

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Ontogenetický vývoj motolice
Notocotylus attenuatus

Bakalářská práce

Vladimír Skála

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha 2006

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za odborné vedení a ochotu mi kdykoliv poradit. Děkuji svým rodičům za plnou podporu během bakalářského studia a svým přátelům Radkovi, Romanovi a Emílii za příjemně strávené chvíle odreagování.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval sám, a to také stvrzuji svým podpisem:

.....

OBSAH

Abstrakt.....	2
Úvod.....	3
1. Vývoj v mezihostitelském plži.....	4
1.1. Stavba vajíčka a funkce jeho částí.....	4
1.2. Lhnutí vajíčka a vývoj dalších stádií.....	6
1.3. Spektrum mezihostitelů.....	8
2. Vývoj ve vnějším prostředí.....	9
2.1. Cystogenní žlázové buňky.....	9
2.2. Průběh encystace.....	11
2.3. Různé pohledy na průběh encystace.....	13
2.4. Vliv vnějších faktorů na tvorbu a přežívání metacerkárie.....	15
3. Vývoj v definitivním hostiteli.....	16
3.1. Excystace a dosažení konečné lokalizace.....	16
3.2. Spektrum definitivních hostitelů.....	19
Závěr.....	20
Přehled citované literatury.....	21

ABSTRAKT

Notocotylus attenuatus je motolice parazitující v mezihostitelských plžích čeledi Lymnaeidae a u vodních ptáků z řádu vrubozobých (Anseriformes), kteří jsou definitivní hostitelé. Životní cyklus je dvouhostitelský a ve vnějším prostředí se tvoří metacerkárie. Zvláštností životního cyklu je nepřítomnost stádia miracidia, které je ve vajíčku nahrazeno sporocystou. Pozoruhodný je i způsob injekce sporocysty stěnou střeva do hemocelu plže. Mezi motolicemi je to ojedinělé. Z více jak 40 citovaných prací nelze však zjistit především přesné mechanismy vývoje v mezihostiteli i tvorby metacerkárie ve vnějším prostředí. Studium těchto fází vývoje lze však realizovat díky použitím experimentálních hostitelů (plovatek a kachen) i možnosti kultivace *in vitro*.

ÚVOD

Notocotylus attenuatus je monostomní motolice z kmene Platyhelminthes, třídy Trematoda a čeledi Notocotylidae. Jedná se o téměř kosmopolitně se vyskytujícího parazita převážně vodních ptáků. Jeho životní cyklus je možné definovat jako dvouhostitelský s tvorbou metacerkárie ve vnějším prostředí. Velmi charakteristickou zvláštností životního cyklu *N. attenuatus* je absence stádia miracidia. Ve vajíčku se vyskytuje sporocysta, která je injikována stěnou střeva do hemocelu plže. To je mezi motolicemi ojedinelé. Z plžů se uvolňují cercárie, které se encystují na pevném podkladu. Na průběh encystace však existují různé pohledy. Z metacerkárií se v trávicím traktu definitivního hostitele uvolňují jednotlivé motolice a místem jejich parazitace jsou slepá střeva. Projevem jejich patogenního působení je především poškození epitelu střeva, a tím také nižší přírůstky na váze. V některých případech může dojít při masivní infekci i ke smrti definitivního hostitele.

Zvláštnosti životního cyklu i nedostatečně popsané fáze ontogenetického vývoje vyžadují další laboratorní studium tohoto parazita, které je realizovatelné i v podmínkách PřF UK, a to díky dostupnosti experimentálních hostitelů – plovatek a kachen.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o ontogenetickém vývoji motolice *N. attenuatus* tak, aby navazující experimenty reflektovaly již známé údaje.

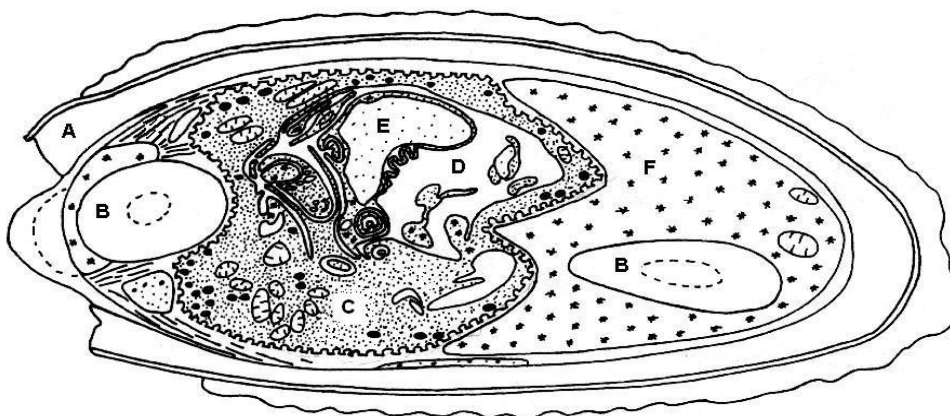
1. VÝVOJ V MEZIHOSTITELSKÉM PLŽI

N. attenuatus využívá ve svém životním cyklu, podobně jako většina motolic, úzké spektrum plžů jako první mezihostitele. Těmi jsou pro *N. attenuatus* zástupci čeledi Lymnaeidae. U většiny motolic je invazním stadiem pro plže miracidium. Naproti tomu je životní cyklus motolice *N. attenuatus* zvláštní a zajímavý tím, že se zde stadium miracidia nevyskytuje.

Plž se nakazí požitím vajíčka. Jeho obsah tvoří sporocysta, operkulární výběžek a dvě buňky vyskytující se vně sporocysty (Murrills a kol. 1985a). V trávici soustavě plže je sporocysta pomocí operkulárního výběžku injikována stěnou střeva do hemocelu, kde následuje její další vývoj. Minimální doba vývoje v mezihostiteli je 59 dní (Wright a Bennet 1964).

1.1. Stavba vajíčka a funkce jeho částí

Plně vyvinutá vajíčka dosahují velikosti okolo 20 μm a jsou charakteristická přítomností asi 200 μm dlouhých filament na každém pólu. Filamenta jsou typická i pro vajíčka ostatních zástupců čeledi Notocotylidae (Wittrock 1982). Vajíčko má operkulum. Uvnitř embryonovaného vajíčka se nachází sporocysta, operkulární výběžek a dvě buňky lokalizované vně sporocysty (Murrills a kol. 1985a). Schéma vajíčka je znázorněno na obr.1.



Obr 1. Schématický řez vajíčkem motolice *N. attenuatus*. A vaječné obaly, B operkulární výběžek, C sporocysta, D prostor okolo zárodečné buňky tvořený výběžky tegumentu sporocysty, E zárodečná buňka, F glykogenní buňka. (Murrills a kol. 1985a, upraveno).

Sporocysta (obr. 1C) je stadium, které se v plži dále vyvíjí a tvoří se v ní dceřinné sporocysty. Povrch sporocysty je tvořen tegumentem s množstvím spojených mikrovilů. Mikrovily se po několika dnech infekce v plži zvětšují. Na mikrovilech byly prokázány navázané hemocyty plže a uvažuje se o jejich roli v ochraně proti obranným mechanismům plže (Murrills a kol. 1988). Hemocyty se ale na mikrovily spíše vážou proto, že rozpoznávají sporocystu jako cizorodý objekt. Hemocyty nebyly prokázány v prostoru mezi mikrovily, protože to neumožňují velikostní poměry. Tegumentální vrstva cytoplasmy obsahuje velké množství volných ribozómů. Zanořená těla buněk povrchu obsahují klasické organely (jádro, endoplasmatické retikulum, mitochondrie) a nevelké množství různých měchýřků. U mladé sporocysty, která opustila vajíčko v podmínkách *in vitro*, nebyl pozorován pohyb a ultrastrukturálně nebyla prokázána svalovina (Murrills a kol. 1985b). Svalovina se ale vyskytovala u sporocysty vyvíjející se v plži po týdnu (Murrills a kol. 1988). Příčinou je růst a vývoj sporocysty a potřeba pohybu v plži. K tomu je vyvinutá svalovina nezbytná. Ve sporocystě se dále vyskytují zárodečné buňky (obr. 1E). Jsou ohraničeny výběžky povrchu (obr. 1D). Obsahují volné ribozómy a α -glykogen, který jim poskytuje výživu během vývoje. Po mitotickém dělení se buňky diferencují v jednotlivé buňky těl dceřinných sporocyst.

