

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 - Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Reakce živých buněk (in vitro) na extrakt, získaný z matrix kolonie
bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)**

Response of animal cells to the extract, obtained from the colony matrix of
(Pectinatella magnifica)

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zuzana Balounová, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Vítězslav Březina, CS.c

Autor bakalářské práce: Karolína Šusterová

České Budějovice, 2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína ŠUSTEROVÁ**
Osobní číslo: **Z11274**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Reakce živých buněk (in vitro) na extrakt, získaný z matrix kolonie bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)**
Zadávající katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce: Zjistit biologickou aktivitu látek, produkovaných kolonií *Pectinatella magnifica* do vlastní matrix.

Metodický postup:

1. Studium literárních podkladů, týkající se mechovek, především druhu *Pectinatella magnifica* (biologie, fyzikální a chemické vlastnosti kolonie i prostředí, rozšíření) a práce s tkáňovými kulturami. Zpracování literární rešerše.
2. Sběr biologického materiálu v přírodě, zpracování, získání extraktu.
3. Pokus na TK buňkách in vitro (volba buněčné kultury, ředění, sběrná kinematografie).
4. Vyhodnocení záznamů, stanovení růstových křivek.
5. Vyhodnocení získaných dat statistickými metodami.


Rozsah grafických prací: 10
Rozsah pracovní zprávy: 40
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- Balounová Z., Rajchard J., Švehla J. & Šmahel L. 2011. The onset of invasion of bryozoan *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic). *Biologia* 66: 1091-1096
- Činátl, J. a Novák, M. (1968): Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování. SZdN Praha
- Hrabě S. 1954. Mechovky - bryozoa, pp. 127-128. In: Hrabě S. (ed.), Klíč zvířeny ČSR, [Key to the Fauna of ČSR], Československá akademie věd, Praha, 127-128
- Joo G.J., Ward A.K. & Ward G.M. 1992. Ecology of *Pectinatella magnifica* (Bryozoa) in an Alabama oxbow lake: colony growth and association with algae. *J. N. Am. Menthol. Soc.* 11: 324-333
- Kollar, P., Rajchard, J., Balounova, Z., Sinko, J.(2013): Marine Natural Products Bryostatins in Preclinical and Clinical Studies (NPHB-2013-0300), Pharmaceutical Biology
- Lukešová P. 2011. Šíření mechovky *Pectinatella magnifica* v oblasti Třeboňska. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 83 pp
- Ruppert E.E. & Barnes R.D. 1994. Invertebrate Zoology. Saunders College Publishing, Orlando, 1100 pp
- Sinko J., Rajchard J., Balounova Z. and Fikotova L.(2012): Biologically active substances from water invertebrates: a review. *Vet. Med.* 57, 2012 (4): 177-184
- Weissenfles N. 1989. Biologie und Mikroskopische Anatomie der Süßwasserchwämme (Spongillidae), Fischer, New York, 110 pp

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zuzana Balounová, Ph.D.
Katedra biologických disciplin

Konzultant bakalářské práce: Ing. Vítězslav Březina, CSc.

Datum zadání bakalářské práce: 8. února 2013
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní učebna
Studentská 13
370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 11. února 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Šusterová Karolína

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala Ing. Zuzaně Balounové, Ph.D. za trpělivost, užitečné rady a čas, který byla ochotna věnovat této bakalářské práci a Ing. Vítězslavovi Březinovi, CS.c za pomoc s vypracováním výsledků, zejména statistického vyhodnocení. Vděk patří také členům bochnatkového týmu z Jihočeské univerzity, kteří se účastní výzkumu a podělili se se mnou o cenné a zajímavé informace. Na závěr bych také chtěla poděkovat Ing. Janu Šinkovi za poskytnutí důležitých dat a materiálů.

Obsah

Anotace	6
Annotation.....	6
1. Úvod.....	7
2. Cíle práce	8
3. Literární přehled.....	9
3.1 Charakteristika kmene: Mechovci (<i>Bryozoa</i>).....	9
3.2 Charakteristika bochnatky americké (<i>Pectinatella magnifica</i>)	9
3.2.1 Biologie a rozmnožování <i>P. magnifica</i>	10
3.2.2 Variabilita statoblastů mechovky <i>Pectinatella magnifica</i> Leidy (<i>Phylactolaemata, Cristatellidae</i>).....	10
3.2.3 Biologicky aktivní látky z vodních bezobratlých živočichů.....	11
3.2.4 Ekologie a rozšíření <i>P. magnifica</i>	12
3.2.5 Rozšíření druhu <i>P. magnifica</i>	14
3.3 Tkáňové a buněčné kultury	17
3.3.1 Struktura savčí buňky a její aktivita	18
3.3.2 Membránové buněčné organely.....	18
3.3.3 Cytoskelet.....	22
3.4 Mitóza.....	25
3.4.1 Profáze	26
3.4.2 Metafáze.....	26
3.4.3 Anafáze	26
3.4.4 Telofáze	26
3.5 Kultivační požadavky buňky in vitro	27
3.5.1 Laboratoř tkáňových kultur	28
3.5.2 Typy kultur živočišných buněk.....	28

3.5.3 Myší fibroblasty	29
3.6 Hodnocení vlivu prostředí biologickými testy	30
3.7 Dilatace.....	30
3.8 Mitotická aktivita	31
3.9 Růstová rychlost	32
3.10 Růstová křivka buněčné kultury	32
4. Metodika	32
4.6 Sledované lokality	36
5. Výsledky	38
5.2 Průzkum výskytu a rozšíření druhu <i>P. magnifica</i> na Vltavotýnsku	44
6. Diskuse.....	46
7. Závěr	49
8. Seznam použité literatury.....	50

Anotace

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda kolonie sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica* produkují biologicky aktivní látky. Na základě znalostí o průběhu růstové křivky buněčné kultury myších fibroblastů byly vytvořeny modely pro biologické testy ke stanovení biologického potenciálu látek, obsažených v extraktu z lyofilizátu kolonií *P. magnifica*. Testy přítomnosti látek s biologickou aktivitou prokázaly. Součástí práce byl rovněž průzkum výskytu a rozšíření sledovaného druhu na Vltavotýnsku, včetně monitoringu základních parametrů vodního prostředí. Prozkoumáno bylo ve dvou letech (2012 a 2013) opakovaně celkem 10 lokalit na řekách Lužnice a Vltava, výskyt byl zjištěn na 5 místech.

Klíčová slova: *Pectinatella magnifica*, bochnatka americká, buněčná kultura, testy toxicity, biologicky aktivní látky, Vltavotýnsko, Lužnice, Vltava

Annotation

The aim of this thesis was to determine whether colonies freshwater bryozoans *Pectinatella magnifica* produce biologically active substances. On the basis of knowledge of the course of the growth curves of cell culture mouse fibroblasts were developed models for biological assays to determine the biological potential of substances contained in the extract of lyophilisate colonies of *P. magnifica*. Tests demonstrated the presence of substances with biological activity. Next part of this work was also survey the occurrence and distribution of the reference type to Vltavotýnsku, including the monitoring of basic parameters of the aquatic environment. It was explored in two years (2012 and 2013) repeated a total of 10 sites on rivers Vltava and Lužnice, the incidence was detected at 5 locations .

Key words: *Pectinatella magnifica*, american bochnatka, cell culture, tests of toxicity, biologically active substances, Vltavotýnsko, Lužnice, Vltava

1. Úvod

S bochnatkou jsem se poprvé setkala ke konci srpna roku 2011 na Veselských písčovnách. Bochnatka se nacházela u břehu ve formě průsvitného gelu. Zajímalo mne, jak se rychle šíří, zda může způsobovat nějaké zdravotní problémy a jestli zooidi mohou produkovat nebezpečné látky a tím negativně ovlivňovat vodní prostředí, proto jsem se zúčastňovala práce v terénu, kdy jsem pomáhala při sběru dat pro výzkum, a také se naskytla příležitost ověřit toto podezření v laboratoři tkáňových kultur v Nových Hradech na buněčných kulturách savčích buněk. Práce je prvním nástřelem, ukázalo se, že obavy nebyly neoprávněné, výluh z kolonií bochnatky skutečně měl prokazatelný vliv na růst buněk. V práci bych ráda pokračovala a zjistila o toxicitě bochnatky více.

Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je koloniálně žijící sladkovodní mechovka, která pochází ze severní Ameriky. V Evropě byla poprvé spatřena v roce 1883 v řece Bille (přítok Labe) nedaleko Hamburku. Na území České republiky byla objevena v Labi u Litoměřic v roce 1922. Opakovaně byla nalezena ve Vltavě a Labi v průběhu 20 - 30. a 40. let 20. st., v 50 letech i na Kníničské přehradě v povodí Dunaje (BALOUNOVÁ a kol., 2009).

Tento živočich tvoří rosolovité kulovité útvary, nejčastěji o velikosti fotbalového míče, samostatná kolonie žije na povrchu. Může se rozrůstat i v několikametrových útvarech, které mohou vážit až několik kilogramů. Kolonie této mechovky mají na povrchu žlutohnědou barvu a uvnitř strukturu pevného, průsvitného gelu. Živí se jako filtrátor (ŠINKO et al. 2013). Bochnatka se někdy stává potravou ploštěnek, plžů, larev pakomárů (např. *Cryptobironomus*) a chrostíků (*Trichoptera*), (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Bochnatce se daří v mírném pásmu, nejvíce jí vyhovuje teplota vody nad 20 °C. Vyskytuje se v jezerech, rybnících a řekách s mírným prouděním (OPRAVILOVÁ, 2005). Nejčastěji bývá kolonie uchycena k podkladům jako jsou loďky, tarasy, kameny a vrbové či jiné dřevo, živé i mrtvé, které je ve vodě.

Kolonie mechovky *Pectinatella magnifica* se vyhýbá znečištěným rybníkům, nejčastěji se vyskytuje v převážně rekreačních nádržích (NEZVALOVÁ, 2010) a vodách, které jsou relativně "čisté", oligotrofní až mezotrofní, proto jsou často využívány ke koupání. Přítomnost druhu je často nápadná díky ohromným rozměrům a masovému výskytu. V této souvislosti je aktuální otázka bezpečnosti a zdravotních rizik, která bývá v letních měsících často diskutována. Díky dosavadním zkušenostem lidskému organismu závažné problémy nepůsobí, a však u několika lidí po přímém kontaktu s mechovkou byly pozorovány alergické reakce, jak uvádí (ANONYMUS, 2009). Proběhlo několik pozorování, jež naznačují, že kolonie bochnatky obsahují zatím neidentifikované bioaktivní látky, které mají antibiotické a antipredační účinky a současně jsou dlouhodobě stabilní (to se projevuje např. tím, že rosolovitý materiál kolonií přetrvává ve vodních nádržích od srpna až do konce března následujícího roku (ŠINKO, 2010).

2. Cíle práce

- 1) Zjistit biologickou aktivitu látek, produkovaných kolonií *Pectinatella magnifica* do vlastní matrix.
- 2) Prozkoumat a zdokumentovat výskyt a rozšíření bochnatky americké na Vltavotýnsku.

3. Literární přehled

3.1 Charakteristika kmene: Mechovci (*Bryozoa*)

Mechovci jsou drobní, vodní, koloniálně žijící živočichové. Kolonie jsou tvořeny tzv. zooidy, kteří vytvářejí pevný obal zooecium. Tělo zooida je děleno na přední část zvanou polypid, který se skládá z nervové uzliny a lofofóru, a zadní část cystid s trávicími a pohlavními orgány (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Tělní stěna (cystid) je pevně přichycena k zooeciu a spolu s polypidem vytvářejí jedince (-zooida), (MERGL, 2007).

Převážná většina, asi 5000 recentních druhů mechovců žije v mořích. Ve sladkých vodách se vyskytuje okolo 50 druhů, tj. 1%. Mezi sladkovodní mechovce patří např. třída *Phylactolaemata*. V České republice lze najít 10 druhů mechovek (*Plumatella emarginata*, *P. fruticosa*, *P. fungosa*, *P. repens*, *P. punctata*, *Paludicella articulata*, *Lopbopus crystallinus*, *Cristatella mucedo*, *Fredericella sultana* a *Pectinatella magnifica*), (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005).

3.2 Charakteristika bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)

Podle KOUBKA (2006) je známo, že bochnatka americká je bezobratlý, prvoústý, sladkovodní živočich z kmene *Bryozoa*. Jedná se o původně severoamerický druh mechovky, který vytváří nebuněčnou matrix konzistence gelovitého rosolu do velikosti fotbalového míče, může vážit několik kg. Jedná se o invazní sladkovodní mechovku se schopností produkovat velké kolonie dosahující kapacity až několik desítek dm³ (BALOUNOVÁ et al., 2011).

BALOUNOVÁ (2011) zmiňuje, že bochnatka žije přisedlým způsobem života ve sladkých, čistých vodách s teplotou vody nad 20 °C. Její kolonie porůstají nejčastěji ponořené větve dřevin (– zejména pobřežní vrby), loďky, tarasy hrází či rákosí. Způsobem výživy je bochnatka filtrátor. S tím souvisí i pozorování

ŠETLÍKOVÉ a kol., (2005), že v nádrži, kde se objevila, došlo k omezení rozvoje řas a sinic, čímž se zvýšila průhlednost vody na několik metrů.

3.2.1 Biologie a rozmnožování *P. magnifica*

Na povrchu bochnatky se vyskytují jednotliví jedinci, tzv. zooidi, kteří si pomocí kmitajících chapadélek nahání potravu v podobě planktonu, řas a sinic. Množení probíhá pohlavně i nepohlavně. Pohlavní rozmnožování probíhá tak, že každá kolonie tvoří vaječné i spermatické buňky. Sperma se tvoří v nenápadných shlucích v určitých oblastech kolonie. Nepohlavní množení probíhá zejména pučením, kdy vznikají geneticky identičtí jedinci, (klon), nebo může probíhat štěpením či za pomoci statoblastů (floatoblastů), (WOOD, 2011).

Jedná se o vnitřní pučení, gemulaci, kterou se vytvářejí statoblasty. Jsou to většinou oválná nebo diskovitá tělíska, obsahující nediferencované mezoderální buňky. Chitinózní obal statoblastů může mít vzdušné komůrky (– u plovoucích floatoblastů, jenž obsahují na vnější hraně extenzivní pruh zvětšených komůrek, které při naplnění plynem zajišťují splývání na vodě) nebo je bez vzdušných komůrek a lepivý (u sesoblastů, které se přilepují na pevný podklad v místě mateřské kolonie, jsou obecně větší než floatoblasty, nemají komůrky plnitelné plynem a jsou pevně přirostlé k substrátu). Často jsou na statoblastech také přichytné háčky. Statoblasty, které jsou velmi rezistentní proti vyschnutí i mrazu, umožňují kromě přečkání nepříznivých zimních či letních podmínek také šíření mechovek (SEDLÁK, 2000).

