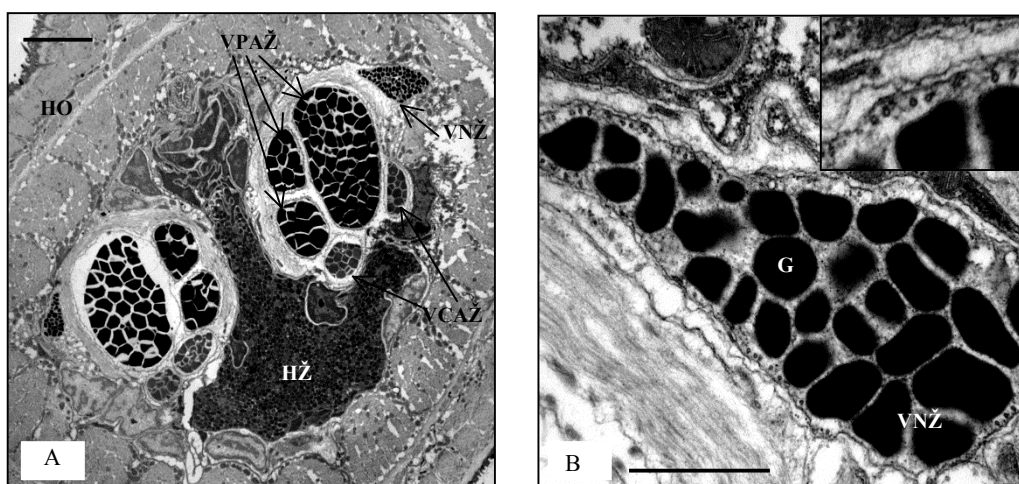
5.3.3. Žlázy typu I a typu II

Pomocí elektronové mikroskopie byly zachyceny žlázy typu I u mladé cercárie (viz obr. 32A). Tyto jednobuněčné žlázy (16 μm) obsahovaly velké jádro (7 μm) s výrazným jadérkem a rozptýleným chromatinem. V jejich cytoplazmě byla lokalizována drobná kulatá až podlouhlá granula o velikosti 0,3–0,4 μm (viz obr. 32B). Žlázy typu II nebyly zachyceny.

U zralé cercárie již buňky s morfologií žláz typu I nebyly pozorovány. V hlavovém orgánu byly však zachyceny vývody žláz vyztužených mikrotubuly, jež těsně přiléhaly ke svazkům vývodů postacetabulárních žláz. Tyto vývody obsahovaly elektron-denzní granula nepravidelného tvaru o velikosti 0,3 - 0,4 μm (viz obr. 32A,B).



Obr. 32. Žlázy typu I u mladé cercárie. Měřítko 5 μm . **A** – Žlázy typu I, **B** – Granula žlázy typu I. Měřítko 1 μm . CAŽ – cirkumacetabulární žláza, G – granula, VPAŽ – vývod postacetabulárních žlázy, ŽI – žláza typu I



Obr. 33. Vývody žláz podél svazků vývodů penetračních žláz. **A** - Hlavový orgán s vývody žláz. Měřítko 5 μm . **B** – Vývod neznámé žlázy přiléhající k penetračním žlázám. Měřítko 1 μm . V rámečku detail na mikrotubuly. G – granula, HO – hlavový orgán, HŽ – hlavová žláza, VCAŽ – vývod cirkumacetabulární žlázy, VNŽ – vývod neznámé žlázy, VPAŽ – vývod postacetabulární žlázy

6. Diskuze

6.1. Vývoj mateřské sporocysty

Mateřské sporocysty byly poprvé pozorovány ve tkáních plže 5. dpi. V plži byly zachyceny tři sporocysty, přičemž jedna se vyskytovala v sinu, jedna pod epitelem pláště a jedna přímo ve svalovině nohy. Sporocysta v sinu obsahovala jednotlivé zárodečné buňky, z nichž některé byly ve fázi dělení. U sporocysty pod epitelem nebyly dělicí se zárodečné buňky pozorovány. V tělní dutině této sporocysty byly lokalizovány zárodečné buňky, ale i stejnoměrně tmavě zbarvené buňky s nerozlišitelnými jadernými strukturami (tzv. pyknotickými jádry), což někteří autoři popisují jako známky hynutí sporocyst (Ruelas a kol., 2007; Sire a kol., 1998). Sporocysta lokalizovaná přímo ve svalovině plže, tedy vyskytující se mimo siny či dutiny, byla již uhynulá. Uhynulé sporocysty u jiných druhů motolic byly pozorovány jako larvy s nerozlišitelnou vnitřní strukturou obsahující silně bazofilní materiál. Avšak u těchto sporocyst byla stále pozorovatelná vrstva tegumentu (Ruelas a kol., 2007; Sire a kol., 1998). Kolem uhynulé sporocysty ve svalovině a sporocysty pod epitelem, jež obsahuje buňky s pyknotickými jádry, byly ve tkáni pozorovány pouze malé prostory, jež mohly být způsobeny odlišným sražením tkání během odvodňování při zalévání do parafínu. Toto pozorování by mohlo odpovídat hypotéze Kinotiho a kol. (1971), že mateřské sporocysty, jež neproniknou do sinů nebo dutin hostitele a zůstanou v tkáních, které je těsně obklopují, hynou. Těsný kontakt tkání plže s povrchem larvy by teoreticky mohl zabraňovat vývoji mikrovilů, jež vznikají během transformace miracidia na mateřskou sporocystu (Meuleman a kol., 1978) nebo zabraňovat přísunu živin k jejich povrchu. Tímto způsobem by mateřské sporocysty měly omezen přísun živin, což by způsobilo jejich hynutí.

Mateřské sporocysty byly dále pozorovány 10., 15. a 20. dpi. Během jejich vývoje se stěna sporocyst postupně ztlušovala, larva se rozšiřovala a prodlužovala. Zárodečný materiál v jejich dutině se rozestupoval a mezi jednotlivými zárodky vznikaly volné prostory, přičemž se během vývoje mateřských sporocyst postupně objevovala vývojově pokročilejší stadia dceřiných sporocyst. S růstem sporocysty se objevovaly v některých oblastech jejich těla konstriktce. Tento vývoj odpovídá pozorování autorů, kteří se zabývali studiem vývoje mateřských sporocyst u jiných druhů schistosom (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Sinha a Srivastava, 1960; Cort a kol., 1955; Loker,

1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1978; Jourdane a Mingyi, 1987).

6.2. Vývoj dceřiných sporocyst

Vývoj dceřiných sporocyst, jenž probíhá v tělní dutině mateřské sporocysty, byl rozdělen do pěti vývojových stadií podle nově vznikajících struktur. Kritériem bylo, zda se jedná o jednobuněčný či mnohobuněčný zárodek, zda je přítomen primitivní epitel či tegument, a zda již došlo k prodlužování těla. Byla pozorována tato stadia: zárodečná buňka, agregát buněk, zárodečná koule, prodlužující se zárodečná koule a dceřiná sporocysta s již vytvořeným tegumentem.

Zárodečná buňka svým dělením dává vzniknout shluku několika buněk. Později se na povrchu zárodku vytváří primitivní epitel, jenž tvoří zploštělé buňky s typickým jádrem, čímž vzniká další vývojové stadium: zárodečná koule. Primitivní epitel pravděpodobně zajišťuje integritu embrya, chrání ho před mechanickým poškozením a dodává zárodku živiny do doby, než dojde k vytvoření tegumentu (Podvyznaya a Galaktionov, 2008). Ve chvíli, kdy je primitivní epitel utvořen, získává zárodek pravidelný kulatý tvar (Cheng a James, 1960; Cheng a Bier, 1972; Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). U motolice *Meiogymnophallus minutus* již v tomto stadiu byla pozorována přítomnost plaménkových buněk (Al-Salman a James, 1988).