Operkulární výběžek je další velmi charakteristickou součástí vajíčka (obr. 1B). Operkulární výběžek je u báze spojen s vaječnou kapsulí a vybíhá od operkula kolem sporocysty, přičemž končí opět v blízkosti spojení operkula s vaječnou kapsulí (Murrills a kol. 1985a). Jeho tvar je v průřezu oválný. Slouží k injikaci sporocysty epitelem střeva do hemocelu plže, přičemž mění svůj tvar a délku. Operkulární výběžek v evoluci motolic zřejmě předchází existenci miracidia (Murrills a kol. 1985a). Nejsou ale informace, zda je něco z operkulárního výběžku u miracidia zachováno.

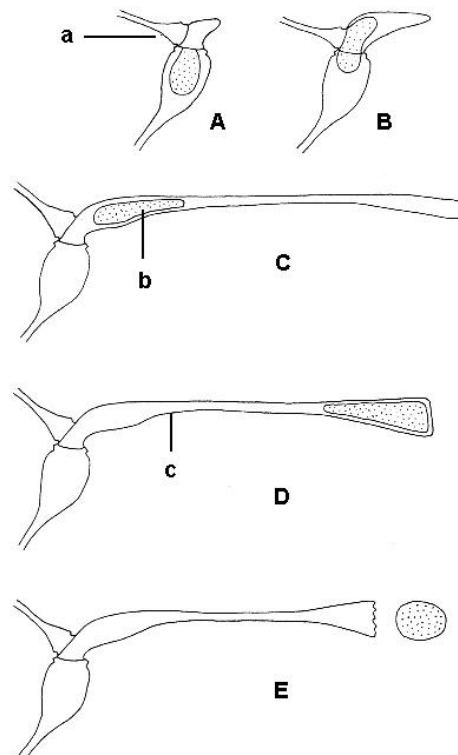
Mezi dvě buňky vyskytující se vně sporocysty patří buňka obsahující α -glykogen (obr. 1F) a buňka obsahující nerůznější typy inkluzí. Glykogenní buňka obsahuje kromě velkého množství α -glykogenu také klasické buněčné organely (jádro se shluky chromatinu, endoplasmatické retikulum, nevelké množství mitochondrií a měchýřků rozptýlených volně v cytoplasmě). Tato buňka poskytuje zásobní látky vyvíjející se sporocystě a umožňuje přežití vajíčka určitou dobu před pozřením plžem. Po uvolnění sporocysty zůstává ve vaječných obalech. Druhá buňka obsahuje nejrůznější inkluze velké asi 0,3-0,7 μm , které jsou nestejně elektronové denzity. Dále obsahuje jádro, endoplasmatické retikulum a mitochondrie. Tato buňka je asociovaná s operkulárním výběžkem. Předpokládá se, že obě tyto buňky mají vliv na vychlípění operkulárního výběžku z vajíčka. Ten je u své báze spojen s vaječnou kapsulí

a probíhá téměř pod celým jejím povrchem. Jednotlivé části vajíčka se musí tedy přeskupit, aby se operkulární výběžek mohl dostat z vajíčka (Murrills a kol. 1985b).

1.2. Líhnutí vajíčka a vývoj dalších stádií

Vajíčko musí být plžem pozřeno. Líhnutí vajíčka probíhá ve střevě během asi 10 vteřin. Nemusí nastat u všech vajíček, která se zdají plně embryonovaná. Líhnutí zahrnuje otevření operkula a formování operkulárního výběžku v asi 75 μm dlouhou trubici, z jejíhož konce je injikována sporocysta do hemocelu plže (Murrills a kol. 1985b). Líhnutí ve střevě plže je stimulováno redukčními podmínkami a alkalickým pH, a také *in vitro* různými medii.

Průběh injikace sporocysty do hemocelu ukazuje obr. 2. Operkulum se otevře (obr. 2A). Operkulární výběžek v počáteční fázi formuje širší kónickou strukturu, do které se uvolní sporocysta (obr. 2A a 2B). Zejména v počátečních fázích se operkulární výběžek protáhne velmi vysokou rychlostí (až 650 $\mu\text{m/s}$) v trubici dlouhou okolo 140 μm a 3 μm širokou (obr. 2C). Tato vysoká rychlost a úzký tvar umožňuje perforaci stěny střeva plže. Sporocysta se pohybuje z vajíčka směrem ke konci operkulárního výběžku (obr. 2D). Jakmile jej dosáhne,



Obr. 2. Schéma injikace sporocysty do hemocelu plže. A operkulární výběžek formuje kónickou strukturu po otevření operkula, B uvolňování sporocysty z vaječných obalů do operkulárního výběžku, C protažení operkulárního výběžku, D zkrácení operkulárního výběžku po dosažení konce sporocystou, E uvolnění sporocysty do hemocelu plže, a operkulum, b sporocysta, c operkulární výběžek. (Murrills a kol. 1985b, upraveno).

operkulární výběžek se zkrátí na délku mezi 65-85 μm . Konec výběžku se protrhne a sporocysta je uvolněna do hemocelu (obr. 2E).

Následující vývoj od stadia mateřské sporocysty po stadium cercárie citovaná literatura popisuje velmi nedostatečně. O sporocystách a rediích existuje málo informací, protože jejich výzkum je nesnadný a nebývají intenzivně studovány (Niewiadowska 1995). Jednoznačně není ani doloženo, kde k jednotlivým asexuálním množením dochází. Výskyt sporocyst v plži *Radix peregra* byl studován po jednom a sedmi dnech od infekce (Murrills a kol. 1988). Po jednom dni byly sporocysty prokázány volně v hemocelu v nejbližším okolí střeva, tedy v okolí místa injikace. Po sedmi dnech od infekce byly sporocysty navíc prokázány v plášti a okolí hepatopankreatu. Sporocysty následně nejpravděpodobněji proniknou do hepatopankreatu plže a produkují generaci dceřinných sporocyst. Citovaná literatura již lokalizaci v hepatopankreatu neuvádí. Obecně by vývoj následujících stádií měly zajišťovat zárodečné buňky. Dle informací o jiných druzích motolic se po mitotickém dělení zárodečných buněk v mateřské sporocystě jednotlivé buňky diferencují v buňky sporocysty dceřinné. Některé zůstávají jako buňky zárodečné i ve sporocystě dceřinné. Uvolněná stadia dceřinných sporocyst v hepatopankreatu dále rostou a vyvíjí se. Podobným způsobem vznikají v dceřinných sporocystách stadia redií. Počty jednotlivých generací nejsou stálé, neboť má parazit snahu tvořit jejich největší počet.

Zralé redie jsou v průměru 1800 μm dlouhé a mají vyvinutou ústní přísavku, vakovité střevo a zárodečné buňky. V rediích se formuje 3-6 cercárií (Našincová 1992). Tegumentem redií prostupují části čtyř typů smyslových buněk, které byly popsány ultrastrukturálně (Czubaj a Niewiadowska 1988).