3.2.2 Variabilita statoblastů mechovky *Pectinatella magnifica* Leidy (*Phylactolaemata, Cristatellidae*)

V povodí Černého moře byla *Pectinatella magnifica* poprvé nalezena na podzim v roce 1951 Hrabětem (1952) na lokalitě Kníničské přehradě u Brna. O rok později prof. Dr. Hrabě našel na téže lokalitě velké množství kolonií tohoto druhu, ale v roce 1953 našel pouze jednu kolonii a v roce 1954 nebyla nalezena žádná kolonie. V roce 1955-1957 pátral po tomto druhu na Kníničské přehradě dr. Kubíček, avšak bezvysledně. Ani v letech 1958-1959, kdy tuto lokalitu několikrát navštívil, nenalezl žádné kolonie, ani statoblasty této mechovky. Dr. Kubíček měl k dispozici

materiál sbíraný na Kníničské přehradě prof. dr. S. Hrabětem 1951, dále obdržel materiál z přírodovědecké fakulty UK v Praze od dr. V. Jandy. Z řeky Labe měl k dispozici materiál sbíraný prof. dr. S. Hrabětem u Lovosic v r. 1934. Z obdrženého materiálu počítal háčky vždy na sto kusech statoblastů z jednotlivých sběrů a sestavil tabulku, ze které zjistil, že počet háčků byl velmi stálý na řece Vltavě, kde během 28 let nedošlo k žádným změnám. Velká variabilita však byla na Kníničské přehradě. Proměnlivý průměrný počet háčků po dobu výskytu na Kníničské přehradě se dá vyjádřit křivkou, která dosáhla vrcholu v roce 1952, tzn. v době, kdy byla mechovka nejhojnější. Proto se dr. Kubíček domníval, že počet háčků je odvislý na mohutnosti populace a vyvrátil domněnku Šachanovské (1929), že počet háčků je závislý na průměrné roční teplotě vody a krajiny. Za zmínku stojí uznání značné proměnlivosti počtu háčků u jednotlivých kolonií (KNOZ, 1952).

3.2.3 Biologicky aktivní látky z vodních bezobratlých živočichů

Mechovky mohou být zajímavé z medicínského hlediska, např. mořská mechovka *Begula neritina* z Kalifornie, která obsahuje látku zvanou bryostatin (DVOŘÁKOVÁ, 2009). Tyto sloučeniny jsou produkovány komenzálními mikroorganismy, vyskytujícími se v mořských bezobratlých, především právě v mechovkách (*Bryozoa*). Nejčastěji zkoumanou látkou je bryostatin -1, který je vysoce oxidovaný. Bryostatiny jsou silnými agonisty bílkovin proteinu kinázy C. Kromě toho mají významnou protinádorovou aktivitu proti několika typům nádorů. Protinádorová aktivita bryostatinu byla zjištěna a prokázána u různých typů rakoviny. Významné výsledky byly dosaženy pomocí bryostatinu -1 v kombinaci s dalšími terapiemi, včetně kombinace s testovací vakcínou. Zejména některé nové analogy bryostatinu by mohly představovat v budoucnu potencionálně terapeutické látky na léčení rakoviny a jiných onemocnění (KOLLÁR et al., 2013). Bryostatiny působí přímo na DNA v buňkách a tím jim brání v množení. Této schopnosti se dá využít v boji proti patogenům a v léčbě některých typů rakoviny. Pomáhá proti leukémii, maligním melanomům, Hodgkinově lymfomu (nádory lymfatických uzlin) a rakovině ledvin. V současné době probíhají klinické testy samotné látky, ale i jejich kombinací s doposud používanými chemoterapeutiky. Jde o snahu omezit na minimum vedlejší příznaky. Také je podstatné nalézt bohatý zdroj bryostatinu bez

nutnosti intenzivní těžby mechovek, nebo vyvinout jeho syntetický ekvivalent (ČERNÝ, 2003). Nejen mechovky (*Bryozoa syn. Ectoprocta*), ale i mořské houby (*Porifera*) jsou velmi důležitým zdrojem farmakologicky využitelných druhů sloučenin. Houby jsou zdrojem mnoha látek např. ara-A (vidarabin), manzaminů, lasonolidů, spongistatinů, pelorusidu a jiných antimikrobiálních, protirakovinných a imunosupresivních a podobných činností. Dalšími důležitými zdroji sloučenin s léčebnými účinky jsou u pláštěnců (*Tunicata syn. Urochordata*) a některých šneků (*Mollusca*). Některé léky byly vyvinuty z pláštěnců: Yondelisu a Trabectedin proti žáruvzdorným měkkým tkáňovým zhoubným nádorům. Jiné léky pocházejí z hlemýžďů: Prialt, který působí proti chronické bolesti při poranění míchy (ŠINKO et al., 2012).

3.2.4 Ekologie a rozšíření *P. magnifica*

Pectinatella magnifica je největší ze všech mechovek (*Phylactolaemata*). Kolonie tohoto druhu jsou v raném stádiu schopné samostatného pohybu. Bylo zjištěno, že rod *Lophopus* (*Phylactolaemata*) je schopen se samostatně pohybovat. Mladé kolonie *Lophopus* jsou schopné se přesunout o 6 cm za 20 hodin. Činnost pohybu souvisí se substrátem, na kterém kolonie leží. Jednotlivé polypidy druhu *Pectinatella* jsou velmi citlivé na podráždění. Často se šíří aktivně pomocí vlastních sil. Všechny polypidy na jedné straně kolonie současně dávají impulzy k přesunutí celé kolonie po kluzkém povrchu. Rosolovitá sekrece, která je základem mladé kolonie, ještě není tak tuhá a její polotekutý stav má slizký povrch, pomocí kterého se mladé kolonie mohou pohybovat s velmi malým odporem. Míra a rozsah pohybu se liší podle velikosti a stavu kolonie. Jednotlivé kolonie se pohybují od sebe tak rychle a daleko, jak jim umožní volný prostor kolem nich, ale existují i hranice v síle pohybu. Kolonie se mohou pohybovat pouze tehdy, kdy jsou poháněny aktivitou jedinců na opačných pólech kolonie. Síla pohybu klesá s rostoucí velikostí kolonií nebo je omezena vnějšími podmínkami. Dokud je rosolovitý substrát polo kapalný, tak dochází k volnému pohybu mladých kolonií, ale když dojde ke ztuhnutí, tak jsou kolonie pevně uchyceny na místě (WILCOX, 1906).

Tento druh mechovky je stenotermní, vyžaduje teplotu kolem 20 °C (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Teplota vody je důležitým faktorem, který ovlivňuje

sezónní dynamiku kolonií. Čím je teplota vyšší, tím je rychlejší nárůst kolonií (ŠINKO a kol., 2013).

První kolonie se objevují poté, co teplota vody stoupne nad požadovanou teplotu, a to alespoň tři dny za sebou (BALOUNOVÁ a kol., 2006). S příchodem chladnějšího počasí (září) odumírají statoblasty (– vnitřní pupeny), a rozpadají se (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Bochnatka vyžaduje dlouhodobě vyšší průhlednost vody, kterou ovlivňuje i svým filtrováním. S vysokou průhledností vody souvisí i množství a vydatnost srážek - proudy vody nebo intenzivní déšť mohou snadno zakalit litorální zónu. Výskyt druhu nejspíš není ovlivněn světelnými podmínkami, neboť kolonie rostou na světlých, ale i zastíněných místech pobřeží (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Pro výskyt a rozšíření organismu je podstatná trofie nádrže. Ideální pro život mechovky v oblasti Třeboňska (s převládajícími eutrofními a hypertrofními rybníky) je právě oligotrofní až mezotrofní nádrž Cep (BALOUNOVÁ a kol., 2006). Z hlediska hodnot pH a vodivosti se jedná o euryvalentní druhy, ale s preferencí vod slabě alkalických a s nižší vodivostí (pod 200 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Bylo statisticky prokázáno, že *P. magnifica* se hojněji vyskytuje ve vodách s vyššími minimálními hodnotami pH. Obecně se nejčastěji vyskytuje v mírně alkalických vodách (ŠINKO a kol., 2013).

Podmínkou výskytu bochnatky je vhodný podklad. Mechovka upřednostňuje štěrkopískový substrát před organickým sedimentem, pravděpodobně z důvodu nebezpečí zanášení zooidů jemným detritem, se kterým souvisí nedostatek kyslíku (ŠETLÍKOVÁ a kol., 2005). Kolonie bochnatky se vyskytují na ponořených větvích vrby, zbytcích dřevin a méně často na litorální vegetaci (např. *Typha latifolia*), na kamenech a jiných předmětech. Rozdíly biomasy v transektech s výskytem keře vrby a bez jejich výskytu byly statisticky výrazné v celkové hmotnosti biomasy a počtu kolonií (BALOUNOVÁ et al., 2011).

Jednotlivá stanoviště se liší substrátem, který mechovka osidluje (BALOUNOVÁ a kol., 2006). Na pískovně Cep výskyt převládá na ponořených vrbových větvích, dalším substrátem může být tlející dřevo naplavené při povodních nebo větve napadané z břehových porostů. Na rybnících Hejtman a Podřezaný se bochnatka nejčastěji nachází přímo na kamenech. Kameny, jako vhodný substrát pro

růst kolonií, jsou využívány prakticky jen v letech s vysokou biomasou. Na rybníce Hejtman je nejvíce na ponořených březových kmenech padlých do vody a na rybníce Nový Kanclíř na ponořených kmenech a ulomených větvích borovic a olši. Při nadměrném výskytu se může uchytit i na umělých materiálech (např. PET lahve), o čemž svědčí nález z rybníka Hejtman v roce 2007. Velmi nerovnoměrně kolonie narůstají v přehradní nádrži Hněvkovice, jenž má velkou rozlohu. Převládá výskyt na skalním podloží a to v hloubce i přes tři metry (BALOUNOVÁ, 2007).

3.2.5 Rozšíření druhu *P. magnifica*

Poprvé byla bochnatka popsána již v roce 1851 v okolí Filadelfie. Je původem z oblasti směrem na východ od řeky Mississippi, od Ontaria po Floridu. Jeden z prvních nálezů *Pectinatella m.* byl na řece Bille u Hamburku v roce 1883. Později byla nalezena v Labi, v rybníce ve Vratislavi, ve Slezsku a Brandenburku. Mimo to, floatoblasty *P. magnifica* byly nalezeny v horním Labi v Německu v roce 1950. Poté se *P. magnifica* rozšířila do oblasti Spandau v Berlíně a také do Rumunska a Turecka. Ve Francii byla nalezena v oblasti Franche – Comté v roce 1994. Výskyt *P. magnifica* byl poprvé zaznamenán i v Nizozemí v roce 2003 a poté každý rok. Mezi nejnovější objevy patří povodí Rýna v prostoru mezi Lucemburskem a Německem. Nedávno byla bochnatka také nalezena v ČR a Rakousku. Kromě Evropy a Severní Ameriky je zaznamenána dokonce i v Japonsku a Koreji (BALOUNOVÁ et al., 2011). Do Evropy byla zavlečena pomocí lodní dopravy nebo vodního ptactva, u kterého se přichytává na peří. Na území České republiky byla poprvé objevena v roce 1929 na řece Vltavě v Praze, o 30 let později byl znám výskyt na 12 lokalitách na řekách Labe a Vltava. V roce 2003 byla objevena v pískovně Cep na Třeboňsku, během roku 2004 začala být na této lokalitě sledována (BALOUNOVÁ a kol., 2007). Mechovka byla nalezena v chráněné krajinné oblasti a biosférické rezervaci Třeboňsko. Během posledních deseti let této oblasti byly pozorovány dva typy strategií jejího šíření: šíření na větší vzdálenosti spojené s tokem řeky Lužnice nebo klasické šíření na základě absolutní od ovlivněných oblastí. Obě tyto strategie šíření vedly ke zvýšení koncentrace *P. magnifica* v této oblasti díky podrobnému vyšetření 21 lokalit s různou trofickou úrovní (rybníky, zatopené pískovny a štěrkovny), (BALOUNOVÁ et al., 2013). Tento druh mechovky se postupně rozšířil do mnoha dalších míst po celém

Třeboňsku a na většině těchto míst je invazivní. *P. magnifica* se rozšířila na některé další pískovny a rybníky bez intenzivního chovu ryb (BALOUNOVÁ et al., 2011). Z pískovny Cep se dále rozšířila propojovacím kanálem i na nádrž Cep I. V roce 2005 byla bochnatka nově nalezena na rybníce Podřezaný. V následujícím roce byla sledována na přehradní nádrži Hněvkovice a Orlíku, a dále na rybníku Hejtman v Chlumu u Třeboně, kde se bochnatka vyskytuje do současné doby v hojné míře. Od roku 2003 došlo k invazi tohoto zkoumaného živočicha. V roce 2012 byla *Pectinatella magnifica* také objevena v řece Sure v obci Esch – sur – Sure (Lucembursko). Kolonie byly zvláště hojné u břehu v mělké, teplé vodě bohaté na živiny, ale některé kolonie byly spatřeny v nádrži v hloubce 8-9 m a na dalším místě dokonce více než ve 20 m. Kromě *Pectinatella m.* byly v oblasti Esch – sur – Sure nalezeny mechovky: *Plumatella emarginata* (Mechovka vykrojená), *P. repens* (m. plazivá), *P. fungosa* (m. houbovitá) a *crustatella mucedo* (MASSARD, 2013). Jedním ze spouštěcích faktorů může být i globální klimatická změna. Rychlé šíření je spojeno s nárůstem průměrných teplot vody, které častěji přesahují 20 °C, jenž bochnatka pro svůj život potřebuje (ŠINKO, 2010).

Vzhledem k tomu, že se organismus šíří do dalších nádrží, je poznání jeho biologie a vlivu na vodní ekosystémy velmi aktuální a důležité. Nádrže po těžbě šterkopísku mají využití nejen rybářské, ale i rekreační a mnohdy i vodárenské (BALOUNOVÁ, 2013).