Prodlužováním zárodku vzniká stadium nazývané prodlužující se zárodečná koule, obsahující velké množství dělících se buněk a pyknotických tělísek, jež naznačují, že v tomto stadiu dochází k rychlému růstu zárodku, avšak množství embryonálních buněk také zaniká (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Do této fáze je vývoj sporocyst, redií a cercárií u různých druhů motolic prakticky identický (Chen, 1937; Pieper, 1953; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). U prodlužující se zárodečné koule nejprve dochází k výraznému snižování poměru počtu zárodečných/somatických buněk, postupně však zárodečných buněk přibývá a jejich množství převyšuje počet somatických buněk. Ve fázi, kdy v zárodku výrazně převládá počet zárodečných buněk, má embryo červovité vzezření charakteristické pro sporocysty. Na povrchu byla však stále pozorována jádra primitivního epitelu a, stejně jako u mladších zárodků, cytoplazmatické výběžky spojující zárodek se stěnou mateřského organismu. Tyto cytoplazmatické spoje byly pozorované i u dalších druhů schistosom (Cort a Olivier, 1943, Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1954; Meuleman a kol., 1980; Coustau a kol., 1997). U motolice *S. mansoni* bylo

prokázáno, že cytoplazmatické výběžky mají původ ve stěně mateřské sporocysty (Meuleman a kol., 1980). Stadium s červovitým tvarem již během vývoje cercárií nebylo pozorováno.

Dalším vývojovým stadiem je dceřiná sporocysta, na jejímž povrchu je vytvořen zřetelný tegument. Sporocysta s tegumentem pak opouští mateřskou sporocystu a migruje do hepatopankreatu. Podobný vývoj dceřiných sporocyst *T. regenti* byl zaznamenán i u ostatních schistosom či čeledí motolic (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1978; Meuleman a kol., 1980; Jourdane a Mingyi, 1987; Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008).

V hepatopankreatu plže byla zachycena jedna dceřiná sporocysta již 20. den po infekci. Sporocysta byla podlouhlá a úzká. V její tělní dutině se již vyskytovaly vyvíjející se zárodky cercárií ve formě shluků buněk. Ve stejný den po infekci byla však v dutině mateřské sporocysty zachycena dceřiná sporocysta, jež byla výrazně širší a její dutina obsahovala pouze samostatné zárodečné buňky. Je pravděpodobné, že migrující dceřiné sporocysty *T. regenti* mohou být různé velikosti stejně jako je tomu u motolice *Trichobilharzia physellae* (Cort a kol., 1955)⁸. Zdá se však, že k dělení zárodečných buněk v dutině dceřiné sporocysty, a tedy i k vývoji cercárií dochází až poté, co dceřiná sporocysta opustí mateřský organismus, což bylo pozorováno u většiny schistosom (Cort a Olivier, 1943; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1978; Meuleman a kol., 1980; Jourdane a Mingyi, 1987). Výjimku tvoří pouze motolice *Schistosomatium douthitti*, u níž byl zaznamenán vývoj cercárií již v dceřiných sporocystách lokalizovaných v mateřském organismu (Cort a kol., 1944).

U dceřiných sporocyst vyvíjejících se v hepatopankreatu plže postupně docházelo k prodlužování a rozšiřování těla, přičemž postupně tloustla stěna sporocysty a kolem vyvíjejících se zárodků vznikaly volné prostory, stejně jako tomu bylo během vývoje mateřských sporocyst.

Stěna dceřiné sporocysty *T. regenti* lokalizované v hepatopankreatu plže se skládá, stejně jako u sporocyst ostatních druhů motolic (Chernin a Smith, 1974; Meuleman a kol., 1980; Gobbel a Pan, 1985; Al-Salman a James, 1988; Al-Salman a James, 1989; Pojmańska a Machaj, 1991; Klag a kol., 1997; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Pinherio

⁸ Migrující dceřiné sporocysty *T. regenti* během zpracování tkání plžů nebyly pozorovány.

a kol., 2011), z tegumentu s mikrovily, svaloviny a v některých případech z buněk, jejichž cytoplazmatické výběžky tvoří podstatnou část stěny sporocysty. Stejně jako ve studii Bulantové a kol. (2011) byla pozorována podpovrchová vrstva svaloviny tvořená tenkými, široce rozestoupenými vlákny okružní a podélné svaloviny. Detailní struktura stěny sporocysty motolic se však velmi liší podle druhu motolice (Fried a Haseeb, 1991).

Ve stěně dceřiné sporocysty *T. regenti* bylo pozorováno pět typů buněk: subtegumentální buňky, svalové buňky, paprscité buňky a vakuolizované buňky typu I a II, zatímco u lidských schistosom byly ve stěně sporocysty pozorovány pouze subtegumentální buňky, jež byly spojeny cytoplazmatickými můstky se syncytiální vrstvou tegumentu a které vytvářely cytoplazmatické výběžky směřující do tělní dutiny, a svalová vlákna (Smith a Chernin, 1974; Meuleman a kol., 1980; Göbel a Pan, 1985).

Prvním typem buněk tělní stěny *T. regenti* jsou subtegumentální buňky, které morfologií jádra a organelovou výbavou odpovídají subtegumentálním buňkám motolice *S. mansoni* (Smith a Chernin, 1974). U motolice *S. mansoni* však byly pozorované krátké cytoplazmatické spoje mezi těly buněk a syncytiální vrstvou tegumentu (Smith a Chernin, 1974), zatímco v případě dceřiné sporocysty *T. regenti* byly pozorovány nejen subtegumentální buňky s krátkými cytoplazmatickými můstky, ale i buňky, jejichž těla se napojovala přímo na vnější vrstvu tegumentu. Meuleman a kol. (1980) navíc pozorovali u *S. mansoni* cytoplazmatické výběžky subtegumentálních buněk, které směřovaly do tělní dutiny sporocysty a v jejich síti byly uchyceny zárodečné buňky. Takové cytoplazmatické výběžky však subtegumentální buňky *T. regenti* nevytvářely.

Svalové buňky se nacházejí pod syncytiální vrstvou tegumentu a tvoří cytoplazmatické výběžky, jež obsahují myofibrily. Těla svalových buněk podpovrchové svaloviny u motolic čeledi Schistosomatidae nebyla popisována, morfologicky však zcela odpovídají tělům svalových buněk pozorovaným v podpovrchové svalovině sporocysty motolice *Diplostomum pseudospathaceum* (Klag a kol., 1997).

Další tři typy buněk nebyly u schistosom zaznamenány, byly proto pojmenovány podle jejich charakteristických struktur.

Vakuolizované buňky typu I a II se od sebe liší morfologií jádra a organelovou výbavou. Jejich cytoplazma obsahuje velké množství vakuol a tvoří četné výběžky, jimiž jsou v kontaktu s ostatními buňkami sporocysty a s vyvíjejícími se zárodky cercárií.