Z redií jsou uvolňovány cercárie. Uvádí se, že jsou uvolňovány neúplně zformované a úplné zralosti dosahují mimo redie v hepatopankreatu plže (Žďárská 1964, 1986, Našincová 1992). Obecně jsou cercárie stadia adaptovaná především na život ve vodním prostředí a většinou jsou uvolňovány již plně zformované, přičemž často nepřijímají potravu. Cercárie *N. attenuatus* by proto pro svůj další vývoj v hepatopankreatu plže musely přijímat potravu, nebo využívat vlastní energetické zásoby. Citovaná literatura neuvádí ani jednu možnost. Neúplně zformované cercárie mají vyvinuty v přední části těla dvě nepravidelné oční skvrny. Trávicí soustavu tvoří krátký jícen, který se za očními skvrnami dělí ve dvě větve střeva, dosahující až k exkrecnímu měchýři (Žďárská 1964). Exkreční soustava je protonefridiálního typu a skládá se z plaménkových buněk, dvou exkrečních kanálek, které vedou od předního konce těla do exkrečního měchýře na zadní konec těla, a od něho vyúsťuje na povrch rozdvojený exkreční kanálek v přední třetině ocásku (Žďárská 1964, Našincová 1992).

Nezformované cercárie mají také kratší ocas a je možné odlišit jednotlivé cystogenní žlázové buňky (Žďárská 1986). Zformované cercárie mají navíc vyvinuté tři oční skvrny, základy reprodukční soustavy, delší ocas a posteriorně-laterální žlázy, které se vyskytují v těle cercárie na posteriorním konci směrem k dorzální straně. Cystogenní žlázové buňky nejsou již viditelné, protože je překrývá hnědý tělní pigment (Žďárská 1964).

1.3. Spektrum mezipřenositelů

Jako vhodné mezipřenositele pro vývoj motolice *N. attenuatus* jsou zástupci čeledi Lymnaeidae – *Lymnaea stagnalis* (Niewiadomska a kol. 1997), *Radix auricularia* (Našincová 1992), *Stagnicola palustris* (Žďárská 1964). Mnoho autorů také uvádí jako možného mezipřenositele plže *Radix peregra* (Wright a Bennet 1964, Radlett 1979, Evans 1981, Murrills a kol. 1988, Väyrynen a kol. 2000).

V systematické plžů rodu *Radix* existují nejasnosti (Bargues a kol. 2001) a vzhledem k tomu je nutné opatrně přistupovat k častým informacím o výskytu v plži *R. peregra*.

Přestože je *N. attenuatus* často představován jako hojně se vyskytující parazit, při vyšetřování plžů z přírody tomu tak nebývá. Z 243 plžů *L. stagnalis* vylučovali cercárie *N. attenuatus* pouze dva (Faltýnková 2005).

V sezóně 2006 se nám podařilo získat mezipřenositelské plže *N. attenuatus* zatím ze tří lokalit: v plžích *S. palustris* v rybníku Švarcemberk a Hliníř na Třeboňsku a v plžích *S. palustris* a *L. stagnalis* v rybníku Žoldánka na Blatné.

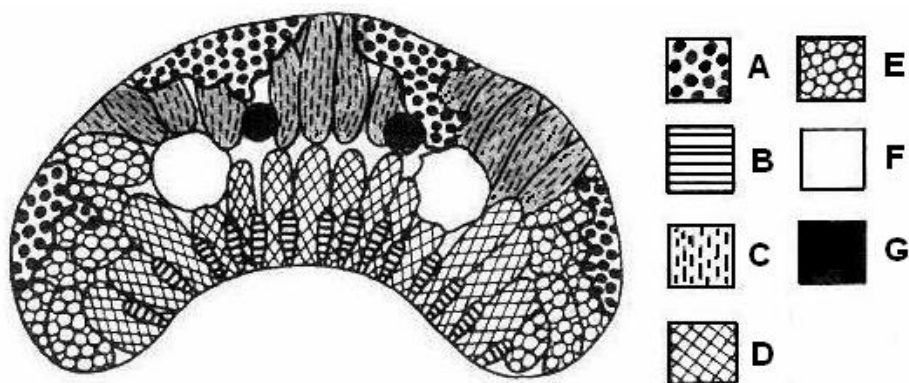
2. VÝVOJ VE VNĚJŠÍM PROSTŘEDÍ

Po uvolnění cercárie motolice *N. attenuatus* z mezihostitelského plže do vnějšího prostředí je dalším krokem tvorba metacercárie procesem encystace. Tvorba metacercárie probíhá na vhodném pevném povrchu, a ve srovnání s jinými skupinami motolic je tím nahrazena aktivní penetrace cercárie do definitivního hostitele nebo do druhého mezihostitele. Nejčastěji je povrchem pro encystaci vegetace, protože tvoří potravu pro definitivní hostitele. Těmi jsou hlavně vodní ptáci z řádu vrubozobých (Anseriformes). Metacercárie encystované na vegetaci a jiných pevných předmětech vnějšího prostředí se také nazývají adoleskárie. Jiným vhodným povrchem může být ulita plže nebo stěna nádoby v laboratorních podmínkách (Wright a Bennet 1964).

Encystace je většinou zahájena bezprostředně po kontaktu cercárie s vhodným povrchem. Pokud není encystace zahájena ihned, stane se tak do hodiny nebo vzácněji déle (Southgate 1971). Při encystaci často metacercárie tvoří shluky (Graczyk a Shiff 1994). Nákaza definitivního hostitele je po pozření těchto shluků masivnější. Metacercárie se mohou vytvořit za nepříznivých podmínek i bez kontaktu s pevným povrchem (Morley a kol. 2002).

2.1. Cystogenní žlázné buňky

Cystogenní žlázné buňky jsou různými autory označovány nestejným způsobem (Žďárská 1970, 1986, Southgate 1971). Také jsou uváděny jiné počty těchto buněk. Pro zjednodušení byly některé buňky označeny jako typ 1, 2, 3 a 4 (Southgate 1971). Dalšími typy jsou posteriorně-laterální žlázy, orální žlázné buňky a laterální buňky. Tyto buňky se vyskytují



Obr. 3 Schématický řez tělem cercárie před uvolněním obsahu cystogenních žláznových buněk. A buňky typu 1 a 2, B buňky typu 3, C, D buňky typu 4, E laterální buňky, F exkreční soustava, G trávicí soustava. (Žďárská 1970, upraveno).

v parenchymu těla cercárie (obr. 3). Jsou odlišitelné až u cercárií, které již opustily redie (Žďárská 1986).

Cystogenní žlázové buňky byly studovány z hlediska své ultrastruktury (Southgate 1971) a histochemického složení (Žďárská 1970). Buňky typu 1 a 2 se vyskytují v parenchymu na dorzální straně těla cercárie. Buňky typu 1 se vyskytují u nezralé cercárie, která je ještě v mezihostitelském plži, ve čtyřech podélných řadách a produkují asi 0,5 μm velká elektronově lucidní tělíška označeny jako typ 1 (Southgate 1971). Buňky typu 2 produkují sekreční granule typu 2. Oba typy buněk reagují pozitivně po použití AB-PAS metody (Alcian blue-Periodic acid-Schiff technika pro detekci kyselých mukosubstancí a polysacharidů). Granule se barví modře, a to dokazuje přítomnost kyselých mukosubstancí s karboxylovými skupinami a skupinami se sírou, které jsou odolné proti působení různých enzymů (např. hyaluronidáza). Cytoplasma se barví červeně, čímž jsou prokázány polysacharidy a neutrální mukosubstance. Dále se v granulích vyskytují proteiny s malým množstvím tyrozinu a tryptofanu (Žďárská 1970).