3.2.5.1 Výskyt druhu *Pectinatella magnifica* na Vltavotýnsku do roku 2012

(BALOUNOVÁ, 2014)

První (v terénu neověřené) zmínky o výskytu *P.m.* v této oblasti pocházejí z období před rokem 2000 (cca 1998-9) z řeky Lužnice v Táboře, kde se v klidné vodě nadjezí masivně začínala vyskytovat od poloviny srpna na větvích, porůstala dna loděk a kolonie přežívaly až do zámrazu. Přibližně z téže doby pocházejí i zprávy o naplavených, volně se vznášejících koloniích v Dobronicích u Bechyně. Další zprávy o výskytu jsou z r. 2005, kdy byly stovky kolonií pozorovány rybářem přímo na dně řeky Lužnice v Sezimově Ústí. V okolí Bechyně (v Dobronicích a v kempu Hvožd'any) byla zjištěna i později – v roce 2008 byla hlášena, později (2010) i

ověřena Balounovou nad jezem v Dobronicích u Bechyně. Následující rok (2011) v těchto místech zřejmě (podle místních obyvatel, rybářů a rekreatů) došlo k masovému výskytu, kdy kolonie porůstaly lodičky i jiné předměty. V roce 2012 však při revizi (pracovníky Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích) nebyla nalezena ani jedna kolonie.

Ze soutoku Lužnice a Vltavy na Kořensku je zpráva z r. 2009. Bochnatka tvořila velké množství kolonií na kamenech na dně. Ve Vltavě na Hněvkovické přehradě pod Hněvkovicemi byl tento živočich však pozorován sportovním rybářem již v roce 2006. Jednalo se o velkou kolonii (o délce více než 1 m), vznášející se na hladině. Téhož roku (20.9.06) byla zjištěna potápěčem při čištění česlic na vstupu do malé vodní elektrárny. Následujícího roku (2007) byly kolonie fotografovány ve vodě u Hněvkovic a také ve Vltavě u Poněšic. Z této oblasti pocházejí i hlášení z roku 2009. V tomto roce se bochnatka také objevila v malém soukromém rybníce Vápenský u Albrechtic nad Vltavou. Mimořádných velikostí a hmotnosti dosahovaly kolonie bochnatky v roce 2009 na Hněvkovické přehradě na skalnatém pobřeží kaňonu Vltavy poblíž rekreačního střediska AMU (potvrzeno revizí pracovníky Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích). V týchž místech se (podle sdělení správce objektu) vyskytovala bochnatka i v předchozím roce (tedy 2008). V letech 2010 a 2011 však zde správce objektu během léta nezjistil žádné kolonie.

3.2.5.2 Výskyt druhu *Pectinatella magnifica* na Třeboňsku do roku 2013

(BALOUNOVÁ, 2014)

Na Třeboňsku byl druh *P.m.* poprvé zjištěn v r. 2003 na těžené štěrkopískové nádrži Cep, kde se od té doby vyskytuje každoročně (i když v současné době, kdy těžba byla zastavena, je kolonií mnohem méně a jsou drobnější). V roce 2005 bylo zkontrolováno celkem 18 lokalit v okolí, druh byl nově zjištěn pouze na jednom rybníku (Podřezaný). V dalších letech však docházelo postupně k šíření na blízké i vzdálenější vodní nádrže. Kontrola vytipovaných lokalit (míst, kde byl druh dosud nalezen a lokalit podobného charakteru v jejich blízkosti) probíhá na Třeboňsku pracovníky Jihočeské univerzity od r. 2003, tzn. 11 let. V roce 2013 bylo

zkontrolováno celkem 34 lokalit, kolonie bochnatky byly nalezeny na 14 lokalitách, z toho bylo 6 pískoven a 8 rybníků. V porovnání s předchozím rokem (2012) byla opět (po 2 leté přestávce) ověřena na rybníku Podřezaný, naopak nebyla zjištěna na Opatovickém rybníce, na sádkách v Třeboni a ve Vydymači v Chlumu u Třeboně, kde se vyskytovala v předchozích letech. Pro většinu lokalit však platí, že v letech, následujících po prvním výskytu, se zde již kolonie objevují každoročně.

3.3 Tkáňové a buněčné kultury

Buněčnými kulturami jsou rostlinné, živočišné nebo lidské buňky pěstované mimo tělo organismu, ze kterého pocházejí. Tato technika je prováděna v laboratoři, nazývá se *in vitro*, tzn. - „ve skle.“ K prvním pokusům tkáňových kultur došlo ve 20. století. V roce 1952 byla ustanovena první lidská buněčná linie. Odebraná tkáň či soubor buněk musí být co nejdříve přenesen do živného roztoku nebo média. Médium se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi co nejvíce podobá tělním tekutinám. Sérum obsahuje vysokomolekulární bílkoviny, které podporují adhezi buněk a řadu růstových faktorů, z nichž některé podporují diferenciaci (MATULKA, 2006).

Ve tkáňových kulturách musí být přísně kontrolována koncentrace solí, organických živin, hodnota pH, teplota prostředí, ve kterém se vzorek vyvíjí a několik dalších faktorů. Klade se důraz na sterilitu nástrojů, aby nedošlo k infekci dané kultury. Součástí média je fetální bovinní sérum, které iniciuje buňky k dělení a tím i růst celé kultury, další součástí jsou antibiotika kvůli předcházení infekci a následnému zániku celé kultury. Při úspěšné kultivaci se buňky začínají množit a vzniká buněčná (tkáňová) kultura. Kultury se pěstují na Petriho miskách v termostatu při stálé teplotě 37 °C. Po určité době je živné médium vyčerpáno a část buněk se musí přenést do jiné kultivační nádoby s čerstvým živným roztokem. Tento proces se nazývá pasážování buněk, je nutné jej pravidelně opakovat (KOČÁREK a kol., 2006).

3.3.1 Struktura savčí buňky a její aktivita

Buňka savců je obklopena jemnou blankou a obsahuje jádro, cytoplazmu, mitochondrie, lyzozomy, Golgiho aparát, centrioly, různé inkluze, atd. - Buněčná blána savčí buňky je tenká, optickým mikroskopem takřka nepostřehnutelná. Procházejí skrze ní všechny látky, které buňka přijímá a vylučuje. Jádro je odděleno od cytoplazmy velmi jemnou nukleární blankou. Uvnitř se nachází jeden nebo více jadérek (nukleonů)–, které obsahují (ribonukleovou kyselinu, dále RNA), zbytek je tvořen bezstrukturní bazofilní hmotou, obsahující velké množství deoxyribonukleové kyseliny (dále DNA) a bazickou bílkovinu - nukleární histon. V jádře se nachází velké množství lipidů. Jádro buňky, která se nedělí, se nazývá intermitotické. Jeho význam je důležitý, neboť cytoplazma není bez něho schopna trvale existovat. Má genetickou funkci, tzn.- přenos dědičnosti a funkci biochemickou, jenž není doposud zcela objasněna. Jádro kontroluje hladinu enzymů v buňce. Ribozomy a endoplazmatické retikulum jsou závislé na činnosti jádra. Naopak mitochondrie mají znatelnou autonomii a jádro je po energetické stránce závislé na jejich aktivitě. Izolovaná jádra mají schopnost syntetizovat (adenosin trifosfát (dále ATP) a jiné energií bohaté látky. Jadérko je místem nejintenzivnější proteosyntézy v jádře. Význam jadérka je pro životní funkce buňky nepřímý, spíše jen regulativní, je však prokázáno, že buňka bez nukleolu nemůže natrvalo existovat - (ČINÁTL a NOVÁK, 1968).

3.3.2 Membránové buněčné organely

(BERGER, 2000)

Mitochondrie jsou energetickými organelami buňky. Jsou velké 0,1 - 10 μm , v buňce jich bývá od 1 do cca 0,5 milionu. Počet mitochondrií v buňce se může měnit podle jejích metabolických potřeb, např. v buňkách hibernujících živočichů může být mitochondrií méně, zatímco v aktivní fázi života mají buňky mitochondrií více. Nacházejí se v místech, kde buňka spotřebovává nejvíce ATP. Jsou elipsoidního nebo tyčinkového tvaru. Soubor mitochondrií v jedné buňce je označován jako chondriom. Mitochondrie během evoluce ztratily svou autonomii. Část proteinů, které se podílejí na struktuře a funkcích mitochondrií jsou kódovány geny, které jsou obsažené v buněčném jádře. Tento stav se nazývá jako

semiautonomie. Mitochondrie se množí autoreprodukcí, tzn., že reprodukují sobě podobné živé útvary. Mají dvě membrány, které rozdělují mitochondrii na mezi membránový prostor a matrix (uzavírá ji vnitřní membrána, představuje cytosol prokaryotického předka). Vnější membrána mitochondrií vznikla během evoluce z plazmatické membrány mateřské buňky. Vnitřní mitochondriální membrána je původní plazmatickou membránou prokaryotického předka, vytváří záhyby zvané *kristy*, které mají trubičkovitý nebo plochý tvar.

Další významnou organelou jsou lyzozomy, které se podílejí na trávení a hydrolytické degradaci látek, které pocházejí z buňky a jejího okolí. Lyzozomy mají tvar kuliček s malou dutinkou, obsahují proteázy a ribonukleázy. Na povrchu se nachází jednoduchá membrána, na vnitřní straně membrány jsou ve větším množství glykoproteiny (–cukry chrání membránu před působením hydrolytických enzymů–). Hydrolytické enzymy, které jsou obsaženy v lyzozomech, jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu. Odtud jsou vpraveny do Golgiho komplexu a začleněny do tvořících se lyzozomů. Mezi tyto enzymy se řadí proteázy, lipázy, glykosidázy, nukleázy, fosfatázy. Primární lyzozomy fúzí s pozdními endozomy (tzn. se substrátovými vakuolami) při vzniku sekundárních lyzozomů. Terciární lyzozomy (neboli reziduální tělíčka, postlyzozomy) obsahují zbytky rozloženého obsahu. V některých buňkách dochází ke vzniku jak lyzozomů, které zůstávají v buňkách, tak i sekrečních granul podobného složení. Neutrofilů, které se podílejí na zánětlivé reakci, obsahují v sekrečních granulích chemoatraktanty, histaminázu; obsah granulí eozinofilů se účastní obranných reakcí vůči parazitům.

Golgiho komplex je síť uzavřených varikozních membrán, které černejí po účinku kyseliny osmičelé nebo po stříbření. Nachází se poblíž jádra a má intenzivní sekreční aktivitu. Golgiho komplex je tvořen hladkými membránami, které vytvářejí lívancovité struktury, které jsou na koncích často zduřelé. Golgiho komplex nebo Golgiho zóna se nazývá, protože má morfologicky komplikovanou strukturu, používá se i termín Golgiho aparát. Lívancovité struktury se označují jako diktyozomy (dictyon = síť, soma = tělo), diktyozomů bývá nad sebou uložených kolem 5-7, ale může jich být i 20. Buňka může mít několik Golgiho komplexů. Golgiho komplex je strukturně a funkčně polarizován v buňce: strana, jež je přivrácena směrem k endoplazmatickému retikulu se označuje jako *cis*, strana

přivracená směrem k plazmatické membráně je *trans*. Podstatnou funkcí této struktury je postsyntetická úprava makromolekul, v tomto směru navazuje na činnost endoplazmatického retikula. Proto Golgiho komplex hraje zásadní roli v sekrečních cestách.

Transport Golgiho komplexem je tvořen čtyřmi kompartmenty, které se označují (směrem od plazmatické membrány k endoplazmatickému retikulu) jako (i) TGN (trans Golgi network), (ii) trans (trans cisternae), (iii) střední (medial cisternae) (iv) CGN (cis Golgi network) nebo také cis. Směrem k endoplazmatickému retikulu se nachází kompartment označovaný zkratkou VTC (vesicular-tubular clusters, neboli ERGIC (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), také pre-Golgi. V buňkách polárně orientovaných je prokázána existence subapikálního kompartmentu (SAC) mezi Golgiho komplexem a plazmatickou membránou. V subapikálním kompartmentu mohou být vyměňovány, tříděny a odesílány proteiny a lipidy, a to podobně jako v TGN. Do tohoto kompartmentu putují vezikuly z Golgiho komplexu nebo z časných endozomů (membránových váčků) a odcházejí k plazmatické membráně nebo lyzozomální cestou. SAC odpovídá perinukleárním recyklujícím endozomům, jenž byly dříve popsány v migrujících fibroblastech (= semipolární buňky), odtud se recyklující molekuly dostávají k plazmatické membráně, kde se nachází čelní lamela. Perinukleární recyklující endozomy mají v nepolarizovaných buňkách podobnou funkci jako SAC, ale netřídí a nepřenáší molekuly z pozdních endozomů. Vezikuly, jenž putují do Golgiho komplexu z endoplazmatického retikula, jsou pokryty obálkou, tvořenou proteiny komplexu COP II, vezikuly vracející se z VTC jsou pokryty COP I. Proteiny z komplexu COP se zřejmě podílejí na pučení váčku z membrány, ale není jasné jakým způsobem. Není ani vysvětleno proč je COP I v obálce váčku rozdělen nerovnoměrně. Pokrytí váčku obálkou je signálem k jejich identifikaci a ke třídění látek, které tvoří náklad vezikulu. Při recyklaci COP I dochází k uvolňování a přecházení na váčky směřující do Golgi poté, co se v nich uvolnila obálka, která je tvořena COP II. Obálka COP I je identifikační značkou váčků, které recyklují zpět do endoplazmatického retikula z VTS. Do endoplazmatického retikula se vracejí uvolněné složky COP II.

Golgiho komplex zahrnuje membránové proteiny, které mají transmembránový segment nebo asociují s membránou, periferní proteiny asociují s

cytosolovou stranou membrány. Membránové proteiny Golgiho komplexu mohou být rezidentní nebo tranzitní. Rezidentní proteiny jsou při tvorbě transportních váčků chráněny tak, aby se zbytečně nedostávaly do vezikulů. To se děje pomocí segregace rezidentních proteinů interakcemi s lipidy, nebo segregací rezidentních proteinů prostřednictvím jejich oligomerizace v membráně.