Podobné buňky tvořící tělní stěnu sporocyst, jejichž cytoplazma obsahuje množství vakuol, byly pozorovány i v tělní stěně motolic *Diplostomum pseudospathaceum* (Klag a kol., 1997) a *Meiogymnophalus minutus* (Al-Salman a James, 1987; Al-Salman a James,

1989), z čehož vyplývá, že by podobný typ buněk mohl tvořit tělní stěnu sporocyst u motolic různých druhů v rámci různých čeledí, přičemž by tyto buňky mohly mít funkci zásobní a mohly by sloužit k transportu živin k ostatním buňkám sporocysty a k vyvíjejícím se zárodkům (Al-Salman a James, 1987; Al-Salman a James, 1989).

Paprsčité buňky obsahují malé množství cytoplazmy a tvoří tenké cytoplazmatické výběžky, jimiž jsou spojeny se sousedními buňkami sporocysty, případně s vyvíjejícími se zárodky. Vzhledem k propojení s okolními buňkami by tyto mohly dodávat živiny ostatním buňkám sporocysty, včetně zárodků.

6.3. Vývoj cercárií

Vývoj cercárií byl rozdělen podle nově vznikajících struktur do deseti stadií, a to podle následujících kritérií: mnohobuněčnost, přítomnost primitivního epitelu, prodlužování těla zárodku, přítomnost tegumentu, postacetabulárních žláz, cirkumacetabulárních žláz, ocásku, furky, kmene ocásku, acetabula, hlavového orgánu, očních skvrn, žláz typu I, žláz typu II a hlavové žlázy. Byla pozorována tato stadia: zárodečná buňka, agregát buněk, zárodečná koule, prodlužující se zárodečná koule, cercárie se základem ocásku, cercárie s furkou, cercárie s kmenem ocásku, cercárie se žlázami typu I, cercárie se žlázami typu II a cercárie s hlavovou žlázou.

Zárodečná buňka morfologicky odpovídá zárodečným buňkám lokalizovaným v tělní dutině mateřských sporocyst. Kromě těchto zárodečných buněk však byly v tělní dutině dceřiné sporocysty zachyceny dělicí se buňky, jež se morfologicky od zárodečných buněk lišily. Tyto buňky obsahovaly výrazná jádra, a v nich dvě výrazná jadérka. Kolem jádra bylo malé množství bazofilní cytoplazmy. Oproti zárodečným buňkám bylo jádro těchto buněk velmi malé. Ve fázi dělení jejich jádro měřilo kolem 4,8 μm . Pravděpodobně by se mohlo jednat o tzv. kmenové buňky, jejichž diferenciací podle současných autorů vznikají zárodečné buňky a jejichž dělením vznikají jedinci následující generace (Podvyaznaya, 2007; Wang a kol., 2013; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014).

Stejně jako zárodečné buňky v mateřských sporocystách jsou i zárodečné buňky, z nichž se vyvíjejí cercárie, spojené se stěnou sporocysty pomocí cytoplazmatických výběžků, u nichž bylo pomocí elektronové mikroskopie prokázáno, že jsou tvořeny buňkami ve stěně sporocysty. Cytoplazmatické spoje mezi sporocystou a vyvíjejícími se cercáriemi byly pozorované až do stadia prodlužující se zárodečné koule (viz kapitola 6.6.).

Zárodečná buňka, stejně jako tomu bylo u vývoje dceřiných sporocyst, dala svým dělením vzniknout agregátu buněk. Podobně jako během vývoje dceřiných sporocyst se pak na povrchu zárodku vytváří primitivní epitel, čímž vzniká zárodečná koule. U zárodečné koule cercárií již byl pozorován jeden pár či dva páry plaménkových buněk, což naznačuje, že již v tomto stadiu dochází k vývoji vylučovací soustavy. Plaménkové buňky ve stadiu zárodečné koule pozoroval i Kuntz (1950) u motolic *S. mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium*.

Tělo zárodečné koule se prodlužuje, a vzniká tak další stadium, tzv. prodlužující se zárodečná koule. Až do tohoto vývojového stadia je vyvíjející se cercárie nerozeznatelná od embrya dceřiné sporocysty. Identická časná embryogeneze cercárií byla pozorována i u dalších druhů motolic (Chen, 1937; Pieper, 1953; Cheng a James, 1960; Cheng a Bier, 1972; Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008).

Detailním vývojem cercárií zaměřeným na diferenciaci zárodečných buněk od stadia prodlužující se zárodečné koule se již nezabývalo mnoho studií. Podrobné studie pozdějšího vývoje cercárií byly zaměřeny zejména na vývoj tělní stěny. Další vývoj včetně diferenciaci zárodečných buněk byl sledován pouze u motolice *S. mansoni*, u níž v průběhu vývoje cercárie byla zaznamenána linie somatických a zárodečných buněk, přičemž velikost zárodečných buněk se postupně snižovala. Zárodečné buňky byly popisovány jako buňky obsahující velké jádro s rozptýleným chromatinem a výrazným jadérkem. Nebylo však zmíněno, zda byly tyto zárodečné buňky pozorovány ve fázi dělení (Cheng a Bier, 1972).

Dalším vývojovým stadiem *T. regenti* byla cercárie se základem ocásku, u níž se kromě již zmíněného základu ocásku nově vyskytovaly postacetabulární a cirkumacetabulární žlázy, přičemž penetrační žlázy u motolice *S. mansoni* byly pozorovány až ve fázi vývoje, kdy docházelo k prodlužování kmene ocásku (Cheng a Bier, 1972). Novou strukturou byl již i jasně rozeznatelný tegument, jenž se obecně u motolice vyskytuje u cercárií v tomto stadiu (Bils a Martin, 1966; Meuleman a Holzmann, 1975; Rees a Day, 1976; Meuleman a kol., 1980; Göbbel a Pan, 1985; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). Kromě somatických buněk byly v těle vyvíjejících se embryí pozorovány zárodečné buňky morfologicky odpovídající zárodečným buňkám vyskytujícím se u cercárií se základem ocásku u motolice *S. mansoni* (Cheng a Bier, 1972). Tyto zárodečné buňky však byly u motolice *T. regenti* zachyceny i ve fázi dělení. Stadium cercárie se základem ocásku lze s jistotou na histologických řezech rozlišit od

vyvíjející se sporocysty, která ve vývojové fázi, kdy je přítomen tegument, obsahuje velké množství morfologicky odlišných zárodečných buněk a postrádá žlázy typické pro cercárii.

Během dalšího vývoje cercárie se postupně objevují tyto struktury: furka, kmen ocásku, acetabulum, oční skvrny, genitální primordium, žlázy typu I a II (viz kapitola 6.5.) a hlavová žláza, přičemž cercárie s již vytvořenou hlavovou žlázou, jejíž vývoj v předchozích stadiích nebyl zaznamenán, je posledním vývojovým stadiem cercárie. Vzhledem k tomu, že nebyla pozorována vývojově pokročilejší stadia, je pravděpodobné, že tato cercárie je zralá cercárie připravená opustit mezihostitele.

I ve fázi, kdy se objevuje genitální primordium, jsou v těle cercárie přítomny zárodečné buňky se svým charakteristickým výrazným jádrem, které jsou pravděpodobně homologické s kmenovými buňkami, jejichž diferenciací vznikají buňky somatické a které byly zaznamenány i u dospělců motolice *S. mansoni* (Skinner a kol., 2012; Collins a kol., 2013; Wang a kol., 2013). Ve studii zaměřené na vývoj cercárie motolice *S. mansoni* však u stadia, u něhož se již vytvořilo genitální primordium, nebyly o zárodečných buňkách s jejich charakteristickým výrazným jádrem již další zmínky (Cheng a Bier, 1972).