Buňky typu 3 se vyskytují v parenchymu na ventrální straně cercárie v prostoru od ústní přísavky k ocasu. Produkují sekreční granule typu 3, které jsou od předchozích dvou typů ultrastrukturálně odlišné. Skládají se z elektrondenzní části a z části, která se ultrastrukturálně jeví jako pruhovaná. Pruhy vykazují variabilitu v šířce a odstupu (Southgate 1971). Histochemické techniky v granulích typu 3 neprokázaly přítomnost mukosubstancí. V proteinech byly prokázány aminokyseliny se sírou, tyrozin a tryptofan. Po použití Sudan black B a Luxol blue metody se modro-černým zbarvením prokázaly lipidy (Žďárská 1970).

Buňky typu 4 se vyskytují na dorzální straně pod buňkami typu 2 a na ventrální straně nad buňkami typu 3. Laterální buňky se vyskytují na laterální straně těla cercárie. Sekreční granule buněk typu 4 vykazují variabilitu v obsahu i tvaru. Ultrastrukturálně se granule jeví jako pruhované, přičemž mezi granulemi existuje rozdíl v šířce, elektronové denzitě a prostorovém uspořádání pruhů. Ultrastrukturální stavba laterálních buněk nebyla zjištěna (Southgate 1971). Cytoplasma buněk typu 4 a laterálních buněk obsahuje velké množství glykogenu. Neutrální mukosubstance byly prokázány v laterálních buňkách metodou PAS. Proteiny vyskytující se v buňkách typu 4 a laterálních buňkách obsahují tyrozin, tryptofan a další aminokyseliny se sírou. Dále zde byly prokázány lipidy, které ale chybí v laterálních buňkách (Žďárská 1970).

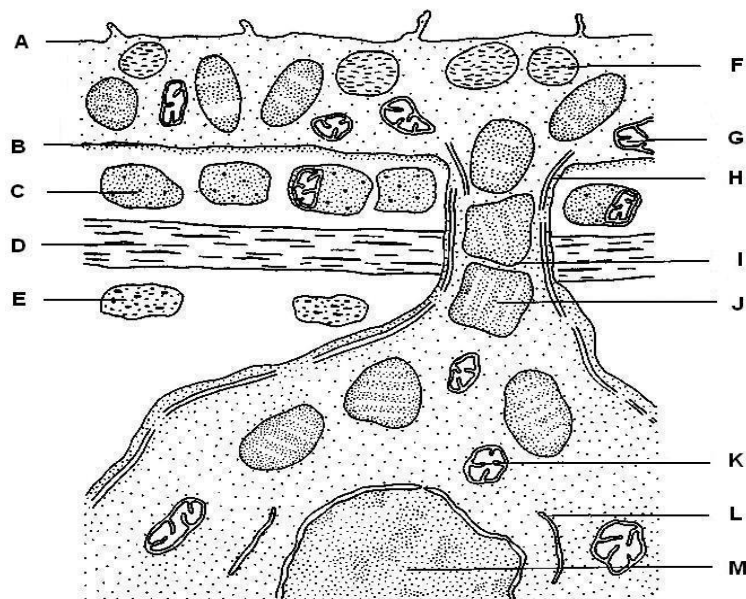
Posterioerně-laterální žlázy jsou dvě žlázové buňky. Sekreční granule jsou dle TEM uspořádány ve čtyřech řadách. Mezi vnější a vnitřní vrstvou je vždy vchlípená cytoplasmatická membrána buňky a tvoří úzký prostor. Do tohoto prostoru jsou uvolňovány

sekreční granule. Okolo těchto buněk je svalovina, která umožňuje svojí kontrakcí regulovat uvolňování granulí (Southgate 1971). Histochemická analýza zjistila přítomnost neutrálních mukosubstancí (Žďárská 1970).

Orální žlázné buňky jsou lokalizovány ve ventrolaterální části ústní přísavky a mezi ústní přísavkou a obloukem exkrece soustavy. Tyto buňky jsou kyjovitého tvaru a jejich přesný počet nebyl determinován. Sekrečním produktem jsou amorfní, asi 0,2 μm velká tělíska, která jsou svým obsahem podobná sekretům posteriorně–laterálních žláz, protože také obsahují neutrální mukosubstance (Southgate 1971).

2.2. Průběh encystace

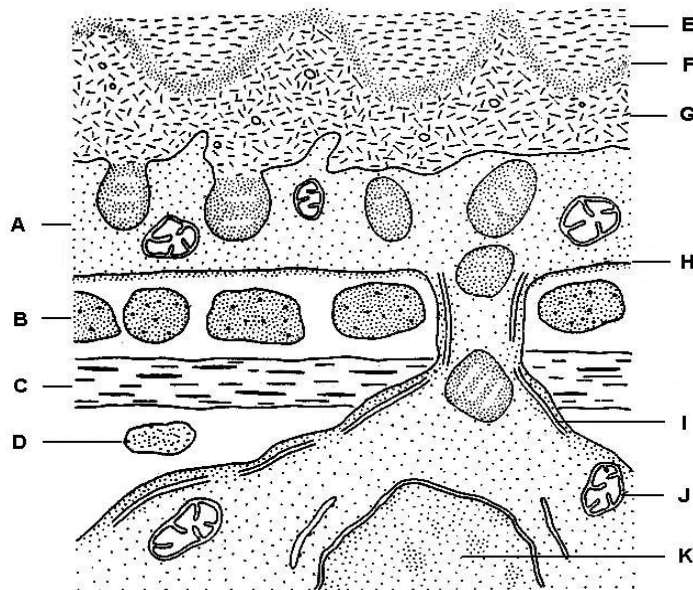
Encystace probíhá standardně na pevném podkladu. Cerkárie se k němu přichytí a její tělo se zakulatí. Cystogenní žlázné buňky všech čtyř typů postupně migrují parenchymem a svalovinou cercárie, kde následně jejich výběžek cytoplasmatické membrány splyne se spodní membránou tegumentu a vytvoří se cytoplasmatický spoj, kterým jsou sekreční granule transportovány do tegumentu (obr. 4). Výjimku tvoří posteriorně–laterální žlázy



Obr. 4. Transport sekrečních granulí do tegumentu. A svrchní membrána tegumentu, B spodní membrána tegumentu, C okružní svalová vlákna D podélná svalová vlákna, E šikmá svalová vlákna, F sekreční tělíska typu 1, G mitochondrie v tegumentu, H mikrotubuly, I cytoplasmatický spoj, J sekreční granule typu 2, K mitochondrie v cytoplasmě cystogenní buňky, L hladké endoplasmatické retikulum, M jádro. (Southgate 1971, upraveno).

a orální žlázné buňky, jejichž obsah je transportován přímo do vnějšího prostředí bez pasáže tegumentem. Posun granulí do tegumentu je usnadňován svalovou kontrakcí a zřejmě i mikrotubuly, které jsou podél transportního cytoplasmatického spoje (Southgate 1971).

Tegument může pojmout pouze určité množství sekrečních granulí. Jejich množství se v tegumentu zvětšuje a granule nejbližší povrchu následně splynou se svrchní membránou tegumentu. Jejich obsah je exocytózou uvolněn na povrch. Tento typ sekrece se nazývá apokrinní. Na povrchu dojde ke kontaktu mezi obsahy cystogenních žlázových buněk a jejich následné fúzi (Southgate 1971). Tím jsou formovány stěny cysty (obr. 5).