K interakci s cytoskeletem dochází tak, že trajektorie váčků VTC pohybujících se z endoplazmatického retikula do Golgiho komplexu je dána mikrotubulární složkou cytoskeletu. Dochází k přemístění váčků podél mikrotubulů, které jsou zakotveny do endoplazmatického retikula. Hydrolyza makroergních vazeb mikrotubulárních motorů dyneinu a kinezinu zajišťuje energii pro pohyb váčků. Tyto váčky splývají na cis straně Golgiho komplexu a tím se podílejí na vytváření kompartmentu CGN. V místě MTOC (microtubule organizing center) dochází ke kolokalizaci Golgiho komplexu s minusovým koncem mikrotubulární složky cytoskeletu, a to během interfáze nepolarizovaných buněk. V tomto místě působí dynein, který postupně přesunuje Golgiho komplex k MTOC za hydrolyzy ATP (adenosintrifosfátu). Na plusovém konci mikrotubulů se nachází kinezin (také ATPáza), jenž podněcuje laterální pohyb Golgiho komplexu. Spektrin lokalizuje Golgiho komplex a koordinuje tok váčků z Golgiho komplexu, ale i dovnitř. Spektrin je vázán k membráně pomocí ankyrinu, z druhé strany se na spektrin váží molekuly aktinu nebo mikrotubulů.

Dyneiny (ATPázy) zajišťují posun organel vázaných ke konci (-). Distribují endozomy, lyzozomy a část Golgiho komplexu, podílejí se na migraci chromozomů a na skluzu mikrotubulů bičíku a řasinek.

Dynamin (GTPáza) umožňuje klouzání mikrotubulů po sobě navzájem. Pomocí fosforylace¹ dynaminu dochází k zeslabení jeho vazby na mikrotubuly.

¹ Fosforylace- je adice (z jedné dvojně vazby se stanou dvě jednoduché) fosfátových skupin na proteiny nebo jiné organické molekuly. Může měnit strukturu proteinů v enzymech a tím i jejich funkci a činnost. Fosforylace proteinů hraje významnou roli v celé řadě buněčných procesů.

Dynamin a proteiny, které s ním reagují, se podílejí na endocytóze². Kineziny jsou ATPázy zajišťující posun buněčných složek navázaných ke konci (+), např. pohyb pigmentovaných zrn k periférii buňky při barvoměně po osvětlení živočicha (živočich tmavne) zajišťuje kinezin. Také se podílejí na přesunu chromozomů pomocí mikrotubulů a středních filament obsahujících vimentin, a mají podíl i na transportu mRNA.

ČINÁTL a NOVÁK (1968) uvádějí, že buňka se ve tkáňových kulturách aktivně pohybuje, což je viditelné na mikrokinematografických záznamech. Základními pohyby je tvorba pseudopodií, pinocytóza (–buněčné pití, proces podobný fagocytóze s tím rozdílem, že jsou pohlcovány tekuté součásti). Jsou přítomny i speciální pohyby, které jsou charakteristické pouze pro některé buňky, např. pohyb rytmické kontrakce buněk srdečního svalu, jenž je možno pozorovat v kulturách i po dobu několika týdnů.

3.3.3 Cytoskelet

(NEČAS a kol., 1991)

Cytoskelet označuje soustavu bílkovinných fibrilárních struktur, která tvoří část cytoplazmy buňky. Vedle biomembrán a paměťových struktur je jedním z hlavních principů funkční organizace buňky. Cytoskeletální soustava realizuje řadu základních buněčných funkcí. Je jediným systémem v buňce, který je schopen transformovat chemickou energii v kinetickou pomocí mikrofilament a mikrotubulů, tím podmiňuje všechny pohybové funkce buňky, jako je lokomoce buňky, transport organel v buňce, kinetické procesy, které probíhají při dělení buňky, atd. Cytoskeletální soustava také usměrňuje některé morfogenní procesy, které vedou k vytvoření a udržování dynamické struktury buňky. Cytoskelet má také informační funkci, je paměťovou strukturou a podílí se na regulaci řady buněčných procesů.

Za zmínku stojí cytoskeletální toxiny, protože pro poznání funkce cytoskeletu a jeho jednotlivých komponent se používají specifické jedy, které se vážou na nepolymerizované proteiny (zejména tubulin a aktin) nebo na strukturální

² Endocytóza- je proces, kterým buňky absorbují materiál (molekuly, nebo jiné buňky) z vnějšího prostředí, definovaného jejich cytoplazmatickou membránou.

komponenty cytoskeletu. To se projevuje blokadou některé funkce cytoskeletu. Specificky účinné látky se označují jako *inhibitory*. Příkladem je *kolchicin*, který narušuje mitózu a byl využíván vědci k experimentálnímu zablokování mitózy v metafázi, až později byl objasněn mechanismus jeho účinku, tj. specifická vazba na tubulin, která vede k poruše funkce mitotického vřetenka. Použití cytoskeletálních toxinů k disekci cytochemických a molekulárně biologických procesů není ideální. Menší druhové rozdíly v primárních strukturách tubulinů a aktinů se promítají do inhibičního efektu daných toxinů. Znamé jsou také *mutanty*, které jsou k nim rezistentní. Může se jednat o závislost s procesy, které s funkcí cytoskeletu přímo nesouvisí, např. vyčerpání využitelné energie v buňce činí buňky necitlivé na jedy. Některé cytoskeletální toxiny mají i nespecifické efekty na řadu buněčných procesů. Cytoskeletální toxiny jsou často používány v lékařství jako *cytostatika* a zemědělství jako *fungicidy* a *herbicidy*. Dále jsou známé mikrotubulární inhibitory či toxiny, mezi které patří organické sloučeniny, které přímou vazbou na mikrotubuly blokují procesy závislé na funkci mikrotubulárního systému. Patří sem *rostlinné alkaloidy*, jako je kolchicin, podofylotoxin, vinblastin, maytansin a taxol, dále některé *syntetické deriváty benzimidazolu* a některé látky používané jako herbicidy. Nejdéle a nejvíce prostudované je působení kolchicinu a jeho derivátů, alkaloidů izolovaných z ocúnu jesenního (*Colchicum autumnale*) a jemu podobných rostlin (ŠANTAVÝ, 1979). Studiemi in vitro se prokázalo, že kolchicin je vysoce účinným inhibitorem mikrotubulárního systému buněk obratlovců v nanomolárních koncentracích, zatímco nižší živočichové, houby a rostliny jsou na jeho působení málo citlivé (KUZMICH a ZIMMERMAN, 1972, LEVAN, 1938, HABER et al., 1972, HEATH, 1975). Byla popsána vazba kolchicinu na α -tubulin (SCHMITT a ATLAS, 1976). Vazebné místo pro kolchicin bylo nalezeno na α -podjednotce v blízkosti míst její interakce s β -tubulinem (AVILA et al., 1987). Kolchicinu je příbuzný syntetický derivát *kolcemid*, který má velmi podobný účinek (RAY et al., 1981). Soutěží s kolchicinem ve vazbě na tubulin, ale vzniklý komplex je méně stabilní, proto je působení kolcemidu na buňku více reverzibilní. Z toho důvodu je v pokusech in vivo využíván častěji než kolchicin. O vazbu na tubulin soutěží s kolchicinem některé další inhibitory společným rysem v chemické struktuře: benzenovým kruhem substituovaným methoxyskupinami. Jedná se např. o alkaloid májového jablka

(*Podophyllum peltatum*) – *podofylotoxin*, jenž má podobné antimitotické vlastnosti s kolchicinem (KELLY a HARTWELL, 1954). Alkaloid zvaný *steganacin* také inhibuje polymeraci tubulinu při nízkých koncentracích. Jeho struktura je podobná *podofylotoxinu* a je známý svou protinádorovou aktivitou (WANG et al., 1977). Mezi další alkaloidy patří *vinka alkaloidy* izolované z barvínku (*Catharantus roseus*), které se vážou na dvě vazebná místa molekuly tubulinu, odlišná od vazebného místa pro kolchicin. Nejznámějším *vinka* alkaloidem je *vinblastin*, podobný účinek projevují i *vin kristin* a jeho derivát *vindepin*. Při nižší koncentraci blokují polymerizaci tubulinu *in vitro*, ale při vyšší koncentraci (miliomolární) interagují přímo s mikrotubuly. Mimo vazby tubulin mohou svým vedlejším účinkem ovlivňovat i syntézu RNA a DNA, biosyntézu lipidů, metabolismus cyklických nukleotidů, metabolismus glutathionu a kalmodulin-dependentní Ca^{2+} transportní ATP-ázu. Významné jsou i deriváty benzimidazolu, které vykazují zajímavou biologickou aktivitu. Například *mebendazol*, *oxibendazol*, *albendazol*, *kambendazol*, *fenbendazol* a *parbendazol* jsou látky vysoce účinné proti různým patogenním nematodům, cestodům a hematodům (BORGERS et al., 1975), zatímco *benomyl*, *thiabendazol* a *methylbenzimidazol-2-yl karbamát* slouží jako účinné fungicidy (DAVIDSE, 1975). U *nokodazolu* byla zjištěna protinádorová aktivita (DEBRABANDER et al., 1975). Podobné vlastnosti má sloučenina *tubulozol-C* (GEUENS et al., 1985). S pohybovou aktivitou buňky, včetně buněčného dělení, pohybu po substrátu, sekrece, fagocytózy a morfogeneze, interferuje řada přírodních látek díky přímé interakci s aktinem. Známou skupinou jsou mykotoxiny, cytochalasiny a falotoxin faloidin. Cytochalasiny se staly pomůckou studia buněčných procesů závislých na funkci aktinu u všech typů buněk. Univerzální vlastností je rozpad či přestavba cytoskeletu, citlivost na jednotlivé cytochalasiny může být druhově specifická (STAPLES a HOCH, 1982). Z příkladů jejich účinků lze uvést destrukci kontraktálního prstence v dělicích se živočišných buňkách (SCHROEDER, 1970), inhibici proudění cytoplazmy zelených řas (NOTHNAGEL et al., 1981) a blokování vrcholového růstu hub (STAPLES a HOCH, 1982). V koncentracích těsně nad hodnotami ovlivňujícími morfologii (vyšší než 2 $\mu\text{g/ml}$) se *cytochalasin D* projevuje také jako účinný inhibitor proteosyntézy u HeLa buněk, nejspíš tím, že uvolňuje mRNA z vazby na cytoskeletální protein (ORNELLES et al., 1986). *Cytochalasin E*, kromě narušení ukotvení aktinu

v plazmatické membráně, blokuje také mitochondriální respiraci, transport cukrů přes membrány a transport sekretorických váčků.

3.4 Mitóza

Mitóza, čili nepřímé dělení buňky, se skládá z fáze dělení jádra (karyokineze) a dělení cytoplazmy (cytokineze) a je nejčastějším způsobem rozmnožování buněk ve tkáňových kulturách, dochází při ní ke vzniku chromozomů. Při mitóze dochází k rozestupu sesterských chromatid k opačným pólům buňky. Tyto sesterské chromatidy se od počátku rozdělení jejich původně společné centromery nazývají dceřiné chromozomy. Při tomto procesu je zajištěno, že dceřiné buňky obsahují shodný počet chromozomů s buňkou mateřskou a pokud nedošlo k mutaci, mají s ní totožný genotyp (– soubor genů), (REISCHIG, 1988).

Dceřiné buňky mají stejné geny, jsou tedy po genetické stránce naprosto shodné. Mitóza zajišťuje růst organismu nebo náhradu poškozených buněk v tkáních, mitotický je průběh dělení buněk při nepohlavním rozmnožování organismů, noví jedinci jsou zcela shodní s mateřským organismem. Mitóza probíhá ve čtyřech fázích, jež se nazývají jako profáze, metafáze, anafáze a telofáze (ZÁVODSKÁ, 2006). Rovnoměrné rozdělení chromozomů do dceřiných buněk zajišťuje mitotické vřeténko. Obsahuje stovky až tisíce mikrotubulů, které vycházejí z centrozomu. Vřeténko se před připojením mikrotubulů nazývá *primárním* vřeténkem, po vazbě mikrotubulů na kinetochory se označují jako *dělicí* vřeténko. Na mitózu obvykle již v anafázi navazuje cytokineze (dělení cytoplazmy), která probíhá u živočišné buňky centripetálně (svazky mikrotubulů upnuté k plazmatické membráně ji vtahují dovnitř). Cytokineze se u živočichů projevuje nejprve rýhováním (furrowing, cleavage) v rovině určené ekvatoriální rovinou dělicího vřeténka. Zaškrcování se děje pomocí *kontraktilního* prstence, který je přichycen na vnitřní straně plazmatické membrány. Kontraktilní prsteneček obsahuje aktin a myozin. Při cytokinezi je zapotřebí postupně zvětšit povrch mateřské plazmatické membrány, protože součet povrchů obou dceřiných buněk výrazně převyšuje plochu povrchu buňky mateřské. Plazmatická membrána se tvoří z měchýřků, které se na povrchu buňky vytvořily před mitózou. Rychlost buněčného dělení je u různých buněk rozmanitá. Somatické buňky živočichů se většinou dělí několik hodin. V průběhu buněčného cyklu se mění

i morfologie povrchu buňky. Zpočátku bývá buňka hladká, během mitózy má na povrchu mnoho měchýřkovitých a vláknitých útvarů. Buňky mají kulatý tvar během mitózy, ve fázi interfáze jsou ploché (BERGER, 2000).

3.4.1 Profáze

(NEČAS a kol., 1991)

V profázi se objevují chromozomy, které vznikly spiralizací a kondenzací vláken DNA. Chromozomy jsou tvořeny dvěma sesterskými chromatidami, jež jsou spojeny v centromere. Každý chromozom obsahuje dvě stejné molekuly DNA, tzn., že v každé chromatidě je jedna molekula DNA. V této fázi se rozpadá jaderný obal a mizí jadérko. V buňce začne vznikat dělicí vřetenko, které je tvořeno mikrotubuly. V živočišných buňkách se na tvorbě vřetenka podílí centrozom, který se rozdělil na dva rovné, přesunuté k protilehlým pólům buňky. Z centrozomu vybíhá svazek mikrotubulů do všech stran. Základní tvar dělicího vřetenka vzniká tak, že některé mikrotubuly vycházející z protilehlých centrozomů se spojují.

3.4.2 Metafáze

V metafázi je dokončena tvorba dělicího vřetenka. Dochází k připojení chromozomů v místě centromer na vlákna dělicího vřetenka a shromáždí se v rovníkové (ekvatoriální) rovině buňky, kde vytvářejí tzv. metafázní destičku.

3.4.3 Anafáze

V anafázi dochází k přerušení spojení mezi sesterskými chromatidami každého chromozomu a chromatidy se od sebe oddělí. Chromatidy jsou taženy zkracujícími se vlákny dělicího vřetenka k opačným pólům buňky. Poté se chromatidy stanou samostatnými chromozomy nově vznikajících jader.