6.4. Vývoj povrchu cercárie

Stejně jako u ostatních druhů schistosom jsou zárodečné buňky a časná vývojová stadia cercárií uchycena v síti cytoplazmatických výběžků (Cort a Olivier, 1943; Cort a kol., 1944; Olivier a Mao, 1949; Cort a kol., 1955; Loker, 1978; Loker, 1979; McGeachin, 1979; Meuleman a Holzman, 1975; Göbel a Pan, 1985) tvořených buňkami stěny sporocysty (Meuleman a Holzman, 1975; Göbel a Pan, 1985), přičemž zárodky byly uchyceny ke stěně sporocysty pomocí cytoplazmatických výběžků až do stadia prodlužující se zárodečné koule. Cytoplazma buněk tvořících spojení se zárodky cercárií obsahovala velké množství vakuol, z čehož vyplývá, že by tyto buňky mohly zajišťovat transport živin. Mimoto pravděpodobně zajišťují i ochranu zárodků před mechanickým poškozením (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). V síti cytoplazmatických výběžků však nebylo zaznamenáno uspořádání typické pro zárodečnou masu obsahující kmenové buňky, zárodečné buňky a strukturní buňky, jak bylo popsáno u jiných druhů motolic (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya, 2007; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). Vyskytovaly se pouze shluky samostatných zárodečných buněk a vyvíjejících se zárodků, které od sebe ale byly odděleny cytoplazmatickými výběžky sporocysty. V těchto

shlucích nebyly pozorovány ani buňky, z nichž se diferencují zárodečné buňky, jež dávají vzniknout embryu cercárie.

U vývojově pokročilejších stadií (zárodečná koule) cercárií *T. regenti* se na povrchu zárodku vyskytují již dva obaly. Svrchní obal je tvořen výběžky sporocysty, zatímco spodní obal obsahuje zploštělá jádra s výrazným jadérkem a rozptýleným chromatinem, která jsou typická pro primitivní epitel, jež vzniká splynutím několika embryonálních buněk (Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008). V tomto se rozchází pozorování vývoje embryonálního povrchu schistosomy *T. regenti* od studií, jež byly prováděny na motolici *S. mansoni*, u níž byl pozorován původ primitivního epitelu ve stěně sporocysty (Meuleman a Holzmann, 1975). Po srovnání literatury zabývající se vznikem primitivního epitelu u larev *S. mansoni* (Meuleman a Holzman, 1975; Meuleman a kol., 1980) a *S. japonicum* (Göbel a Pan, 1985) s literaturou autorů, jež zástávají názor, že primitivní epitel je embryonálního původu (Rees a Day, 1976; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyznaya a Galaktionov, 2008) se domnívám, že u lidských schistosom mohlo dojít k záměně cytoplazmatických výběžků sporocysty za primitivní epitel, a primitivního epitelu za vytvářející se tegument.

6.5. Žlázy typu I a II

U cercárie *T. regenti* byly během jejího vývoje zaznamenány dva typy žláz, jež předtím u tohoto druhu nebyly pozorovány. Podle pořadí, v němž se během vývoje formovaly, byly označeny jako žlázy typu I a II.

Žlázy typu I byly poprvé zaznamenány u cercárie s očními skvrnami a genitálním primordiem. Tyto žlázy jsou jednobuněčné žlázy vyskytující se v hojném počtu v oblasti mezi očními skvrnami a postacetabulárními žlázami. U cercárie, jež opustila mezihostitele, však už tyto žlázy nebyly zaznamenány.

Četné žlázy podobné lokalizace se vyskytovaly též u schistosom *Austrobilharzia* sp. a *T. szidati* (Abdul-Salam a Sreelatha, 2004; Kolářová a Horák, 1996), přičemž u cercárie *T. szidati* byly popisovány jako únikové žlázy (Kolářová a Horák, 1996). Vzhledem k tomu, že tyto četné žlázy nebyly u volně plovoucí cercárie *T. regenti* zachyceny, je velmi pravděpodobné, že by se mohlo jednat o již zmíněné únikové žlázy, k jejichž vyprázdnění došlo během úniku z mezihostitele.

Žlázy typu II se během vývoje cercárie vytváří o něco později a jedná se o jeden pár jednobuněčných žláz, jež se vyskytují na ventrální straně cercárie

před cirkumacetabulárními žlázami. Tyto žlázy však byly pozorovány pouze na histologických řezech, na nichž nebyly zachyceny jejich vývody. Pár žláz s obdobnou lokalizací byl pozorován i u dalších druhů schistosom, přičemž byl označován opět jako únikové žlázy (Talbot, 1936; Leigh, 1953; Dorsey, 1974; Abdul-Salam a Sreelatha, 2004). U motolice *S. mansoni* vývody únikových žláz vedou podél vývodů penetračních žláz a ústí na přední straně cercárie, přičemž u volně plovoucích cercárií jsou jedinými výraznými pozůstatky únikových žláz vývody v přední části těla (Dorsey, 1974). Tomu by odpovídal i výskyt dvou párů vývodů neznámých žláz, jež byly zamenány u volně plovoucí cercárie *T. regenti*. Vzhledem k takové lokalizaci by se mohlo jednat o vývody žláz typu II.

Podle tohoto pozorování je pravděpodobné, že některé schistosomy by mohly mít dva různé typy únikových žláz.

6.6. Sporocystogenní sporocysty

U různých druhů motolic rodu *Schistosoma* byla pozorována sporocystogeneze uvnitř dceřiných sporocyst, přičemž byly zaznamenány tyto typy sporocystogeneze: přímá sporocystogeneze, sporocystogeneze po cercáriogenezi a simultánní sporocystogeneze a cercáriogeneze (viz kapitola 3.2.) (Hansen, 1975; Jourdane a kol., 1980; Touassem a Théron, 1986; Kechemir a Théron, 1989; ; Théron a Touassem, 1989). Sporocystogeneze dceřiných sporocyst je významná v obnovení zárodečného materiálu a udržení vysoké produkce cercárií během celého života plže (Kechemir a Théron, 1980; Jourdane a kol., 1980) U jednotlivých druhů se typy sporocystogeneze v dceřiných sporocystách liší, případně se může v rámci jednoho druhu vyskytovat více typů sporocystogeneze. V tomto ohledu se tedy mezi schistosomami vyskytuje značná variabilita. Mimoto se typy sporocystogeneze mohou v závislosti na druhu schistosomy lišit obdobím výskytu během vývoje infekce. Jednotlivé typy byly pozorovány variabilně u různých druhů v časných fázích infekce, v pozdních fázích infekce (až 140 dní po infekci) i v téměř celém období produkce cercárií (Hansen, 1975; Jourdane a kol., 1980; Touassem a Théron, 1986; Kechemir a Théron, 1989; ; Théron a Touassem, 1989).

Studie, při nichž byly různé typy sporocystogeneze pozorované, však byly prováděné pouze na zástupcích rodu *Schistosoma*. Není tedy zřejmé, zda je sporocystogeneze v dceřiných sporocystách typická pouze pro zástupce tohoto rodu, nebo zda je obecně rozšířena mezi všemi zástupci čeledi Schistosomatidae.