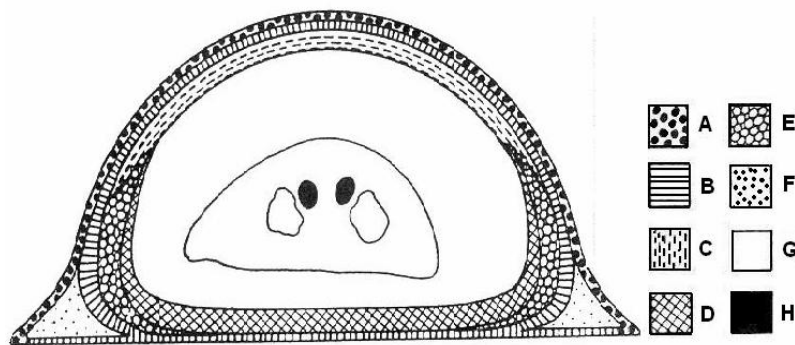


Obr. 5. Formování stěn cysty. A tegument, B okružní svalová vlákna, C podélná svalová vlákna, D šikmá svalová vlákna, E externí stěna cysty na dorzální straně, F elektronově denzní část externí stěny, G střední stěna cysty, H spodní membrána tegumentu, I mikrotubuly, J mitochondrie v cytoplasmě cystogenní buňky, K jádro. (Southgate 1971, upraveno).

Sekrety buněk typu 1, 2 a 3 nejprve formují vnější mukoidní obal a externí stěnu cysty. Externí stěnu tvoří neutrální mukosubstance, proteiny s tyrozinem a tryptofanem a lipidy (Žďárská 1970). Před jejím dokončením je od těla cercárie oddělen ocas, který je schopen se nějakou dobu ještě samostatně pohybovat (Žďárská 1970, 1986, Southgate 1971, Graczyk a Shiff 1993a). Smyslem pohybu ocásku je odreagovat možné predátory metacerkárií (např. ryby, perloočky). Následně je formována granulemi typu 2 a 3 střední stěna a interní stěna cysty granulemi typu 4. Interní stěna poskytuje největší ochranu metacerkárii a označuje se také jako keratinová vrstva. Metacerkárie je infekční ihned po svém vytvoření (Žďárská 1986).

2.3. Různé pohledy na průběh encystace

Průběh encystace je popisován nejednotně (Žďárská 1970, 1986, Southgate 1971, Graczyk a Shiff 1993a). Rozdílně je uváděn postup uvolňování granulí jednotlivých cystogenních žlázových buněk do tegumentu, způsob přichycení k podkladu a formování všech stěn cysty včetně jejich počtu. Na dorzální straně jsou tři vrstvy, na laterálních stranách pět vrstev a na ventrální straně dvě vrstvy (obr. 6) (Žďárská 1970). Southgate (1971) uvádí, že cysta okolo metacerkárie je tvořena třemi vrstvami a ventro-laterálním prstencem v interní stěně cysty.

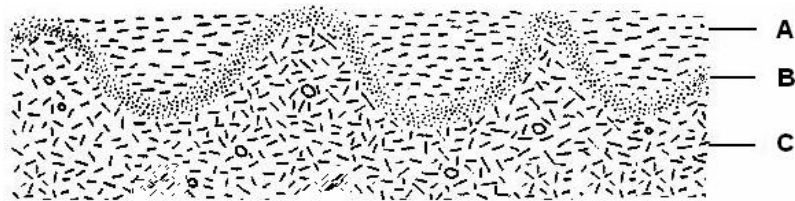


Obr. 6. Schématický řez metacerkárií **A** externí stěna na dorzální straně **B** externí stěna na ventrální straně a střední vrstva po celém obvodu **C** interní vrstva na dorzální straně, **D** interní vrstva na ventrální straně a na laterální straně, **E** ventro-laterální prstenec, **F** široký okraj tvořený částí sekrece buněk typu 1 a 2, **G** exkretční soustava metacerkárie, **H** trávicí soustava metacerkárie. (Žďárská 1970, upraveno).

Uvolňování sekrečních granulí do tegumentu je zahájeno už v mezihostitelském plži. Buňky typu 1 a 2 uvolní úplně svůj obsah do tegumentu na dorzální stranu cercárie a současně buňky typu 3 uvolní část svých sekretů do tegumentu na ventrální stranu cercárie před opuštěním mezihostitelského plže (Žďárská 1970). Naproti tomu je uváděno, že pouze buňky typu 1 uvolní svůj obsah do tegumentu v mezihostiteli a buňky typu 2 a 3 až ve vnějším prostředí (Southgate 1971). Sekrety orálních žlázových buněk jsou uvolněny do dutiny ústní přísavky také v mezihostiteli (Žďárská 1970, 1986).

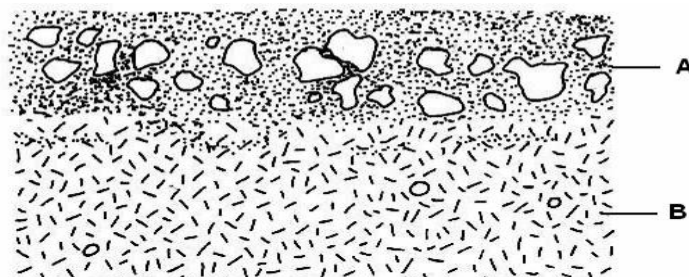
Přichycení k podkladu probíhá pomocí posteriorně-laterálních žláz a následného uvolnění jejich obsahu. Poté se cercárie přichytí pomocí ústní přísavky (Žďárská 1970, 1986). Existují informace, že encystace je zahájena poté, co se cercárie přichytí nejprve pomocí ústní přísavky, přičemž ale není uvedena účast posteriorně-laterálních žláz v zahájení encystace (Graczyk a Shiff 1993a). Tvorba externí stěny cysty probíhá na dorzální a ventrální straně po oddělení tegumentu se sekrečními granulemi typu 1, 2 a 3, přičemž část sekretů buněk typu 1

a 2 tvoří široké okraje na laterálních stranách (obr. 6F) (Žďárská 1970). Povrch je však tvořen u motolic od stadia sporocysty tegumentem a nemůže být oddělen. Informaci o oddělení tegumentu proto nelze považovat za správnou. Jiný pohled ukazuje, že sekreční tělíska typu 1 produkují externí stěnu cysty na dorzální straně, která má dvě části (Southgate 1971). První část je elektronově lucidní, z fibrózního materiálu a druhá část je tenká a elektronově densní (obr. 7A,B). Sekreční granula typu 2 formují střední vrstvu na dorzální straně (obr. 7C) a tato



Obr. 7. Externí a střední stěny cysty na dorzální straně. A vnější část externí stěny, **B** elektronově densní část vnější stěny **C** střední stěna. (Southgate 1971, upraveno).

vrstva tvoří na laterálních stranách velmi široký okraj. Sekreční granule typu 3 produkují na ventrální straně externí a střední stěnu cysty (obr. 8A,B). Na laterální straně dochází k částečnému smíšení obsahu buněk typu 2 a 3.



Obr. 8. Externí a střední stěny cysty na ventrální straně. A vnější stěna cysty **B** střední stěna cysty. (Southgate 1971, upraveno).

Poté co je externí stěna cysty dokončena, cercárie rotuje a uvolňuje z buněk typu 3 zbytek sekretů do tegumentu na ventrální straně. Ty tvoří střední vrstvu, a ta jako jediná probíhá po celém obvodu cysty (obr. 6B). Na ventrální straně tyto sekrety splynou s externí vrstvou, kterou již tyto buňky tvoří svým částečným vyprázdněním na začátku encystace (Žďárská 1970). Toto pozorování nebylo ale potvrzeno ultrastrukturálně a buňky typu 3 tvoří pouze stěny cysty na ventrální straně, nikoliv po celém obvodu cysty (Southgate 1971).