3.4.4 Telofáze

V telofázi se kolem chromozomů znovu vytvoří jaderný obal. Dojde k zániku dělicího vřetenka. Obě nová jádra mají stejný počet chromozomů jako jádro mateřské buňky. Chromozomy se postupně rozvolňují, až se stanou nepozorovatelnými světelným mikroskopem.

Po rozdělení jádra dojde k cytokinezi (rozdělení celé buňky). U živočišné buňky vznikne na povrchu dělicí rýha a buňka se postupně zaškrtní pomocí stažitelného prstence, který vzniká na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a je tvořen mikrofilamenty. Tímto způsobem vzniknou dvě nové dceřiné buňky.

3.5 Kultivační požadavky buňky in vitro

(ČINÁTL a NOVÁK, 1968)

Růst buněk je ovlivňován teplotou, osmotickým tlakem, pH a přítomností nezbytných iontů. Buňky požadují k růstu sacharidy, aminokyseliny, vitaminy a mnohdy ještě další faktory, které jsou přidávány do média odůvodněně či na základě dobrých zkušeností. Jsou to např. různé koenzymy, hormony nebo i látky metabolicky inertní, jako je methylceluloza či PVP (polyvinylpyrolidon). K růstu buněk je potřeba i plynů, kyslíku a oxidu uhličitého. Nevýhodou je, že buňky na povrchu ploché vrstvy dostávají více živin a kyslíku než buňky vespod, které kvůli tomu odumírají. Odborníci proto začali buňkám poskytovat různá lešení, díky kterým buňky přirozeněji rostou. Takovým biologickým lešením je substance z tukových buněk, která tvoří extracelulární matrix. V živém organismu je extracelulární matrix prostředím, které buňky obklopuje, spojuje a chrání. Umožňuje jejich vzájemnou komunikaci a podílí se na diferenciaci buněk. Odborníci zjistili, že lepivá hmota z tukových buněk může vytvořit základní membránu, ve které se kmenové buňky mohou uchytit a dospět do tkáňových buněk, které vytvářejí látky, jenž nepotřebné „lešení“ pomalu rozloží. Ke stejnému účelu se používaly směsi proteinů, které sekretují rakovinné buňky a proto se nedají použít v tělech pacientů. Biologické „tukové lešení“ by proto představovalo mnohem výhodnější alternativu (ČRo LEONARDO, 2010a). Vědci z Texas Medical Centre v Houstonu vynalezli trojrozměrné pěstování, které se bez tohoto (viditelného) lešení obejde. Díky smíchání buněk lidského glioblastomu s upravenými fágovými viry, které posloužily jako nosiče železa. Viry svůj magnetický náklad propašovaly přes buněčnou membránu dovnitř buněk, které pak vědci přemístili na Petriho misku s magnetickým víčkem. V přesně nastaveném magnetickém poli se buňky s nákladem železa shlukují do kulovitých chomáčků, které „levitují“ těsně nad povrchem misky. Buňky

v nich rostou, dělí se a vytvářejí trojrozměrnou strukturu, jenž mohou vědci využít při studiu nádorů (ČRo LEONARDO, 2010b).

Při teplotě 45 °C hynou buňky asi za 30 min., při teplotě 42 °C mohou žít 12 - 24 hod. Při pokojové teplotě, tj. 20 - 25 °C je jejich růst minimální, tuto teplotu (stejně jako 4 °C) lze použít k jejich krátkodobému uchování. Buňky jsou značně poškozeny teplotami 0 °C až -40 °C, při této teplotě vydrží 4 měsíce. Teploty pod -60 °C umožní za určitých podmínek jejich dlouhodobou, tj. i několikaletou úschovu bez ztráty životnosti. Osmotický tlak se pohybuje kolem 7,6 atm., což odpovídá snížení bodu mrazu média na 0,63 °C. Buňky tolerují změnu v rozmezí + - 10 % od této hodnoty. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 7,1 - 7,4. Buňky mohou žít a růst při pH 6,8 - 7,8, některé buňky přežijí den i více při pH 8. Metabolicky nezbytné ionty jsou: Na, K, Ca, Mg, Cl, PO₄, CO₂ někdy i SO₄, jejich zdrojem jsou především anorganické soli. Sodík udržuje osmotický tlak média, draslík má podobný význam uvnitř buňky, vápník a hořčík jsou nezbytné pro funkci některých intracelulárních enzymů. Vápník může být spojen se změnami konsistence cytoplazmy, tyto dva ionty jsou důležité pro uchycování buněk na kultivačním povrchu a jejich rozprostření. Železo je důležité pro dýchací fermenty. Fosfátové ionty jsou podstatné pro energetický metabolismus a ovlivňují pH.

3.5.1 Laboratoř tkáňových kultur

Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat v čisté laboratoři. Základní pomůckou je laminární box, inkubátor s řízenou atmosférou (zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého a vysoká relativní vlhkost) a inverzní mikroskop, vybavený fázovým kontrastem. Je třeba řada dalších pomůcek a přístrojů. Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby s upraveným povrchem a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami (VEJRAŽKA, 2013).

3.5.2 Typy kultur živočišných buněk

Primo kultury (primární kultury) jsou buňky či tkáň čerstvě odebrané z organismu. Nejvhodnější jsou embrya nebo mladí jedinci. Z celé populace, která je vložena do živného média, přežívá jen část buněk, které se nejlépe přizpůsobí novým

podmínkám. Přizpůsobené buňky se dělí. Tato kultura existuje několik dní, potom je nutné rozmnožené buňky převést do nového média. Primo kultury mají diploidní sadu chromozomů. Jde o směs různých typů buněk původní tkáně (epiteloidní, fibroblasty). Buněčné kultury se dělí na sekundární (diploidní) kmeny a buněčné heteroploidní linie. Sekundární (diploidní) kmeny vycházejí z primárních kultur a vznikají z buněk, které se v podmínkách *in vitro* začaly rozmnožovat, mají diploidní chromozomovou výbavu, ale oproti primárním kulturám obsahují vyselektovaný typ buněk. Mohou se pasážovat až 50 x zhruba po dobu jednoho roku. Buněčné heteroploidní linie se získávají cílenou selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních nebo chemických mutagenů nebo přímo z nádorových buněk (HeLa), jsou plně adaptovány na podmínky *in vitro* a mohou být pasážovány neomezeně dlouhou dobu. Jejich charakter se mění během pasážování, buňky v kultuře se často liší od buněk tkání, ze kterých byly získány. Jejich charakteristickým znakem je heteroploidní počet chromozomů (MICHLE, 1977).

Permanentní buněčné linie jsou charakteru nádorových buněk, plně adaptovány na podmínky *in vitro*, neomezeně se dělí. Jednou z nejznámějších je buněčných linií je HeLa (Henrietta Lacks), (KOČÁREK a kol., 2006).

3.5.3 Myší fibroblasty

Myší fibroblasty jsou základním typem buněk užívaných ke kultivaci hES buněk (lidské embryonální kmenové buňky). Izolují se z myších embryí starých 12,5 dnů. Použití mFF je v důsledku senescence buněk omezeno do 4. - 5. pasáže (RICHARDS a kol., 2002) a dále již není podpora růstu hES buněk optimální. Kultivace s využitím mFF s sebou nese také riziko přenosu mykoplazmat a endogenních retrovirů na hES buňky (PARK a kol., 2003). Použití linií izolovaných a kultivovaných v přítomnosti mFF pro buněčnou terapii je z těchto důvodů vyloučeno. Myší fibroblasty a nádorové buňky různých savců se v důsledku tzv. *in vitro* transformace často stávají aneuploidními (zpravidla mezi diploidními a tetraploidními). Tyto buněčné linie jsou imortalizované (nesmrtelné). Je zřejmé, že vznik kontinuální buněčné linie zpravidla souvisí s karcinogenitou. Většina normálních buněk neposkytuje kontinuální buněčné linie. Např. lidské fibroblasty zůstávají euploidní (s původním počtem chromozomů) během celé doby života a při

krizi, která nastává in vitro přibližně po 50 generacích, se jejich dělení zastavuje (FUSEK, 2008).

3.6 Hodnocení vlivu prostředí biologickými testy

(BŘEZINA, 2014)

Biologické testy jsou první etapou zkoušek, se kterou se lze setkat při hodnocení vlivu různých látek (včetně xenobiotik). Biologické testy jsou citlivé, nejsou však selektivní. To znamená, že lze zachytit reakci buněk, která je společná mnoha rozdílným vlivům, aniž je možno určit, o jakou látku jde. Pomocí těchto testů lze zachytit například některé toxické látky. Testy cytotoxicity jsou definovány normativně a obvykle směřují do medicínských aplikací při zkouškách biokompatibility.

V práci byly využity biologické testy pro zjištění, zda extrakt lyofylizátu z odběru kolonie *Pectinatella magnifica* má v buněčné populaci vliv toxický nebo stimulační. Základem testů je zjištění reparace cytoskeletu po inokulaci (dilatace neboli spreading), růstové rychlosti (vyjádřené buď specifickou růstovou rychlostí, nebo průměrnou dobou zdvojení buněčné populace) a zjištění mitotické aktivity, popřípadě atypických mitóz, zpětných buněčných fúzí, popřípadě změněné buněčné morfologie, anebo buněčné lokomoce. Tyto parametry lze dobře sledovat v průběhu života buněčné populace pomocí časosběrné mikrokinematografie. Metoda má jednu velkou výhodu - buněčné projevy jsou hodnoceny ze záznamu a jsou k dispozici následným vyhodnocováním.

3.7 Dilatace

Odpovídá anglickému termínu „spreading“. Jedná se o reakci buněk in vitro po pasážování, kdy je sledován průběh dynamiky rozprostírání buněk na substrátu, kterým je obvykle dno kultivační misky (PŮŽA, 1976).

Cytoskelet (samostatná síť mikrotubulů, mikrofilament a intermediárních filament v cytoplazmě buňky), který je při pasážování trypsinem, či versenem pozměněn, se vrací do funkčního stavu, odpovídajícího fyziologické funkci buňky.

Dynamika dilatace je pozměněna vlivem látek v kultivačním prostředí, je pozorována změna v průběhu dilatace (NEČAS a kol., 1991).

Buňky pěstované in vitro pro stanovení toxicity implantačních materiálů, zejména stomatologických, popsal již doc. MUDr. Vladimír Půža, CS.c., který v roce 1952 přešel na lékařskou fakultu do Hradce Králové, kde probíhalo studium dynamiky cytologických procesů, studium pojiva ve vztahu ke stárnutí a cytogenetický výzkum. Doc. Půža zavedl pěstování savčích buněk in vitro a metodu časosběrné mikrokinematografie. Na katedře se věnoval hlavně dynamice buněčných pohybů a dynamice změn buněčných organel (např. jádérka). Dále byly vypracovány speciální metodiky pro sledování poruch buněčného dělení živočišné buňky Dr. Srbem. V 70. - 80. letech se vědecká katedra zaměřila na diferenciaci buněk (ve svalových syncytiích), dále studium myoblastů a vyústilo to v uměle navozenou fúzi buněk. Jako modelový systém se využívalo fúze buněk navozené Sendai virem a později fúze navozené polyethylen glykolem. Dále byla studována toxicita zdravotnických materiálů. Poté se katedra zajímala využitím fúze buněk in vitro pro přenos genetické informace, později interakcí některých látek s DNA. V tomto ohledu došlo k vývoji nového cytostatika cisplatin. Měření cytotoxicity in vitro vedlo ke snaze studovat i buněčné a molekulární mechanismy buněčné smrti, hlavně ke studiu dynamiky apoptózy, včetně využívání analýzy DNA. Také se studovala témata týkající se toxicity sloučenin chromu jako významné složky znečištěného životního prostředí a studium invazivity nádorových buněk in vitro (PŮŽA, 1990).

3.8 Mitotická aktivita

Mitotická aktivita je chápána jako počet dělení buněk (rozdělení genomu mateřské buňky do dvou buněk dceřiných a následné rozdělení mateřské buňky) v určeném časovém intervalu, který je stanovený z časosběrného záznamu (NEČAS a kol., 1991).

Je odlišný od termínu „mitotický index“, který je stanovován z pevného časového bodu. Mitotická aktivita je určena počtem dělících se buněk v časových intervalech popřípadě jako funkce narůstajícího počtu dělení v čase. Je vlastností buněčné populace, ovlivněné vnějším faktorem (PŮŽA, 1976).

3.9 Růstová rychlost

Růstová rychlost je zmnožení buněčné populace za určitou dobu. Je rovněž ukazatelem růstu biomasy a zobrazuje kvalitu vnějších a vnitřních podmínek růstu. Růstová rychlost je vyjadřována jako specifická růstová rychlost, a-nebo jako průměrný čas zdvojení buněčné populace. Pro vyjádření růstu v čase,- je konstruována růstová křivka,- jako funkce počtu buněk (či jinak vyjádřené biomasy). Vlivem změněného prostředí je ovlivněna růstová rychlost sledované populace (PŮŽA, 1976).

3.10 Růstová křivka buněčné kultury

Růstová křivka se skládá z několika fází. První fází je lag - fáze, při níž počet buněk v médiu nejprve poklesne, což je způsobeno adaptací na kultivační prostředí. Po tomto úvodním procesu začíná velikost populace rapidně růst. V log - fázi (logaritmická resp. exponenciální fáze), ve které roste počet buněk v kultuře exponenciálně, je možné zachytit vysoký podíl buněk při mitóze. Následuje stacionární fáze, při níž se buňky přestávají množit, což je způsobeno inhibičními mechanizmy, (např. kontaktní inhibice), a částečně vyčerpáním živného média. K fázi úbytku buněk dochází při nedostatku živin, snížení pH díky zvýšení obsahu oxidu uhličitého, či kumulaci toxických produktů metabolismu (KOČÁREK, 2006).

4. Metodika

4.1 Sběr biologického materiálu v přírodě, zpracování a získání extraktu

Sběr kolonií bochnatky americké probíhal 30.8. 2012 na lokalitě Cep. Celé kolonie (o různé velikosti) byly uloženy do plastového barelu a co nejrychleji dopraveny ke zpracování, které probíhalo v prostorách Centra biologických technologií Nové Hradky. Materiál z barelu zde byl rozdělen na ploché plastové misky (vhodné k pozdější lyofilizaci), každá miska byla označena (lokalita, datum sběru) a vložena do igelitového sáčku, ten byl pevně uzavřen a vložen do mrazicího boxu, kde byl uchováván při teplotě -26 °C na JAIP. Další vzorky byly uchovány v hlubokomrazicím boxu při -55 °C na Nových Hradech, a v Českých Budějovicích při -75 °C až do doby, kdy byl obsah lyofilizován.