Během vývoje motolice *T. regenti* v meziphostiteli byly pozorovány dvě atypické sporocystogenní sporocysty v hepatopankreatu plže, a to 20. a 25. dpi. Tyto sporocysty se vyznačovaly oproti ostatním sporocystám tlustou stěnou a výběžky tělní stěny na přední části těla; jejich tělní dutina obsahovala dceřiné sporocysty, jež bylo možné s jistotou odlišit od cercárií podle typického červovitého vzezření, velkého množství samostatných zárodečných buněk ve středu těla ve fázi vývoje, kdy je přítomen tegument. Cercárie s vytvořeným tegumentem oproti sporocystám obsahují penetrační žlázy a morfologicky odlišné zárodečné buňky, jež se vyskytují pouze ve velmi malém množství.

Vzhledem k tloušťce tělní stěny a prostoru, jež v hepatopankreatu sporocysta zaujímal, je velmi pravděpodobné, že se nejednalo o dceřinou sporocystu, ale o sporocystu, jež se vyvíjela již dlouhou dobu, tedy o mateřskou sporocystu (viz vývoj mateřských a dceřiných sporocyst, kapitola 6.1. a 6.2.). Pozorované trnovité výběžky na povrchu sporocysty by mohly být způsobeny zřasením sporocysty nebo její částečnou degenerací. Lokalizace mateřských sporocyst v hepatopankreatu je však spíše vzácná (Olivier a Mao, 1949). Na jejich atypický výskyt by mohla mít vliv vysoká infekce patnácti miracidii, přičemž takové rozšíření obvyklého habitatu mateřských sporocyst by mohlo snižovat vnitrodruhovou kompetici (Jourdane a Mingyi, 1987). Jiné morfologicky odlišné typy sporocystogenních sporocyst v hepatopankreatu plže nebyly zachyceny, z čehož vyplývá, že by se mohly sporocystogenní dceřiné sporocysty vyskytovat buď v pozdějších fázích infekce, nebo že se u těchto schistosom tento typ obnovování zárodečného materiálu nevyskytuje.

6.7. Reprodukce a původ zárodečných buněk u larev motolic

Reprodukce motolic a původ zárodečných (kmenových) buněk kmene Platyhelminthes je již dlouho diskutovaným tématem. V průběhu času byly vypracovány různé hypotézy týkající se obou úzce souvisejících témat.

V dnešní době se vyskytují dva hlavní myšlenkové proudy týkající se reprodukce motolic. První skupina usuzuje na základě morfologické a funkční podobnosti zárodečné masy s ovarii dospělých jedinců a srovnáním vývoje a ultrastruktury (například přítomnost „nuage“, což je shluk elektrodenzního materiálu v cytoplazmě buněk zárodečné linie, a výrazného Golgiho komplexu) zárodečných buněk a samičích pohlavních buněk, že se motolice v meziphostiteli rozmnožují apomiktickou (ameiotickou) partenogenezí (James

a Bowers, 1930; Klag a kol., 1997; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014), zatímco druhá skupina tvrdí, že se larvy motolic rozmnožují polyembryonií (Cheng a Bier, 1972; Reuter a Kreshchenko, 2004; Skinner a kol., 2012; Wang a kol., 2013).

Zastánci apomiktické partenogeneze však nijak nevysvětlují, jak by pak u gonochoristických druhů mohlo docházet k namnožení samčích jedinců v mezihostiteli.

Obě tyto skupiny se dnes shodují, že zárodečné buňky, jejichž dělením vznikají další generace jedinců, se diferencují z tzv. kmenových buněk homologických s kmenovými buňkami dospělců (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Wang a kol., 2013; Podvyaznaya a Galaktionov, 2014). O těchto buňkách však u motolic není mnoho informací.

U cercárie *T. regenti* jsme pozorovali strukturu zvanou „nuage“, typickou pro zárodečnou buněčnou linii živočichů (Lasko a Ashburner, 1988; Extavour a Akam, 2003), a to nejen v samostatné zárodečné buňce, ale i v zárodečné buňce prodlužující se zárodečné koule, přičemž tato struktura byla pozorována pouze v jedné z mnoha zárodečných buněk embrya. Kromě přítomnosti této struktury se tyto buňky morfologicky nelišily. Na základě tohoto pozorování je možné, že by během časně embryogeneze cercárií mohlo docházet ke vzniku dvou na sobě nezávislých a morfologicky téměř neodlišitelných typů „zárodečných“ buněk, z nichž jedna linie by dávala vzniknout budoucím zárodečným buňkám dospělců a diferenciací druhé linie buněk (kmenových buněk) by vznikaly buňky somatické. K morfologickému odlišení obou linií by pak docházelo během pozdního vývoje cercárií, kdy zárodečné buňky genitálního primordia získávají svůj charakteristický vzhled. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že u larev motolice *S. mansoni* byly zaznamenány dva typy „zárodečných“ buněk, jež se lišily v expresi některých genů (Wang a kol., 2013). Tito autoři však tuto molekulární heterogenitu přisuzují diferenciaci mladých zárodečných buněk (těmito autory označovanými jako somatické kmenové buňky) v buňky zárodečné, jež dávají vzniknout jedinci další generace.

Vzhledem k tomu, že časná embryogeneze cercárií, sporocyst a redií probíhá prakticky identicky (Chen, 1937; Pieper, 1953; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003), je možné, že by k takové diferenciaci dvou linií „zárodečných“ buněk v časných fázích vývoje mohlo docházet u všech těchto larev.

U motolice *T. regenti* jsme se pokusili „nuage“ zárodečných buněk cercárií označit pomocí protilátek proti konzervativní sekvenci aminokyselin vasa-like proteinu, jenž se v neoblastu ploštěnek vyskytuje rozptýlený v cytoplazmě, zatímco v některých buňkách,

které pravděpodobně dávají vzniknout zárodečným buňkám, byl pozorován v „nuage“ (u ploštěnek označované jako chromatoidní tělísko) (Pfister a kol., 2008; Willems a kol., 2010). Tento protein se však nepodařilo pomocí protilátek proti konzervativní aminokyselinové sekvenci proteinu prokázat. Detekce vasa-like proteinu (nebo jeho genu) by se však mohla podařit například pomocí in situ hybridizace či přípravou vlastních protilátek.

7. Závěr

Tato práce byla zaměřena na diferenciaci zárodečných buněk a vývoj larev motolice *T. regenti* pomocí histologických a histochemických metod, a také pomocí elektronové mikroskopie. Zabývá se i rozlišením sporocystogeneze a cercáriogeneze v tělní dutině sporocyst. Diplomová práce přinesla následující prioritní výsledky:

- U mateřských sporocyst bylo prokázáno, že během jejího vývoje dochází k jejímu růstu, tloušťce stěny a postupnému výskytu vývojově pokročilejších stadií zárodků v její tělní dutině.
- U dceřiných sporocyst bylo definováno pět vývojových stadií. Samostatný vývoj (mimo mateřský organismus) odpovídal vývoji samotné mateřské sporocysty.
- U cercárií jsme definovali deset ontogenetických stadií, přičemž se podařilo prokázat, že časná embryogeneze dceřiných sporocyst a cercárií probíhá identicky až do stadia prodlužující se zárodečné koule.
- U cercárií jsme nově popsali dva typy sekrečních žláz, tzv. žlázy typu I a II. Žlázy typu I jsou jednobuněčné žlázy vyskytující se v hojném počtu v oblasti mezi očními skvrnami a postacetabulárními žlázami. Žlázy typu II se vyskytují jako jeden pár jednobuněčných žláz lokalizovaný na ventrální straně cercárie před cirkumacetabulárními žlázami. Pravděpodobně by se mohlo jednat o dva typy únikových žláz.
- Byla detekována sporocystogenní sporocysta atypicky lokalizovaná v hepatopankreatu plže.
- Mimo svalových a subtegumentálních buněk byly ve stěně dceřiné sporocysty popsány další tři buněčné typy: paprsčité buňky a vakuolizované buňky typu I a II.
- Bylo prokázáno, že během vývoje cercárií se na povrchu zárodku vyskytují tři typy povrchových struktur: obal tvořený cytoplazmatickými výběžky buněk sporocysty, primitivní epitel a tegument.
- Byla detekována struktura typická pro buňky zárodečné linie živočichů (tzv. „nuage“), a to nejen v samostatné zárodečné buňce, ale i v zárodečné buňce embrya cercárie, což nasvědčuje tomu, že k diferenciaci buněk zárodečné linie od buněk somatických by mohlo docházet již během časně embryogeneze.