Za pokračující rotace cercárie je formována i interní stěna cysty. Buňky typu 4 formují

pouze tu část, kde jsou lokalizovány (obr. 6C, D, E), tzn. dorzální buňky formují dorzální stěnu, laterální buňky formují tzv. ventro-laterální prstenec a ventrální buňky formují ventrální stěnu, která je ale pohybem cercárie rozprostřena i na laterální stranu (Žďárská 1970). Tvorba interní stěny cysty je také vysvětlována jiným způsobem (Southgate 1971). Sekreční obsah buněk typu 4 je sice přemístěn do tegumentu v místě lokalizace těchto buněk, tedy na dorzální a ventrální straně, ale vlivem rotace cercárie a zřejmě i mikrotubulů, které do tegumentu z buněk zasahují, je obsah v tegumentu smíšen. Poté je obsah uvolněn vně tegumentu a formuje interní vrstvu, která je stejná po celém obvodu. Obsah laterálních buněk a navíc částečný obsah posteriorně–laterálních buněk je přes interní vrstvu uvolněn na ventro-laterální pozici, kde tvoří tzv. ventro-laterální prstenec (Southgate 1967). Existuje tedy minimálně dvojí pohled na průběh encystace.

2.4. Vliv vnějších faktorů na tvorbu a přežívání metacerkárie

Tvorba metacerkárie a její následná schopnost přežívání a infekce definitivního hostitele je ovlivněna různými faktory. Úspěšné dokončení tvorby cysty je ovlivněno především kvalitou vody (Evans 1982, Morley a kol. 2002). Těžké kovy v prostředí (např. kadmium, zinek, měď) zejména v industriálních zemích vodu znečišťují. Jejich účinkem je zabráněno uvolnění obsahu cystogenních žláзовých buněk. Parazit hyne před dokončením encystace. Naopak po dokončení encystace je vliv chemických a jiných faktorů minimální (Morley a kol. 2002).

Cerkárie se může encystovat samostatně, a to i bez podkladu, nebo se více cercárií encystuje blízko sebe a tvoří shluky metacerkárií (Morley a kol. 2002). Metacerkárie se vytvořily samostatně bez podkladu v experimentálních roztocích s nízkým obsahem kadmia a zinku (Morley a kol. 2002). Nejčastější je tvorba shluků cyst, jejichž počet může být až 35 na 1 cm². Prostor mezi cystami je tvořen mukoidním materiálem, který je formován na počátku encystace. Jedná se hlavně o glykoproteiny rozpustné ve vodě, které při riziku vyschnutí zajišťují ochranu a dlouhodobé přežívání (Graczyk a Shiff 1994). Cysty ve shlucích jsou schopné nákazy definitivního hostitele i 24 týdnů po encystaci. Tvorba shluků cyst indikuje, že cercárie rozeznávají místo své encystace. Cercárie, kterým byla uměle prodloužena doba volného pohybu ve vodě (např. použitím míchadla v laboratorní kádince), nebyly schopné tvořit shluky cyst a encystovaly se samostatně. Jejich schopnost přežívání byla snížena na 12 týdnů po encystaci, protože jejich externí stěna cysty a mukoidní vrstva byla velmi tenká (Graczyk a Shiff 1994). Expozice této cysty vzduchu snížila její infekceschopnost na jeden den. Naopak cysty ve shlucích přežijí expozici vzduchu tři dny.

3. VÝVOJ V DEFINITIVNÍM HOSTITELI

Metacerkárie vytvořené ve vnějším prostředí musí být pro další vývoj pozřeny definitivním hostitelem. Definitivní hostitelé jsou především vodní ptáci z řádu vrubozobých (Anseriformes) (Wright a Bennet 1964). Metacerkárie se v trávící soustavě ptáka excystují a uvolněné motolice zaujímají místo své konečné lokalizace. Na rozdíl od některých jiných druhů motolic *N. attenuatus* pro dosažení místa své parazitace i během parazitace příliš nemigruje (Radlett 1979).

3.1. Excystace a dosažení konečné lokalizace

Po perorálním pozření metacerkárií následuje jejich posun jednotlivými částmi trávícího traktu ptáka, kterými jsou jícen, vole, žláznatý žaludek, svalnatý žaludek, dvanáctník a tenké střevo (Graczyk a Shiff 1993a). Mezi koncem tenkého střeva a začátkem tlustého střeva je jeden pár slepých střev. Slepé střevo je dlouhé okolo několika centimetrů (McNab 1973). Při této dlouhé pasáži je metacerkárie chráněna odolnými stěnami cysty např. proti působení různých enzymů. Excystace je stimulována různými faktory. Těmi jsou žlučové soli, trávící enzymy, vhodná teplota, oxid uhličitý a pH (Smyth a Halton 1983).

Úspěšné excystace může být dosaženo také v různých médiích *in vitro*. Ze vzorku 100 cyst se excystovalo *in vitro* úspěšně téměř 79 % (Graczyk a Shiff 1993a). Optimální byl následující postup: expozice cyst dvě hodiny v EDTA–20 (vodný roztok 1:2 EDTA-20 / voda) 15 minut ve směsi 1% kyseliny chlorovodíkové a 1% pepsinu (pH 2) a dvě hodiny ve směsi 0,5% trypsinu a 0,5% žlučových solí. EDTA–20 je kationtový detergent, který rozpouští lipoproteiny a lipidy, a spolu s enzymy zahajuje *in vitro* excystaci v místech přímého přístupu k interní stěně cysty (oblast okolo ústní přísavky a odděleného ocasu). Vnější vrstva je následně fragmentována a odstraněna. Excystace poté pokračuje až do uvolnění motolice.

Excystace a lokalizace juvenilních a dospělých parazitů ve slepém střevě byla studována experimentálně v různých časových intervalech (Radlett 1979). Při experimentální infekci 200 metacerkáriemi bylo nalezeno okolo 50 dospělců (Graczyk a Shiff 1993b) a při infekcích 100 metacerkáriemi vykazoval počet nalezených dospělců variabilitu 3–100 (Wright a Bennet 1964). Excystace proběhla na začátku tlustého střeva, přičemž první metacerkárie této lokalizace dosáhla za tři hodiny po pozření. První juvenilní jedinci byly zaznamenáni v proximální oblasti slepého střeva až po čtyřech hodinách, takže se aktivně pohybují k otvorům slepého střeva z místa své excystace (Radlett 1979).

Motolice se postupně vyskytují v proximální, střední a distální části slepého střeva. Proximální část slepého střeva obsahuje dlouhé klky a mezi nimi se vyskytují juvenilní jedinci. Mohou být přichyceni ústní přísavkou a nebo se vyskytují volně. V této fázi jsou velcí asi 350 μm a nemají ještě vyvinuté ventrální papily (MacKinnon 1982c). Klky poskytují ochranu motolicím před jejich odstraněním vlivem peristaltiky a pohybu střevního obsahu. Ústní přísavkou přijímají potravu v podobě narušených buněk epitelu střeva, ale nezpůsobují jeho výrazné poškození. V proximální části slepého střeva setrvávají asi jeden den (Radlett 1979).

Následně se mezi druhým a třetím dnem vyskytují ve střední části slepého střeva. Jejich velikost je okolo 530 μm a někteří jsou rozšířeni vzhledem k velikostním poměrům i za klky slepého střeva do jeho lumen. V této fázi je také patrný vývoj vaječníku, varlat a žloutkových žláz (Radlett 1979).

Od druhého dne se na ventrální straně těla začínají formovat ventrální papily (MacKinnon 1982c). Ventrální papily jsou v různém počtu a uspořádání typické pro většinu zástupců čeledi Notocotylidae. Je možné je využít i jako znak pro rozlišení jednotlivých rodů. Mediánní řada se objevuje jako první. Jejich růst je intenzivní mezi pátým a osmým dnem, kdy je dokončen (Radlett 1980).