4.2 Tkáňové kultury

Metodika práce v laboratoři tkáňových kultur byla převzata od pracovníků akreditované laboratoře, z Centra biologických technologií v Nových Hradech. Je to standardní technika práce (ČINÁTL a NOVÁK, 1968). Principem této techniky je zajistit sterilní podmínky pro kultivaci, živná média a fyzikální podmínky (teplota, pH, výměna plynů). Pro účely této práce byla zvolena metoda transparentně užívaná při stanovení cytotoxicity živočišných buněk (norma ČSN EN ISO 10 992 v podmínkách normy ČSN EN ISO 17 025). Tyto normy specifikují metody pro stanovení cytotoxicity. Z nich byly vybrány metody, které určují cytotoxicitu na základě dilatace (spreading), (PŮŽA, 1976), dále rychlosti růstu buněčné populace (pomocí specifické růstové rychlosti, resp. průměrné době zdvojení) a počtu dělení buněk v určitých časových intervalech (ČINÁTL a NOVÁK, 1968). Reakce buněk byla filmována v režimu sběrné mikrokinematografie a filmové záznamy byly hodnoceny kvalitativně a kvantitativně.

4.2.1 Tvorba médií (pokusných variant) a kultivace buněk

K pokusům byla vybrána heteronukleární linie L929, což je myší fibroblastoidní linie, užívaná pro podobné pokusy z důvodů její dobré reaktivnosti na cizorodé látky a lokomoci (pohyblivosti) buněk. Jednalo se o permanentní (heteronukleární) linii (tzn., že nebyl přítomen diploidní počet chromozomů). Buněčná kultura pochází z Evropské sbírky buněčných kultur – ECACC.

Buněčná linie je pěstována v termostatu BBD 6220 s řízenou atmosférou 5 % CO₂ a řízenou teplotou 37 °C, v médiu MEM s přísadkou antibiotik a antimykotik. Tak je kultura udržována po dobu pokusů. Vlastní experimentální kultivace probíhala v Petriho miskách (při stejných podmínkách). Buněčná populace byla stažena z povrchu kultivační lahve pomocí trypsinu nebo versenu, odstředěna a smíchána s vybranou variantou extraktu lyofilizátu z kolonií bochnatky. Potom byly buňky inokulovány (naočkovány) do kultivační misky. Proces následné kultivace byl snímán na Nikon Biostation (zařízení, které plně řídí optimální podmínky kultivace v Petriho misce, přičemž záznamové zařízení je schopno z jedné misky monitorovat až 7 zorných polí mikroskopu současně), metodou sběrné kinematografie („time-

lapse cinemicrography“). K prvním pokusům byla užita tři zorná pole, při zvětšení 20 x s použitím fázového kontrastu.

Buňky byly inokulovány do experimentální misky ve výsledné hustotě cca 30 až 50 buněk na zorné pole mikroskopu. Výsledkem záznamu kultivace byly časosběrné snímky z mikroskopu (interval mezi expozicemi, tedy jednotlivými snímky, byl 2 min.) v trojím opakování.

Pro testování cytotoxicity byla hodnocena specifická růstová rychlost, dilatace a mitotická aktivita buněčné kultury rostoucí v médiu s extrakty (4 způsoby extrakce) z lyofilizátu kolonie *P. magnifica* v porovnání s kontrolou (bez extraktu z lyofilizátu).

4.2.2 Příprava extraktů z lyofilizátu kolonií *P. magnifica*

Extrakt z lyofilizátu byl připraven ve 4 variantách (čtyřech způsobech extrakce lyofilizátu): (37 °C/24 hodin, 37 °C/1hod, 5 °C/24 hod, 5 °C/1hod). Extrémní hodnoty teplot a doby extrakce byly zvoleny pro orientaci, zda se dostaví v přirozených přírodních podmínkách efekt. Všechny varianty extraktů byly vyluhovány v růstovém médiu MEM bez séra a antimykotik za současného třepání (60 kmitů/min) v temperované třepačce. Navážka byla 1 g lyofilizátu do 100 ml média. Vzniklé roztoky byly užity přímo, bez dalších ředění. Kontrola, trvající 72 h., byla třepána stejným způsobem, pouze bez přídavku jakékoliv látky. Extrakty byly bakteriálně přefiltrovány a doplněny 5 procenty fetálního telecího séra (telecí sérum bylo přidáno při inokulaci). Pokusy byly provedeny ve třech opakováních ve stejném kultivačním prostředí.

Smyslem pokusů bylo otestovat chování buněk v podmínkách extraktu lyofilizátu cormu bochnatky (tj. celých kolonií včetně matrix, zooidů a uvolňovaných statoblastů, tak jak byly odebrány z lokality). Zkoušky byly podrobeny lyofilizáty, louhované za rozdílných fyzikálních podmínek (teplota a čas louhování). Každá varianta byla srovnávána s kontrolou, která byla podrobena stejnému režimu louhování (ovšem bez lyofilizátu).

Chování buněk bylo odečítáno z kinematografických záznamů. Biologický efekt byl testován ve třech parametrech. 1. Dilatace (spreading), která ukazuje rychlost reparace cytoskeletu buňky a tím návrat do jejího fyziologického stavu po inokulaci, 2. Specifická růstová rychlost, která ukazuje, zda je ovlivněn růst buněčné populace, 3. Morfologické anomálie buněk a populace během růstu, spolu s monitorováním dělení buněk pomocí frekvence mitóz.

4.3 Dilatace (spreading)

Dilatace je ukazatelem rychlosti reparace cytoskeletu buněk po inokulaci (rychlosti návratu do fyziologického stavu).

K této analýze byla připravena série po sobě následujících obrázků (v čase 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 minut). V obrázcích byl zjišťován počet dilatovaných a nedilatovaných buněk, z toho byl vypočten celkový počet buněk v obraze. Index dilatace byl zjišťován pro každý časový interval (čili hodnocený snímek) a byl dán vztahem:

Index R = počet buněk dilatovaných / celkový počet buněk x 100 (%)

Hodnoceny byly záznamy, obsahující 60 až 120 minut po spuštění experimentu. Po této době byla dilatace dokončena a nastal běžný buněčný cyklus, nebo byl cyklus zastaven a buňky odumřely. V kontrolních pokusech byla obvykle buněčná populace plně dilatována po 50 ti minutách (graf č. 1).

4.4 Specifická růstová rychlost (SRR)

Průměrné doby zdvojení (PDZ) počtu buněk

Tato veličina ukazuje, zda je ovlivněn růst buněčné populace.

Zjišťován byl počet buněk v časově následujících zorných polích záznamu. Získaná data byla dále analyzována. Kvantitativní analýza záznamu spočívala ve stanovení počtu buněk ve vybraných snímcích, tzn. v prvním snímku v čase 0 h. a posledním snímku v čase 72 h., kde byl spočítán počet buněk, který byl následně zlogaritmován. Pomocí měnicího se počtu buněk v čase byla stanovena specifická růstová rychlost

(SRR, často udávaná také jako parametr mí (u), resp. průměrné doby zdvojení (PDZ) počtu buněk, (graf č. 2).

Vzorec pro výpočet SRR:

$$\text{SRR} = (\ln N_t - \ln N_0) / \text{delta } t$$

z toho lze stanovit průměrnou dobu zdvojení značenou jako PDZ:

$$\text{PDZ} = \ln 2 / \text{SRR}, \text{ (graf č. 3).}$$

4.5 Mitotická aktivita

Monitoring dělení buněk pomocí frekvence mitóz zahrnuje i frekvenci výskytu morfologických anomálií buněk a populace během růstu. Byl stanoven a zaznamenán čas každého dělení. Postupně byla ve snímcích vyhledávána pole, ve kterých došlo k mitóze. Zaznamenáváno bylo číslo snímku (pole), v němž nastala mitóza (rozdělení buňky) a byl zapsán počet rozdělených buněk v daném snímku. Číslo pole bylo vynásobeno dvěma, aby byl zjištěn čas. Po zhlédnutí všech snímků z daného záznamu byl zjištěn počet mitóz (graf č. 4 a 5).

Všechny výsledky z vyhodnocení dilatace, mitotické aktivity a specifické růstové rychlosti byly zapisovány do elektronické podoby v softwaru Microsoft Office Excel 2007. Data byla uspořádána do tabulek, z nichž byly sestrojeny grafy č. 1 - 5, které jsou ve výsledcích.

4.6 Sledované lokality

Terénní průzkum rozšíření zkoumaného druhu probíhal v letech 2012 a 2013 přímo v řekách Lužnice a Vltava a rovněž ve vytipovaných vodních nádržích v okolí. Byly revidovány lokality, na nichž byl výskyt bochnatky zaznamenán v minulosti. Místa průzkumu jsou vyznačena na mapě č. 1 - 11 v příloze 2. V roce 2012 byl průzkum proveden 30.8. na 8 lokalitách (rekreační středisko AMU, Hněvkovická hráz a jez, Vápenský rybník a rybník Vojtíšek v Albrechticích, Kořensko, Bechyně a Dobronice u Bechyně) a 5.9. 2013 na 10 lokalitách (rekreační středisko AMU, Hněvkovická hráz a jez + okolí chatky, Vápenský rybník a rybník Vojtíšek v

Albrechticích, Kořensko, Nuzice, Bechyně a Dobronice u Bechyně). Na každé lokalitě byl vždy zaznamenán výskyt kolonií *Pectinatella magnifica*, byly změřeny základní fyzikálně - chemické parametry (průhlednost vody Seccioho deskou, vodivost, pH, teplota a obsah kyslíku pomocí multimetru WTW Multi 3430 s kombinovanou elektrodou). Na lokalitách byla rovněž pořizována fotodokumentace (Příloha č. 2).

Výsledky jsou v tabulkách č. 1 a 2. Pro porovnání jsou za těmito tabulkami zařazeny srovnatelné parametry z lokalit s výskytem *P. magnifica* z Třeboňska (tab. 3 a 4).

Veškerá fotografická dokumentace byla vytvořena fotoaparátem Panasonic DMC-LS85.

Není-li uvedeno jinak, je autorkou fotografií Karolína Šusterová.

Tato práce byla podpořena z projektu GAČR č. P503/12/0337.

5. Výsledky

Statistické hodnocení pomocí Kolmogorov Smirnovův testu

(BAŠTINEC, 2009)

Jedná se o metodu matematické statistiky, která umožňuje testovat, zda dvě jednorozměrné náhodné pocházejí ze stejného rozdělení pravděpodobnosti, případně zda jedna jednorozměrná náhodná proměnná má předpokládané (teoretické) rozdělení. Autory této metody jsou Andrej Nikolajevič Kolmogorov a Vladimir Ivanovič Smirnov. Existují dvě verze testu, jednovýběrový a dvouvýběrový.

Test pro jeden výběr ověřuje, zda se rozdělení náhodné veličiny v populaci liší od určitého teoretického rozdělení. Využívá se např. pro ověření, zda má proměnná normální rozdělení. Nulová hypotéza předpokládá, že testovaný výběr odpovídá teoretickému rozložení. Vstupem této varianty testu je k tříd testovaného výběru a předpokládané teoretické rozdělení, které se rozdělí do stejného počtu tříd. Nad každou třídou testovaného výběru se spočítají četnosti n_{1i} a nad každou třídou teoretického rozdělení se spočítají četnosti n_{2i} . Dále se hodnotí rozdíl kumulativních

četností pro výběr $N_{1i} = \sum_{j=1}^i n_{1j}$ a pro testované rozdělení $N_{2i} = \sum_{j=1}^i n_{2j}$.

Hodnoceným kritériem je pak $D_1 = \frac{1}{n} \max_i |N_{1i} - N_{2i}|$, kde n je celkový počet prvků výběru.

Hodnota kritéria D_1 se porovná s kritickou hodnotou D_{1max} pro danou hladinu významnosti α . Tato kritická hodnota bývá pro $n \leq 40$ tabelována (např. zde), pro $n > 40$ se spočítá podle následující tabulky.

Hladina významnosti α	$D_{1\max}$
20 %	$\frac{1.07}{\sqrt{n}}$
10 %	$\frac{1.22}{\sqrt{n}}$
5 %	$\frac{1.36}{\sqrt{n}}$
2 %	$\frac{1.52}{\sqrt{n}}$
1 %	$\frac{1.63}{\sqrt{n}}$

Jestliže je hodnota kritéria D_1 větší než kritická, tak se nulová hypotéza zamítá. Pokud je tomu naopak, tak se přijímá.

V této bakalářské práci byl použit test pro dva výběry (dvouvýběrový test), který srovnává rozdělení dvou náhodných veličin. Jedná se o nejpoužívanější neparametrickou metodu porovnávání dvou výběrů. Nulová hypotéza říká, že dva výběry odpovídají stejnému rozdělení. V této variantě testu se srovnává rozdíl kumulativních četností ($n \leq 40$) nebo relativních kumulativních četností ($n > 40$) dvou výběrů (kde n_1, n_2 jsou celkové počty prvků výběru). Relativní kumulativní

četnosti se spočítají jako $F_{1i} = \frac{1}{n} N_{1i}$ resp. $F_{2i} = \frac{1}{n} N_{2i}$. Hodnoceným kritériem je $D_2 = \max_i |N_{1i} - N_{2i}|$ resp. $D_2 = \max_i |F_{1i} - F_{2i}|$.

Kritické hodnoty se pro danou hladinu významnosti α určí z následující tabulky.