Seznam použitých zkratek

dpi – den po infekci

HaE – hematoxylin a eosin

Literatura

Abdul-Salam J., Sreelatha B. S. (2004). Description and surface topography of the cercaria of *Austroilharzia* sp. (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology International*, 53: 11–21

Akramova F. D., Azimov D. A., Shakarboev E. B. (2010). The morphology and biology of the trematode *Gigantobilharzia acotylea* (Digenea: Schistosomatidae). *Vestnik Zoologii*, 44: 1–10

Akramova F. D., Azimov D. A., Shakarboev E. B. (2011). Morphology, biology and taxonomy of *Dendritobilharzia loossi* Skrjabin, 1924 (Trematoda: Bilharziellidae), a parasite of *Pelecanus onocrotalus* (Pelecanidae) and *Anas platyrhynchos* (Anatidae). *Parasite*, 18: 39–48

Aldhoun J. A., Faltýnková A., Karvonen A., Horák P. (2009a). Schistosomes in the North: A unique finding from prosobranch snail using molecular tools. *Parasitology International*, 58: 314–317

Aldhoun J. A., Kolářová L., Horák P., Skírnisson K. (2009b). Bird schistosome diversity in Iceland: molecular evidence. *Journal of Helminthology*, 83:173–180

Al-Salman H. A., James B. L. (1988). Ultrastructure of the tegument in daughter sporocyst and cercarial embryos of *Meiogymnophallus minutus* (Digenea: Gymnophallidae). *International Journal for Parasitology*, 18: 231–242

Al-Salman H. A., James B. L. (1989). Ultrastructural studie on the daughter sporocysts of *Meiogymnophallus minutus* (Digenea: Gymnophallidae). *International Journal for Parasitology*, 19: 499–508

Bils R. F., Martin W. E. (1966). Fine structure and development of the trematode integument. *Transactions of the American Microscopical Society*, 85: 78–88

Blair D., Islam K. S. (1983). The life-cycle and morfology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nassal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology* 5: 89–117

- Blažová K., Horák P. (2005).** *Trichobilharzia regenti*. The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International*, 54: 167–172
- Brant S. V., Loker E. S. (2009).** Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *The Journal of Parasitology*, 95: 941–963
- Brooks C. P. (1953).** A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis havanensis* and *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology*, 39: 159–165
- Bruckner D. A (1974).** Differentiation of pre- and postacetabular glands of schistosome cercariae using apomorphine as stain. *The Journal of Parasitology*, 60: 752–756
- Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P. (2011).** *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *Micron*, 42: 47–54
- Chamot E., Toscani L., Rougemont A. (1998).** Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemán at Geneva, Switzerland. *Epidemiology and Infection*, 120: 305–314
- Chen P. (1937).** The germ cell cycle in the trematode, *Paragonimus kellicotti* Ward. *Transactions of the American Microscopical Society*, 56: 208–236
- Cheng T. C., James H. A. (1960).** Studies on the germ cell cycle, morphogenesis and development of the cercarial stage of *Crepidostomum cornutum* (Osborn, 1903) (Trematoda: Allocreadiidae). *Transactions of the American Microscopical Society*, 79: 75–85
- Cheng T. C., Bier J. W. (1972).** Studies on molluscan schistosomiasis: An analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 64: 129–141
- Chernin E. (1966).** Transplantation of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. *The Journal of Parasitology*, 52: 473–482
- Chu K. Y., Massoud J., Sabbaghian H. (1966).** Host-parasite relationship of *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in Iran: Effect of the age of *B. truncatus* on the development of *S. haematobium*. *Bulletin of the World Health Organization*, 34: 113–119
- Chu W. T. C., Cutress C. E. (1954).** *Austroilharzia variglandis* (Miller and Northup, 1926) Penner, 1953, (Trematoda: Schistosomatidae) in Hawaii with notes on its biology. *The Journal of Parasitology*, 40: 515–524

- Collins J. J., King R. S., Cogswell A., Williams D. L., Newmark P. A. (2011).** An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *Neglected Tropical Disease*, 5: e1009–e1017
- Collins J. J., Wang B., Lambrus B. G., Tharp M., Iyer H., Newmark P. A. (2013).** Adult somatic stem cells in the human parasite, *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 494: 476–479
- Cort W. W. (1928).** Schistosome dermatitis in the United States (Michigan). *The Journal of the American Medical Association*, 90: 1027–1029
- Cort W. W., McMullen D. B., Brackett S. (1937).** Ecological studies on the *Stagnicola emarginata angulata* (Sowerby) in the Douglas lake region, Michigan. *The Journal of Parasitology*, 23: 504–532
- Cort W. W., Olivier L. (1941).** Early developmental stages of strigeid trematodes in the first intermediate host. *The Journal of Parasitology*, 27: 493–504
- Cort W. W., Olivier L. (1943a).** The development of the sporocysts of a schistosome, *Cercaria stagnicola* Talbot, 1936. *The Journal of Parasitology*, 26: 164–176
- Cort W. W., Olivier L. (1943b).** The development of the larval stages of *Plagiorchis muris* Tanabe, 1922, in the first intermediate host. *The Journal of Parasitology*, 49: 81–99
- Cort W. W., Ameel D. J., Olivier L. (1944).** An experimental study of the development of *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1914) in its intermediate host. *The Journal of Parasitology*, 30: 1–17
- Cort W. W., Ameel D. J., Van der Woude A. (1948).** Studies on germinal development in rediae of the trematode order Fasciolatoidea Szidat, 1936. *The Journal of Parasitology*, 34: 428–451
- Cort W. W., Ameel D. J., Van der Woude A. (1955).** Germinal development of a bird schistosome *Trichobilharzia physellae* (Talbot, 1936). *The Journal of Parasitology*, 41: 24–39
- Coustau C., Ataev G., Jourdane J., Yoshino T. P. (1997).** *Schistosoma japonicum*: *In vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. *Experimental Parasitology*, 87: 77–87
- DiConza J. J., Hansen E. L. (1972).** Multiplication of transplanted *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts. *The Journal of Parasitology*, 58: 181–182
- Dorsey C. H. (1974).** *Schistosoma mansoni*: ultrastructure of cercarial escape glands. *Experimental Parasitology*, 36: 386–396