Počet plně vyvinutých papil je v mediánní řadě 15 a v laterálních řadách 14. Papily se skládají hlavně z pyriformních buněk a svaloviny. Povrch papil je kryt tegumentem a do každé papily vybíhá exkreceční kanálek (MacKinnon 1982a). Pyriformní buňky obsahují velké množství mitochondrií a hemoglobinu. Histochemicky byly prokázány respirační enzymy (např. sukcinát dehydrogenáza, glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, cytochrom oxidáza) (MacKinnon 1982b). Hemoglobin váže a uvolňuje kyslík a je také schopen reoxygenace po obnovení přítomnosti kyslíku. Hemoglobin také způsobuje růžové až červené zbarvení ventrální strany těla a laterálních okrajů (MacKinnon 1980).

Jsou uváděny různé možnosti funkce ventrálních papil, a to např. při přichycení na epitel slepého střeva či absorpci některých látek ze střevního obsahu (Radlett 1979, 1980). Další experimenty ale prokázaly, že *N. attenuatus* je schopen přichytit se i na jiném povrchu než je slepé střevo (stěna laboratorní nádoby), přičemž k tomu využívá hlavně laterální okraje těla (MacKinnon 1982a). Tvar těla je přitom konkávní. Také se nepotvrdila možnost funkce papil v absorpci látek ze střevního obsahu, neboť se nezjistila přítomnost enzymů esteráz a fosfatáz (esterázy hydrolyzují estery nižších mastných kyselin a fosfatázy hydrolyzují nukleotidy) (MacKinnon 1982b). Hlavní funkcí papil je respirace, protože v papilách byly prokázány respirační enzymy a hemoglobin (MacKinnon 1982a). Když se papily zatáhnou do těla jsou

v blízkosti jednotlivých orgánů a poskytují jim kyslík. Je tím také podporováno formování vajíček v děloze (Radlett 1979).

Motolice také od osmého dne zaujímají konečnou pozici v distální části slepého střeva. Zde mění polohu i způsob přichycení. Klky jsou v této části ploché a krátké. Povrch je téměř rovný. *N. attenuatus* je přichycen paralelně se stěnou slepého střeva v pravém úhlu ke klkům (Radlett 1979).

Pro pokračování životního cyklu je nezbytné uvolnění vajíček do vnějšího prostředí. Obecně se vajíčka tvoří v ootypu, kde splyne vaječná buňka se spermií. Žloutkové buňky se podílejí na tvorbě vaječných obalů. Při posunu kličkami dělohy pokračuje formování a vajíčka jsou v distálních kličkách dělohy plně embryonovaná.

O formování vajíček motolic z čeledi Notocotylidae není příliš mnoho poznatků (Wittrock 1982). Studie o průběhu formování vajíček nebyla u motolice *N. attenuatus* dosud provedena. U druhu *Ogmocotyle indica* ze stejné čeledi Notocotylidae se vnější a vnitřní vaječný obal a operkulum formuje v ootypu. Filamenta se začínají formovat v proximálních kličkách dělohy z obsahu žloutkových žláz. Operkulární výběžek se začíná formovat pod operkulem a spojuje se s vyvíjejícím se embryem také v proximální části dělohy. V distálních kličkách dělohy jsou filamenta plně vyvinutá a vnější stěna vajíčka je širší (Coil 1966). Podobně se také formují vajíčka motolice *Desmogonius desmogonius* z čeledi Pronocephalidae (Coil a Reid 1965).

První vajíčka motolice *N. attenuatus* byla nalezena volně ve střevním obsahu distální části slepého střeva 16 dní po infekci. Vajíčka jsou spojena filamenty do shluků, a tak se i pohybují střevním obsahem do uvolnění. V jednom gramu trusu bylo možné nalézt až 160 vajíček při maximální produkci (Graczyk a Shiff 1993b). Největší velikost dospělce byla 3400 μm . Vajíčka jsou ve vnějším prostředí pozřena plžem a cyklus se opakuje.

3.2 Spektrum definitivních hostitelů

Nálezy dospělců *N. attenuatus* jsou v České republice uváděny u následujících druhů: *Anas platyrhynchos*, *A. clypeata* (Vojtek 1981), *Aythya ferina* (Tenora a kol. 1987). V jiných evropských zemích byl *N. attenuatus* zaznamenán při různých studiích parazitických helmintů definitivních hostitelů např. na Slovensku u *Anser albifrons* (Macko a kol. 2002), v Srbsku u *Fulica atra* (Kulišic a kol. 2004) a Nizozemí u *Somateria mollissima* (Borgsteede a kol. 2005). *N. attenuatus* byl také nalezen ojedinele v Nizozemí u *Motacilla alba*, který je zástupce řádu Passeriformes (Borgsteede a kol. 2000). Existuje i záznam o výskytu až v Jižní Korei u *A. platyrhynchos* (Eom a Rim 1984). *N. attenuatus* se tedy vyskytuje kosmopolitně.

Nevhodní definitivní hostitelé pro vývoj motolice *N. attenuatus* jsou hlodavci. Hlodavci mohou být definitivní hostitelé jiných druhů (Vicente a kol. 1985). V hlodavcích však existují podmínky pro excystaci, ale ne pro přežití, protože nebyli nalezeni živí jedinci (Graczyk a Shiff 1993b).

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly shrnuty dosavadní poznatky o ontogenetickém vývoji motolice *N. attenuatus*, z nichž nejdůležitější jsou následující:

- V životním cyklu se nevyskytuje stádium miracidia, ale ve vajíčku je sporocysta, která je pomocí operkulárního výběžku injikována stěnou střeva do hemocelu plže. Tento způsob je mezi motolicemi ojedinělý.
- Vývoj od stádia mateřské sporocysty po stádium cercárie probíhá v hepatopankreatu plže, přičemž informace k této fázi vývoje jsou velmi nedostatečné.
- Cercárie se uvolňují z redií jako neúplně zformované a své zralosti dosahují až dalším vývojem v hepatopankreatu plže.
- Cercárie tvoří ve vnějším prostředí metacercárie, přičemž přesný průběh encystace je diskutabilní.
- Excystace metacercárií probíhá v trávicí traktu ptáka, ale ani pro tento proces neexistují solidní údaje.
- Dospělci, parazitující se ve slepých střevech ptáka, jsou typičtí přítomností ventrálních papil, které plní funkci v respiraci.

Na tuto bakalářskou práci bude navazovat práce diplomová. Pro naše studium motolice *N. attenuatus* bude nezbytné zavedení laboratorního cyklu a první pokusy již v současné době probíhají. Snahou bude získávat infikované plže z přírody z různých lokalit. Studium v mezihostitelském plži by mělo přinést více informací o jednotlivých stádiích a v úvahu přichází i jejich *in vitro* kultivace. Zaměřit bychom se chtěli na proces transformace cercárie-metacercárie-dospělec, přičemž lze provést *in vitro* excystaci a následně parazity *in vitro* kultivovat.