Hladina významnosti α	D_{2max}
20 %	$1.07 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
10 %	$1.22 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
5 %	$1.36 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
2 %	$1.52 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
1 %	$1.63 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$

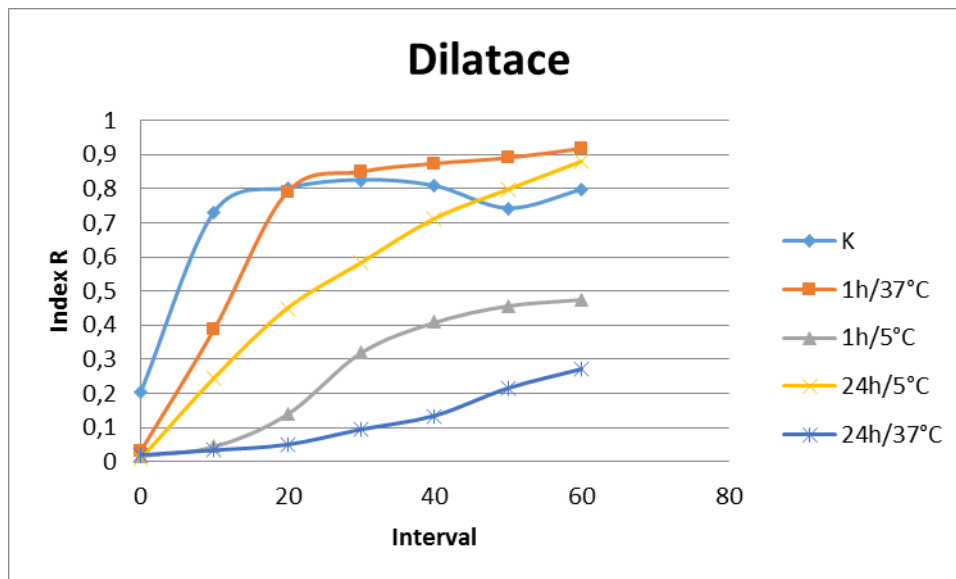
Jako v předchozí variantě platí, že nulová hypotéza se zamítá, jestliže je hodnota kritéria D_2 větší než kritická D_{2max} . V opačném případě se přijímá.

Výsledky: D_2 vyšlo větší než D_{2max} , tzn., že počty mitóz v jednotlivých skupinách během 72 hodin nepatří do jednoho základního souboru, vzájemně se liší.

Tkáňové kultury

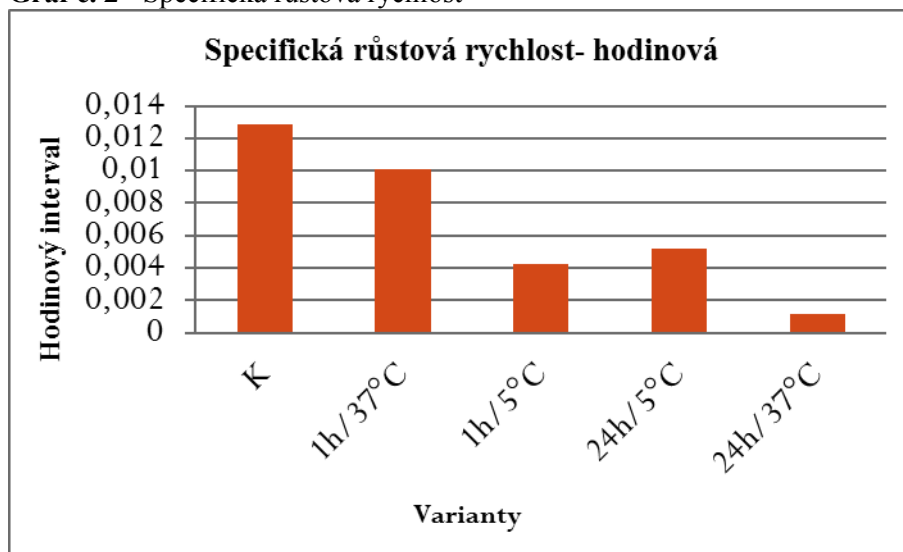
Graf č. 1 – Dilatace buněk (spreading), během 60 min.

Ukazuje rychlost reparace cytoskeletu buněk po inokulaci – rychlost návratu do fyziologického stavu. Interval (min), Index R (počet buněk dilatovaných / celkový počet buněk x 100 (%)) na ose y a jednotlivé varianty na ose x.



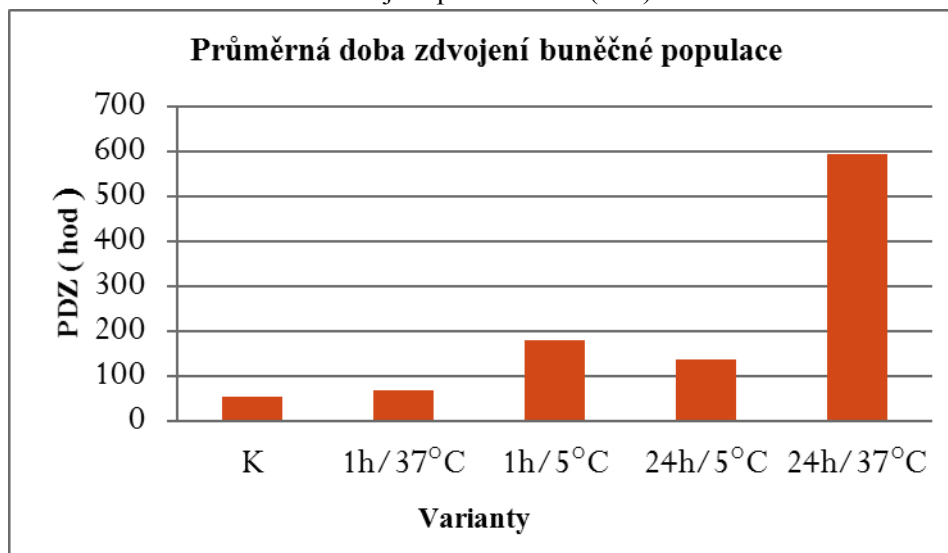
Z křivek průběhu dilatace bylo zjištěno, že maximální inhibice reparace cytoskeletu byla u extraktu obecného lyofilizátu, připraveného při 37 °C po dobu 24 hodin. Při použití extraktu vyluhovaného po dobu 1 hodiny při 37 °C došlo naopak k rychlé reparaci funkce cytoskeletu. Kontrolní kultivace vykazovala depresi po čtyřicáté minutě, což bylo způsobeno počínajícím buněčným dělením. Pomalá reparace cytoskeletu byla pozorována u extraktu, připraveného po dobu 24 hodin při teplotě 5 °C. Extrakt připravený při 5 °C po dobu 1 hodiny vykazoval překvapivou inhibici reparace cytoskeletu.

Graf č. 2 - Specifická růstová rychlost



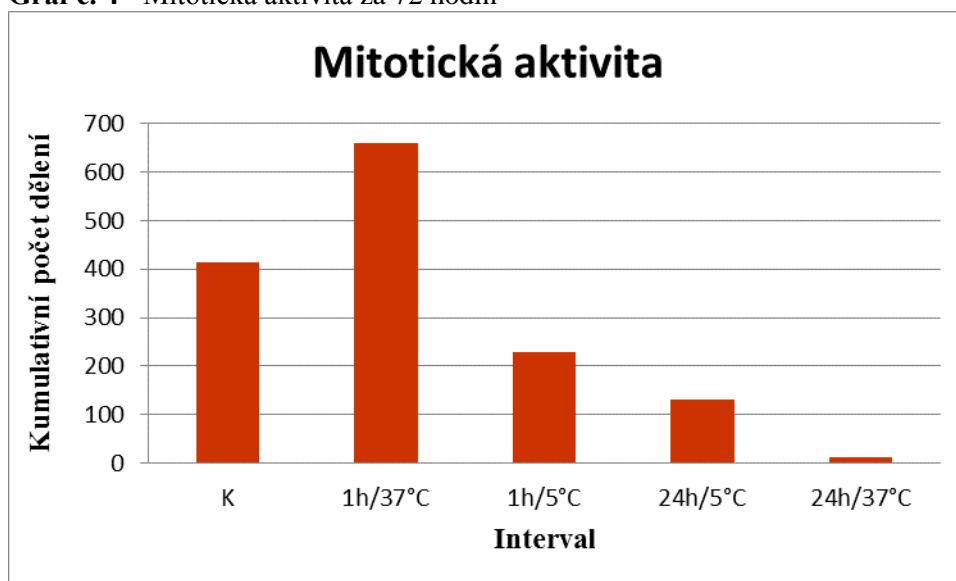
Maximální specifickou růstovou rychlost vykazovaly buňky kontrolní kultivace. Extrakt obecného lyofilizátu (1 h. a 37 °C) tlumil růstovou rychlost buněk a extrakt (1 h. a 5 °C) růstovou rychlost výrazně zpomaloval. Růstová rychlost se oproti tomu mírně zvýšila u extraktu (24 h. a 5 °C). Nejnižší růstovou rychlost měly buňky u extraktu (24 h. a 37 °C).

Graf č. 3 - Průměrná doba zdvojení počtu buněk (hod)



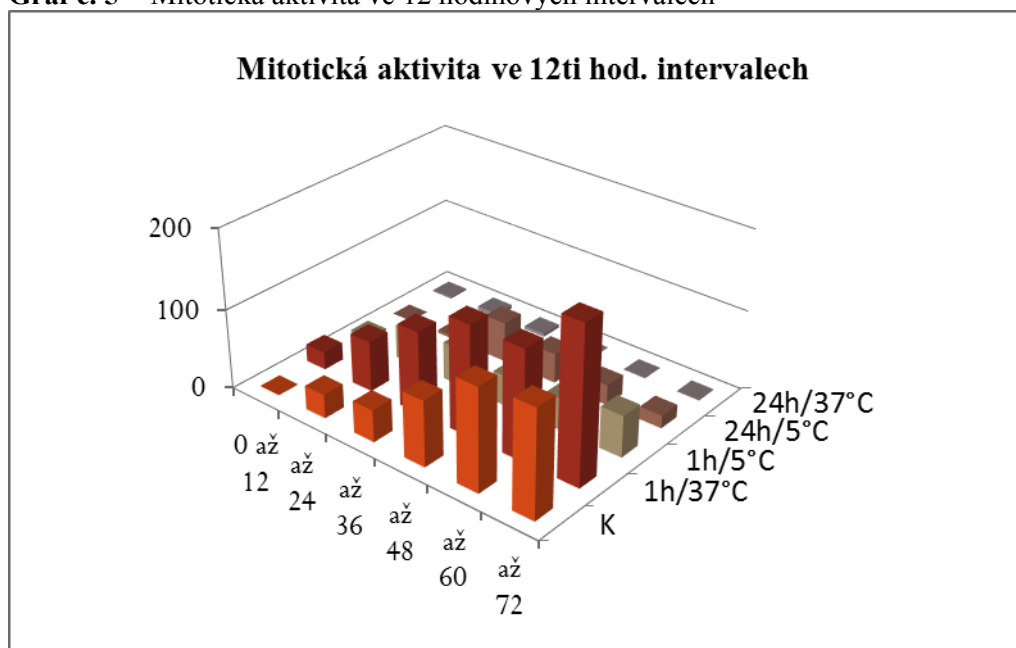
Nejkratší průměrná doba zdvojení buněk byla zaznamenána u kontrolní kultivace. U pokusných variant byla doba zdvojení počtu buněk delší. Graf č. 3 je jen názornější vizualizací grafu č.2

Graf č. 4 - Mitotická aktivita za 72 hodin



Mitotická aktivita dosáhla maxima u extraktu (1 h. a 37 °C), počet dělení byl dokonce vyšší než u kontroly. Nejnižší byl počet dělení buněk u varianty s extraktem (24 h. a 37 °C).

Graf č. 5 - Mitotická aktivita ve 12 hodinových intervalech



Směsi látek z extraktu kolonie bochnatky, vyluhovaných do růstového média za různých podmínek, měly na mitotickou aktivitu buněk rozdílný vliv. Varianta média s lyofilizátem (1 h. a 37 °C) měla, v porovnání s kontrolou, na mitotickou aktivitu buněk dokonce stimulační vliv. Ostatní varianty (s lyofilizátem vyluhovaným při nižší i vyšší teplotě, po stejně krátkou ale i delší dobu) mitózy tlumily, případně zcela inhibovaly (varianta 24 h. a 37 °C).

5.2 Průzkum výskytu a rozšíření druhu *P. magnifica* na Vltavotýnsku

Prozkoumáno bylo ve dvou letech (2012 a 2013) opakovaně celkem 8 lokalit, z toho 3 lokality (Bechyně, Dobronice, Nuzice) na celkem 8,306 km dlouhém úseku Lužnice a 5 lokalit na celkem 33 km dlouhém úseku Vltavy (Rekreační středisko AMU, hněvkovická hráz a jez, Vápenský rybník a rybník Vojtíšek v Albrechticích a Kořensko).

V roce 2012 byla bochnatka nalezena pouze na dvou lokalitách z osmi kontrolovaných, a to na rekreačním středisku AMU, kde byl slabý povlak bochnatky na ponořených větvích, a na Vápenském rybníce, kde bylo nalezeno cca 10 kusů kolonií bochnatky na větvích růže šípkové, třešně ptačí a vrby, ponořených do vody. Na ostatních lokalitách (Hněvkovická hráz a jez, rybník Vojtíšek v Albrechticích, Kořensko, Bechyně a Dobronice u Bechyně) bochnatka nebyla v roce 2012 nalezena.

V roce 2013 byl zjištěn hojnější výskyt, než v předchozím roce. Bochnatka byla nalezena na 5 lokalitách z 10 kontrolovaných. Na rekreačním středisku AMU, Hněvkovickém jezu, okolí chatek v Hněvkovicích a Bechyni byla nalezena vždy jedna kolonie bochnatky bez řas. Bochnatka byla velká cca 10 cm a vyskytovala se na ponořených větvích, kromě lokality Bechyně, kde byla bochnatka uchycena ke kameni. Na Kořensku bylo nalezeno 6 kusů bochnatky přirostlé ke kamenům a ke dnu loďky (Příloha 2, obr. č. 8).