- Dorsey C. H., Cousin C. E., Lewis F. A., Stirewalt M. A. (2002).** Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron*, 33: 279–323
- Extavour C. G., Akam M. (2003).** Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130: 5869–5884
- Farahnak A., Essalat M. (2003).** Study on cercarial dermatitis in Khuzestan province, south western Iran. *BMC Public Health*, 3: 35
- Galaktionov K. V., Dobrovolskij A. A. (2003).** The biology and evolution of trematodes. Kluwer Academic, Dordrecht, London.
- Göbbel E., Pan J. P. (1985).** Ultrastructure of the daughter sporocyst and developing cercaria of *Schistosoma japonicum* in experimentally infected snails, *Oncomelania hupensis hupensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71: 227–240
- Hansen E. L. (1973).** Progeny-daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 3: 267–268
- Hansen E. L. (1975).** Secondary daughter sporocyst of *Schistosoma mansoni*: their occurrence and cultivation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266: 426–436
- Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998).** *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite*, 5: 349–357
- Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. (1999).** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology*, 119: 577–581
- Horák P., Kolářová L. (2001).** Bird schistosomes: do they die in mammalian skin? *Trends in Parasitology*, 17: 66–69
- Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002).** Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology*, 52: 156–233
- Horák P., Kolářová L., Mikeš L. (2014).** Schistosomoidea and Diplostomoidea. *Digenetic Trematodes* (R. Toledo, B. Fried, Eds.). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 766: 331–364
- Hrádková K., Horák P. (2002).** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology*, 76: 137–141
- Huňová K., Kašný M., Hampl V., Leontovyč R., Kuběna A., Mikeš L., Horák P. (2012).** *Radix* spp. : Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 57: 273–274

- Inatomi S., Tongu Y., Sakumoto D., Suguri S., Itano K. (1970).** The ultrastructure of *Schistosoma japonicum*. *Acta Medica Okayama*, 24: 205–224
- James B. L., Bowers E. A. (1930).** Reproduction in the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Bucephalidae) and *Cercaria dichotoma* Lebour, 1911 (non Müller) (Gymnophallidae). *Parasitology*, 57: 607–625
- Jouet D., Ferté H., Depaquit J., Rudolfová J., Latour P., Zanella D., Kaltenbach M. L., Léger N. (2008).** *Trichobilharzia* n. sp. in natural conditions in Annecy Lake, France. *Parasitology Research*, 108: 51–58
- Jourdane J., Théron A., Combes C. (1980).** Demonstration of several sporocyst generations as a normal pattern of reproduction of „*Schistosoma mansoni*“. *Acta Tropica*, 37: 176–182
- Jourdane J., Mingyi X. (1987).** The primary sporocyst stage in the life cycle of *Schistosoma japonicum* (Trematoda: Digenea). *Transactions of the American Microscopical Society*, 106: 364–372
- Jourdane J., Théron A. (1987).** Larval development: eggs to cercariae. In: *The biology of schistosomes. From genes to latrines*. Eds, Rollinson, D., Simpson, A. J. G., Academic Press Limited: 83–113
- Kechemir N., Théron A. (1980).** Existence of replicating sporocysts in the development cycle of *Schistosoma haematobium*. *American Society of Parasitologists*, 66: 1068–1070
- Kechemir N., Théron A. (1989).** Dynamics of the intramolluscan larval development of *Schistosoma haematobium*: replication of daughter sporocysts and cercarial production. *Journal of Helminthology*, 63: 1–5
- Kinoti G. K. (1971).** Observations on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mattheei*. *Parasitology*, 62: 161–170
- Klag J., Niewiadomska K., Czubaj A. (1997).** Ultrastructural studies on the sporocyst wall of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Digenea: Diplostomidae). *International Journal for Parasitology*, 27: 919–929
- Kolářová L., Horák P. (1996).** Morphology and chaetotaxy of *Trichobilharzia szidati* Neuhaus, 1952 cercariae (Trematoda: Schistosomatidae: Bilharziellinae). *Helminthologia*, 33: 3–7
- Kolářová L., Skirnisson K., Horák P. (1999).** Schistosome cercariae as the causative agent of swimmer's itch in Iceland. *Journal of Helminthology*, 73: 215–220

- Kolářová L., Rudolfová J., Hampl V., Skírnisson K. (2006).** *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae - Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitology International*, 55: 179–186
- Kouřilová P., Syruček M., Kolářová L. (2004).** The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research*, 93: 8–16
- Kuntz R. E. (1950).** Embryonic development of the excretory system in fork-tailed cercariae of the schistosomes and in a blunt-tailed brachylaemid cercaria. *Transactions of the American Microscopical Society*, 69: 1–20
- Lampe P. H. J. (1927).** The development of *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 20: 1510–1516
- Lasko P. F., Ashburner M. (1988).** The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*, 335: 611–617
- Lee H. F. (1962).** Life history of *Heterobilharzia americana* Price 1929, a schistosome of the racoon and other mammals in southeastern United States. *The Journal of Parasitology*, 48: 728–739
- Leigh W. H. (1953).** *Cercaria huttoni*, sp. nov., a dermatitis-producing schistosome larva from the marine snail, *Haminoea antillarum guadalupensis* Sowerby. *The Journal of Parasitology*, 39: 625–629
- Leite A. C. R., de Araújo Costa H. M., Costa J. O., Guimaraes M. P., Lima W. S. (1982).** The life cycle of *Dendritobilharzia anatarum* (Cheatum, 1941) (Trematoda, Schistosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 77: 389–396
- Lie K. J. (1966).** Role of immature rediae in antagonism in *Paraphystomum segregatum* to *Schistosoma mansoni* and larval development in degenerating sporocysts. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 32: 316–323
- Ligasová A., Bulantová J., Šebesta O., Kašný M., Mikeš L. (2011).** Secretory glands in the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* – ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. *Parasites and Vectors*, 4: 1–12
- Lo C. T., Lee K. M. (1995).** *Schistosoma japonicum*, zoophilic strain, in *Oncomelania hupensis chiui* and *O. h. formosana*: miracidial penetration a comparative histology. *The journal of Parasitology*, 81: 708–713
- Lockyer A. E., Olson P. D., Ostergaart P., Rollinson D., Johnston D. A., Attwood S. D., Southgate V. R., Horák P., Snyder S. D., Le T. H., Agatsuma T., McManus D. P.,**

- Carmichael A. C., Naem S., Littlewood D. T. J. (2003).** The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology*, 126: 203–224
- Loker E. S. (1978).** Normal development of *Scistosomatium douthitti* in the snail *Lymnaea catascopium*. *The Journal of Parasitology*, 64: 977–985
- Loker E. S. (1979).** Host-parasite interactions between the freshwater snail *Lymnaea catascopium* and the trematode *Schistosomatium douthitti*. *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 7227
- Mathies A. W., Cort W. W. (1956).** Larval trematode infections in snails of different sizes. *The Journal of Parasitology*, 42: 428–431
- McGeachin W. T. (1979).** Emergence and penetration by cercariae of *Gigantobilharzia huronensis* (Trematoda: Schistosomatidae). *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 7232
- Meuleman E. A., Holzmann P. J. (1975).** The development of the primitive epithelium and true tegument in the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 45: 307–318
- Meuleman E. A., Lyaruu D. M., Khan M. A., Holzmann P. J., Sminia T. (1978).** Ultrastructural changes in the body wall of *Schistosoma mansoni* during the transformation of the miracidium into the mother sporocyst in the snail host *Biomphalaria pfeifferi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 56: 227–242
- Meuleman E. A., Holzmann P. J., Peet R. C. (1980).** The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61: 201–212
- Meuleman E. A., Huyer A. R., Mooij J. H. (1984).** Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology* 34: 414–417
- Olivier L., Mao C. P. (1949).** The early larval stages of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1818). *The Journal of Parasitology*, 35: 267–275
- Pan S. C. T. (1996).** *Schistosoma mansoni*: The ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 49: 129–149