Přehled citované literatury

- Bargues, M. D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R. A., Pointier, J. P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C. a Mas-Coma, S. (2001):** European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 85-107
- Borgsteede, F. H. M., Okulewicz, A. a Okulewicz, J. (2000):** A study of the helminth fauna of birds belonging to the Passeriformes in the Netherlands. *Acta Parasitologica* 45: 14-21.
- Borgsteede, F. H. M., Okulewicz, A., Zoun P. E. F. a Okulewicz, J. (2005):** The gastrointestinal helminth fauna of the eider duck (*Somateria mollissima* L.) in the Netherlands. *Helminthologia* 42: 83-87.
- Coil, W. H. a Reid, W. A. (1965):** *Desmogonius desmogonius* Stephens, 1911 (Pronocephalidae: Digenea), a redescription with observation on egg filament formation. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 25: 506-509.
- Coil, W. H. (1966):** Egg shell formation in the notocotylid trematode, *Ogmocotyle indica* (Bhalerao, 1942). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 27: 205-209.
- Czubaj, A. a Niewiadomska, K. (1988):** Types of sensory cells in *Notocotylus attenuatus* (Rud., 1809) rediae (Digenea, Notocotylidae). *Parasitology Research* 74: 243-249.
- Eom K., S. a Rim, H. J. (1984):** A study on the parasitic helminths of domestic duck (*Anas platyrhynchos* var. *domestica* Linnaeus) in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 22: 215-221.
- Evans, N. A. (1982):** Effects of copper and zinc on the life cycle of *Notocotylus attenuatus* (Digenea: Notocotylidae). *International Journal for Parasitology* 12: 363-369.
- Faltýnková A. (2005):** Larval trematodes (Digenea) in molluscs from small water bodies near České Budějovice, Czech Republic. *Acta Parasitologica* 50: 49-55.

- Graczyk, T. K. a Shiff, C. J. (1993a):** Excystment *in vitro* of *Notocotylus attenuatus* (Trematoda: Notocotyloidea) metacercariae. *The Journal of Parasitology* 79: 92-97.
- Graczyk, T. K. a Shiff, C. J. (1993b):** Experimental infection of domestic duck and rodents by *Notocotylus attenuatus* (Trematoda: Notocotylidae). *Journal of Wildlife Diseases* 29: 434-439.
- Graczyk, T. K. a Shiff, C. J. (1994):** Viability of *Notocotylus attenuatus* (Trematoda: Notocotylidae) metacercariae under adverse conditions. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 46-50.
- Kulišić, Z., Lepojev, O., Aleksic-Bakrač, N., Jakic, D., Pavlovic, I., Milutinovic, M., a Mišić, Z. (2004):** Trematodes of the Eurasian coot (*Fulica atra* L.) in the Belgrade area. *Acta Veterinaria (Beograd)* 54: 447-456.
- MacKinnon, B. M. (1980):** The nature of the haemoglobins of *Notocotylus triserialis* (Digenea: Notocotylidae). *Parasitology* 81: R20
- MacKinnon, B. M. (1982a):** The structure and possible function of the ventral papillae of *Notocotylus triserialis* Diesing, 1839. *Parasitology* 84: 313-332.
- MacKinnon, B. M. (1982b):** The haemoglobins and respiratory enzymes in the ventral papillae of *Notocotylus triserialis* Diesing 1839 (Digenea: Notocotylidae). *Canadian Journal of Zoology* 60: 1308-1313.
- MacKinnon, B. M. (1982c):** The development of the ventral papillae of *Notocotylus triserialis* (Digenea: Notocotylidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 68: 279-293.
- Macko, J. K., Hanzelová, V. a Macková A. (2002):** Contribution to the helminths of wild geese in the Slovak Republic. *Helminthologia* 39: 159-163.
- McNab, J. M. (1973):** The avian caeca: a review. *World Poultry Science Journal* 29: 251-263.

- Morley, N. J., Crane, M. a Lewis, J. W. (2002):** Toxicity of cadmium and zinc to encystment of *Notocotylus attenuatus* (Trematoda: Notocotylidae) cercariae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 129-133.
- Murrills, R. J., Reader, T. A. J. a Southgate, V. R. (1985a):** Studies on the invasion of *Notocotylus attenuatus* (Notocotylidae: Digenea) into its snail host *Lymnaea peregra*: the contents of the fully embryonated egg. *Parasitology* 91: 397-405.
- Murrills, R. J., Reader, T. A. J. a Southgate, V. R. (1985b):** Studies on the invasion of *Notocotylus attenuatus* (Notocotylidae: Digenea) into its snail host, *Lymnaea peregra*. *In vitro* observation on the hatching mechanism of the egg. *Parasitology* 91: 545-554.
- Murrills, R. J., Southgate, V. R. a Reader, A. J. (1988):** Studies on the invasion of *Notocotylus attenuatus* (Notocotylidae: Digenea) into its snail host, *Lymnaea peregra*: *in vivo* observation 1 and 7 days post infection. *International Journal for Parasitology* 18: 161-166.
- Našincová, V. (1992):** Vývojová stadia motolic v našich vodních plžích a vývojové cykly vybraných druhů čeledi Omphalometridae a Echinostomatidae. *Kandidátská disertační práce*. Parazitologický ústav Československé akademie věd, České Budějovice, 25-35.
- Niewiadowska, K. (1995):** Sporocysts and rediae – unappreciated generations in the morphology and evolution of Digenea. *Helminthologia* 32: 121-123.
- Niewiadowska, K., Valtonen, E. T. a Siddall, R. (1997):** Cercariae from *Lymnaea stagnalis* in lake Kuuhankavesi (central Finland). *Acta Parasitologica* 42: 132-137.
- Radlett, A. J. (1979):** Excystation of *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) Kossack, 1911 (Trematoda: Notocotylidae) and their localization in the caecum of the domestic fowl. *Parasitology* 79: 411-416.

- Radlett, A. J. (1980):** The structure and possible function of the ventral papillae of *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) Kossack, 1911, (Trematoda: Notocotylidae). *Parasitology* 80: 241-246.
- Simon-Vicente, F., Mas-Coma, S., Lopez-Roman, R., Tenora, F. a Gallego, J. (1985):** Review of *Notocotylus* species (Trematoda: Notocotylidae) parasitizing rodents in Europe. *Folia Parasitologica* 32: 21-33.
- Smyth, J. D. a Halton, D. W. (1983):** Development Within the Definitive Host. In: The Physiology of Trematodes, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 180-213.
- Southgate, V. R. (1971):** Observations on the fine structure of the cercaria of *Notocotylus attenuatus* and formation of the cyst wall of the metacercaria. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 120: 420-449.
- Southgate, V. R. (1967):** Observations on the cyst formation of *Notocotylus attenuatus*. *Parasitology* 57: 6P-7P.
- Tenora, F., Sulgostowska, T. a Vaněk, M. (1987):** Occurrence of some parasitic worms of the orders Anseriformes and Lariformes in southern Moravia. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica* 35: 113-117.
- Väyrynen, T., Siddall, R., Valtonen, E. T. a Taskinen, J. (2000):** Patterns of trematode parasitism in lymnaeid snails from northern and central Finland. *Annales Zoologici Fennici* 37:189-199.
- Vojtek J. (1981):** 4. Systematická část. In: Fauna motolic ptáků ČSSR. Univerzita J. E. Purkyně, Brno, 95-99.
- Wittrock, D. D. (1982):** Structure and origin of the eggshell of *Quinqueserialis quinqueserialis* (Trematoda: Notocotylidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 67: 37-44.

Wright, C. A. a Bennet, M. S. (1964): The life cycle of *Notocotylus attenuatus*. *Parasitology* 54: 14P.

Žďárská, Z. (1964): K vývoji a druhové samostatnosti motolice *Notocotylus ephemera* (Nitzsch 1807) – (Syn. *N. thienemanni* Szidat L. a Szidat U. 1933). *Československá parazitologie*: 309-318.

Žďárská, Z. (1970): The gland cells of the cercaria of *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) and the cyst wall of its adolesearia. *Folia Parasitologica* 17: 31-47.

Žďárská, Z. (1986): Evolution of Morphological Features in Larval stages of Digenetic Trematodes. *Studie ČSAV* 20, Praha, 25-35.