- Pfister D., Mulder K., Hartenstein V., Kuales G., Borgonie G., Marx F., Morris J., Ladurner P. (2008).** Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of *macvasa* expression in *Macrostomum lignano*. *Developmental Biology*, 319: 146–159
- Pieper M. B. (1953).** The life history and germ cell cycle of *Spirorchis artericola* (Ward, 1921). *The Journal of Parasitology*, 39: 310–325
- Pinheiro J., Franco-Acuña D. O., Oliveira-Menezes A., Brandolin S. V. P. B., Souza, W., DaMatta R. A. (2011).** Ultrastructure of the sporocyst *Eurytrema coelomaticum* (Giard *et* Billet, 1892) Loos, 1907. *Veterinary Parasitology*, 182: 201–212
- Podvyznaya I. M. (2007).** An ultrastructural study of reproduction in the sporocysts of *Proserhynchoides gracilescens* (Digenea: Bucephalidae). *Parasitology Research*, 101: 35–42
- Podvyznaya I. M., Galaktionov K. V. (2008).** An ultrastructural study of the early cercarial development in *Proserhynchoides borealis* (Digenea: Bucephalidae) with special reference to formation of the primitive epithelium. *Journal of Helminthology*, 82: 101–108
- Podvyznaya I. M., Galaktionov K. V. (2014).** Trematode reproduction in the molluscan host: an ultrastructural study of the germinal mass in the rediae of *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology Research*, 113: 1215–1224
- Pojmańska T., Machaj K. (1991).** Differentiation of ultrastructure of the body wall of the sporocysts of *Leucochloridium paradoxum*. *Australian Society of Parasitology*, 21: 651–659
- Raz E. (2000).** The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*, 1: 1017
- Reese F. G., Day M. F. (1976).** The origin and development of the epidermis and associated structures in the cercaria of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) (Digenea: Heterophyidae) from *Littorina littorea* (L.). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 192: 299–321
- Ruelas D. S., Karentz D., Sullivan J. T. (2007).** Sublethal effects of ultraviolet B radiation on miracidia and sporocysts of *Schistosoma mansoni*: intramolluscan development, infectivity and photoreaction. *The Journal of Parasitology*, 93: 1303–1310
- Reuter M., Kreshchenko N. (2004).** Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 334–356

- Rudolfová J., Littlewood D. T. J., Sitko J., Horák P. (2007).** Bird schistosomes in a wildfowl in the Czech Republic and Poland. *Folia Parasitologica*, 54: 88–93
- Rudolfová J., Hampl V., Bayssade-Dufour C., Lockyer A. E., Littlewood D. T. J., Horák P. (2005).** Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research*, 95: 79–89
- Schuster R. K., Aldhoun J. A., O'Donovan D. (2013).** *Gigantobilharzia melanoidis* n.sp. (Trematoda: Schistosomatidae) from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiariidae) in the United Arab Emirates. *Parasitology Research*, 113: 959–972
- Shibata N., Umesono Y., Orii H., Sakurai R., Watanabe K., Agata K. (1999).** Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic cells of planarians. *Developmental Biology*, 206: 73–87
- Sinha P. K., Srivastava H. D. (1960).** Studies on *Schistosoma incognitum* Chandler, 1926. II. On the life history of the blood fluke. *The Journal of Parasitology*, 46: 629–641
- Sire C., Rognon A., Theron A. (1998).** Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology*, 117: 117–122
- Skinner D. E., Rinaldi G., Suttiaprapa S., Mann V. H., Smircich P., Cogswell A. A., Williams D. L., Brindley P. J. (2012).** Vasa-like DEAD-box RNA helicases of *Schistosoma mansoni*. *Neglected Tropical Diseases*, 6: 1–11
- Smith J. H., Chernin E. (1974).** Ultrastructure of young mother and daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, 60: 85–89
- Solana J., Romero R. (2009).** *SpolvgA* is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development. *International Journal of Biological Sciences*, 5: 64–73
- Soldánová M., Kostadinová A. (2011).** Rapid colonisation of *Lymnea stagnalis* by larval trematodes in eutrophic ponds in central Europe. *International Journal for Parasitology*, 41: 981–990
- Soomro N. M., Arijó A. G., Qureshi T. A., Runham N. V., Doenhoff M. J. (2005).** Pathology of schistosome infection on host tissue during developmental stages of parasite in vector snails. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7: 133–141
- Souza C. P., Cunha R. C. P., Andrade Z. A. (1995).** Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 37: 201–206

- Snyder S. D., Loker E. S. (2000).** Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an asian origin for *Schistosoma*. *The Journal of Parasitology*, 86: 283–288
- Talbot S. B. (1936).** Studies on schistosome dermatitis. II. Morphological and life history studies on three dermatitis-producing schistosome cercariae, *C. elvae* Miller, 1923, *C. stagnicolae* n. sp., a *C. physellae*. *American Journal of Epidemiology*, 23: 372–384
- Théron A., Touassem R. (1989).** *Schistosoma rodhaini*: intramolluscan larval development, migration and replication processes of daughter sporocysts. *Acta Tropica*, 46: 39–45
- Tolstenkov O. O., Akimova L. N., Chrisanfova G. G., Terenina N. B., Gustafsson M. K. S. (2012).** The neuro-muscular system in fresh-water furcocercaria from Belarus. I Schistosomatidae. *Parasitology Research*, 110: 185–193
- Touassem R., Théron R. (1986).** Study on the intramolluscal development of *Schistosoma bovis*: demonstration of three patterns of sporocystogenesis by daughter sporocyst. *Parasitology*, 92: 337–341
- Van der Woude A. (1954).** Germ cell cycle of *Megalodiscus temperatus* (Stafford, 1905) Harwood, 1932 (Paramphistomidae: Trematoda). *American Midland Naturalist*, 51: 172–202
- Wang B., Collins J. J., Newmark P. A. (2013).** Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. *Developmental Biology and Stem Cells / Microbiology and Infection Disease*, 2: 1–15
- Willems M., Couvreur M., Boone M., Houthoofd W., Artois T. (2010).** Distribution of proliferating cells and *vasa*-positive cells in the embryo of *Macrostomum lignano* (Rhabditophora: Platyhelminthes). *Belgian Journal of Zoology*, 140: 149–153
- Woodhead A. E. (1957).** Germ-cell development in the first and second generations of *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1914) Price, 1931 (Trematoda: Schistomatidae). *Transactions of the American Microscopical Society*, 76: 173–176
- Yang G. J., Utzinger J., Sun L. P., Hong Q. B., Vounatsou P., Tanner M., Zhou X. N. (2007).** Effect of temperature on the development of *Schistosoma japonicum* within *Oncomelania hupensis*, and hibernation of *O. hupensis*. *Parasitology Research*, 100: 695–700

Sekundární zdroje

Fried B., Haseeb M. A. (1991). Platyhelminthes: Aspidogastrea, Monogenea, and Digenea. In: Microscopic anatomy of invertebrates (Edited by Harrison F. W. a Bogitsh B. J.) 141–209, Wiley-Liss, New York. dle: Klag a Czubaj (1997).

Pearson J. C. (1972). A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea. In: Advances in parasitology, ed. by B. Dawes, Academic Press, New York, 10: 153–181