Tab. č. 1 – Výsledky revize výskytu kolonií *P. magnifica* na lokalitách – Vltava (V) a Lužnice (L)

30.8.2012	Lokalita	Řeka	Teplota (°C)	Vodivost [μS/cm]	pH	O2 [mg/l]	Výskyt <i>P.m.</i>
Rekreační středisko AMU (Poněšice)		V	20,1	189,9	7,45	10,87	+
Hněvkovický jez		V	20,6	192	7,16	6,23	-
Hněvkovická hráz		V	20,9	191,3	7,29	6,68	-
Albrechtice, Vápenický rybník		V	23,5	222	7,26	9,57	+
Albrechtice, rybník Vojtíšek		V	26,4	190,5	7,58	7,77	-
Bechyně		L	21	240	8,03	7,62	-
Dobronice u Bechyně		L	21,2	241	8,4	8,82	-
Kořensko		L	23,5	208	7,49	8,31	-

Tab. č. 2 – Výsledky revize výskytu kolonií *P. magnifica* na lokalitách - Vltava (V) a Lužnice (L)

5.9.2013	Lokalita	Řeka	Teplota (°C)	Vodivost [μS/cm]	pH	O2 [mg/l]	Výskyt <i>P.m.</i>
Rekreační středisko AMU (Poněšice)		V	18,5	151	7,44	9,6	+
Hněvkovický jez		V	17,8	179	7,18	9,4	+
Hněvkovická hráz		V	18,2	190	7,16	9,2	-
Albrechtice, Vápenický rybník		V	18,5	267	7	10,9	-
Albrechtice, rybník Vojtíšek		V	19,9	259	7	7,3	-
Bechyně		L	19,4	270	8,7	10,1	+
Dobronice u Bechyně		L	21,3	266	8,8	12,3	-
Kořensko		L	19,7	182	7,3	7,1	+
Nuzice		L	18	278	8,3	11,5	-

Tab. č. 3 – Výsledky revize výskytu kolonií *P. magnifica* na lokalitě Třeboňsko

4.9.2012	Lokalita	Teplota (°C)	Vodivost [μS/cm]	pH	O2 [mg/l]	Výskyt <i>P.m.</i>
Hejtman		21,30	93,60	7,10	8,43	+
Nový Kanclíř		19,30	104,50	8,99	8,87	+
Veselí I		21,1	169,2	7,78	6,96	+
Veselí		21,1	114,4	7,94	7,71	+
Vlkov		20,6	176,2	7,78	7,12	+
Cep		21,10	167,30	7,51	6,91	+

(ŠINKO a kol., 2013)

Tab. č. 4 – Výsledky revize výskytu kolonií *P. magnifica* na lokalitě Třeboňsko

2.9.2013	Lokalita	Teplota (°C)	Vodivost [μS/cm]	pH	O2 [mg/l]	Výskyt <i>P.m.</i>
Hejtman		18,8	90,9	7,94	9,59	+
Nový Kanclíř		18,8	112	8	6,3	+
Veselí I		18,7	167	7,9	7,7	+
Veselí		19	177	7,7	7,7	+
Vlkov		19,1	177	7,78	7,8	+

(ŠINKO a kol., 2013)

6. Diskuse

Biologicky aktivní látky

Přítomnost toxických či alergizujících látek, které by případně mohly působit na zdraví člověka, dosud nebyla v koloniích *P. magnifica* zkoumána. Zatím sice nejsou známy žádné takové jedovaté či alergizující látky, ale neexistují ani informace o podobném výzkumu (ANONYMUS, 2009). Z vlastní zkušenosti vím, že při kontaktu s bochnatkou se zatím u nikoho neobjevila žádná vyrážka či jiný bezprostředně pozorovatelný zdravotní problém.

Při poškození kolonie však bylo pozorováno, že se nějaké látky uvolňují, mohlo by se jednat o výsledek obranného reflexu. Zápach bochnatky slouží snad jako obrana proti rybí predaci (DVOŘÁKOVÁ, 2009). Proběhlo několik pozorování, jež naznačují, že kolonie bochnatky obsahují zatím neidentifikované bioaktivní látky,

kteřé mají antibiotické a antipredační účinky a současně jsou dlouhodobě stabilní (to se projevuje např. tím, že rosolovitý materiál kolonií přetrvává ve vodních nádržích od srpna až do konce března následujícího roku (ŠINKO, 2010)).

Mořská mechovka *Begula neritina* (z Kalifornie) obsahuje látky zvané bryostatiny, které jsou pro své cytotoxické působení nadějnými léky proti rakovině (DVOŘÁKOVÁ, 2009). V boji proti patogenům a v léčbě některých typů rakoviny se dá využít toho, že bryostatiny působí přímo na DNA v buňkách a brání jim tak v množení. Tyto látky účinkují proti leukémii, maligním melanomům, Hodgkinově lymfomu (nádory lymfatických uzlin) a rakovině ledvin. V současné době probíhají klinické testy samotných látek i jejich kombinací s doposud používanými chemoterapeutiky. Bylo by velice užitečné nalézt bohatý zdroj bryostatinu bez nutnosti intenzivní těžby mechovek, nebo vyvinout jeho syntetický ekvivalent, který by sloužil k léčení různých typů rakovinných nádorů (ČERNÝ, 2003).

Je známo, že ve vodních ekosystémech bochnatka filtruje vodu, žíví se fytoplanktonem a přispívá tak k omezení výskytu vodního květu a ke zvyšování průhlednosti vody. V matrix kolonií žije široké spektrum řas a sinic, dosud není jasné, o jaký typ symbiózy jde, avšak přítomnost biologicky aktivních látek v kolonii může souviset i s aktivitou těchto organismů.

V bakalářské práci byly provedeny a vyhodnoceny biologické testy, které pouze dokazují biologickou aktivitu přítomných látek, ze kterých však nelze přímo určit které biologicky aktivní látky kolonie *Pectinatella magnifica* produkují. Bližší poznání, resp. charakteristika těchto látek je předmětem zkoumání hlavního řešitele grantu GAČR č. P503/12/0337: Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Doplnující výzkum bude probíhat i na pracovišti tkáňových kultur FROV Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích, v Nových Hradech, na němž bych se velice ráda podílela v navazujícím studiu.

Sledované lokality

Úvahy o výskytu bochnatky na sledovaných lokalitách

V srpnu roku 2012 se bochnatka vyskytovala pouze na lokalitě rekreačního střediska AMU a ve Vápenském rybníce v Albrechticích. Fyzikálně – chemické parametry byly velice podobné i s ostatními lokalitami, kde bochnatka téhož roku nebyla nalezena, jediným odlišným parametrem u těchto dvou lokalit bylo množství kyslíku, které bylo vyšší, než na ostatních lokalitách. U rekreačního střediska AMU byla hodnota kyslíku 10,87 a ve Vápenském rybníce v Albrechticích byla nejvyšší hodnota kyslíku: 9, 57, ale také velmi vysoká vodivost: 222 μS . U Hněvkovického jezu nebyla bochnatka nalezena možná díky hnědému povlaku bakterií na kamenech, který se podle empirického pozorování nikdy nevyskytuje tam, kde je bochnatka. Je zajímavé, že v září o rok později, za chladnějšího počasí, byla bochnatka nalezena na pěti lokalitách, a to opět v rekreačním středisku AMU, u Hněvkovického jezu na ponořených větvích a u srubů, Bechyni a v Kořensku bylo nalezeno nejvíce kolonií bochnatky. Bochnatka se zde vyskytovala, jelikož měla vhodný podklad, uchytila se k ponořeným větvím, jako na lokalitách z předchozího roku, v Bechyni a Kořensku se dokonce vyskytovala i na kamenech, které nebyly pokryté žádným povlakem. Pro rychlé šíření bochnatky je podstatný nárůst průměrné teploty vody, která nejčastěji přesahuje 20 °C, jenž bochnatka potřebuje pro svůj život (ŠINKO, 2010).

Vltavotýnské lokality s výskytem bochnatky v letech 2012 i 2013 měly obsah O_2 kolem 9-10 [mg/l], zatímco na lokalitách bez výskytu bochnatky byla hodnota O_2 nižší. V Bechyni a Dobronicích u Bechyně, které se nacházejí na řece Lužnici, byla zaznamenána vysoká vodivost kolem 270 [$\mu\text{S}/\text{cm}$] a bochnatka se zde vyskytovala, zejména v letech 2010 a 2011 byl v těchto lokalitách masivní výskyt. Na Třeboňských lokalitách s masivním výskytem bochnatky byl O_2 velmi variabilní (v rozmezí od 6-8 [mg/l]), ale byly zaznamenány mnohem nižší hodnoty vodivosti, než na Vltavotýnských lokalitách. Na všech lokalitách s výskytem bochnatky bylo pH kolem 7-8. Bochnatka se zřejmě vyskytuje na lokalitách se zásaditým pH kolem 7-8 a s nižší hodnotou vodivosti.

Na základě dvouletého průzkumu (navazujícímu na amatérská hlášení o výskytu bochnatky z předchozích let) lze shrnout, že se tento živočich vyskytuje v

celém sledovaném úseku Vltavotýnska. V různých letech může být pozorován na různých místech, přičemž za příhodných podmínek, (které ovšem zatím nejsou zcela známé), je schopen lokálně vytvořit velké množství kolonií nebo kolonie o velkých rozměrech, avšak v následujícím roce na témže místě nemusí být zjištěn vůbec. Právě výzkum vlivu podmínek na populační dynamiku druhu, včetně invazních projevů, skýtá velký prostor pro budoucí výzkum.

7. Závěr

Na základě výsledků kultivace buněčné kultury v médiu s extraktem lyofilizátu z kolonie druhu *Pectinatella magnifica* byla potvrzena biologická aktivita látek, produkovaných kolonií tohoto druhu mechovky.

Z lyofilizátu kolonií se za různých (teplotních) podmínek postupně uvolňují látky (nebo jejich směsi), které vykazují různé biologické účinky na fyziologii savčích buněk.

Dvouletý průzkum (navazující na amatérská hlášení o výskytu bochnatky z předchozích let) ukázal, že se tento živočich vyskytuje v celém sledovaném úseku Vltavotýnska.

8. Seznam použité literatury

ANONYMUS (2009): Rybníky zaplavuje sliz! Na jihu Čech řadí odporná bochnatka americká, AHA 25.8.2009

BALOUNOVÁ, Z. (2014): Ústní sdělení

BALOUNOVÁ, Z. (2013): Bochnatka americká – už jste ji potkali? Veronica 27: 49.

BALOUNOVÁ, Z., HAVLÍČKOVÁ, L., MUSIL, M., RAJCHARD, J., ŠINKO, J. (2013): Invaze *Pectinatella magnifica* na Třeboňsku v chráněné krajinné oblasti a biosférické rezervaci (ČR). Abstraktní kniha: 443.

BALOUNOVÁ, Z., PECHOUŠKOVÁ, E., RAJCHARD, J., JOZA, V., and ŠINKO, J. (2011): World-wide distribution of the Bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851) European Journal of Environmental Sciences, Vol. 3, No. 2, pp. 96–100

BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J., ŠMAHEL, L. ŠVEHLA, J. (2006): *Pectinatella magnifica* - invazní druh mechovky v jihočeské krajině. In: Měkotová, J., Štěrba, O. (2006): Říční krajina 4:8-12, sborník z konference. Univerzita Palackého, Olomouc.

BALOUNOVÁ, Z., ŠMAHEL, L. a RAJCHARD, J. (2007): Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová J., Štěrba O. (Eds.), 2006: Říční krajina 4. Sborník příspěvků z konference, 18.10.2006, Olomouc. ISBN 80-244-1495-3

BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J., ŠMAHEL, L. (2009): Výskyt mechovky *Pectinatella magnifica* na Třeboňsku. Nепublikováno.

BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J., ŠVEHLA, J., ŠMAHEL, L. (2011): The onset of invasion *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic).

Biologia, č. 66, s. 1091-1096.

BAŠTINEC, J. (2009): Statistika, operační výzkum, stochastické procesy. Skripta FEKT VUT v Brně.

BERGER, J. (2000): Biologie buněk. KOPP nakladatelství, České Budějovice. 94-100, 113 s.

BŘEZINA, V. (2014): Písemné sdělení.

DVOŘÁKOVÁ, K. (2009): Slizká bochnatka americká okupuje české rybníky. Dostupné na http://hobby.idnes.cz/slizka-bochnatka-americka-okupuje-ceske-rybniky-fuk-/rybareni.aspx?c=A090821_150733_rybareni_bma. Staženo 17.6.2013.

ČERNÝ, M. (2003): Moře: lékárna budoucnosti. 21.století. [online]. 2003, [cit. 2011-02-22]. Dostupné z <http://www.21stoleti.cz/view.php?cislocianku=2003052021>.

ČINÁTL, J., NOVÁK, M. (1968): Tkáňové a buněčné kultury, příprava a pěstování. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha. 16-18, 19-27

ČRo LEONARDO (2010a): „Tukové lešení“ pro buněčnou kulturu. Dostupné na http://www.rozhlas.cz/leonardo/zpravy/_zprava/712559. Staženo 12.2.2014.

ČRo LEONARDO (2010b): Buněčné kultury rostou a levitují. Dostupné na http://www.rozhlas.cz/leonardo/zpravy/_zprava/708279. Staženo 12.2.2014.

FUSEK, M., KÁŠ, J., RUML, T. (2008): Bioléčiva. 1 st ed. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-678-4.

KNOZ, J. (1952): Příspěvek k poznání variability statoblastů mechovky *Pectinatella magnifica* Leidy (Phylactolaemata, Cristatellidae). Brno. 80.

KOČÁREK, E., PÁNEK, M. a NOVOTNÁ, D. (2006): Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. Karolinum, Praha. 120 s.

KOLLÁR, P., RAJCHARD, J., BALOUNOVÁ, Z. a PAZOUREK, J. (2013): Marine natural products: Bryostatins in preclinical and clinical studies. *Pharmaceutical biology* 52(2): **237-242**

KUČERA, R. (2005): Pinocytóza. Dostupné na <http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/pinocytoza>. Staženo 17.6.2013.

MASSARD, J.A., GEIMER, G. & WILLE, E. (2013): Apparition de *Pectinella magnifica* (Leidy, 1851) (*Bryozoa, Phylactolaemata*) dans le lac de barrage d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg). *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois* 114 : 131-148.

NEČAS, O., BÁRTEK, J., HAŠEK, J., STREIBLOVÁ, E. a VIKLICKÝ, V. (1991): Cytoskelet. Academia, Praha. 250

NEZVALOVÁ, M. (2010): Kde je slizká bochnatka, tam je čistší voda. Dostupné na http://zpravy.idnes.cz/kde-je-slizka-bochnatka-tam-je-cistsi-voda-flk-/zahranicni.aspx?c=A100617_1403581_vedatech_itu. Staženo 17.6.2014.

OPRAVILOVÁ, V. (2005): O výskytu dvou druhů bezobratlých zavlečených do ČR: *Dusegia trigrina* (*Tricladida*) a *Pectinatella magnifica* (*Bryozoa*). Sborník Přír. klubu v Brně, 2001-2005: 39-50.

PARK, J.H., KIM, S.J., Oh, E.J. a MOON, S.Y., ROH, S.I., KIM, C.G., YOON, H.S. (2003): Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, and permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* 69: 2007-2014.

PŮŽA, V. (1976): Mikrokinematografické sledování adheze a dilatace buněk pěstovaných in vitro. Sborník věd. prací LF, Hradec Králové, 19, 737-744, 1976

PŮŽA, V. (1990): Období 1965-1990. Dostupné na www.biologie-lfhk.cz/soubory/puvodni/getimgc3c9.doc?id=8. Staženo 28.2.2014.

SEDLÁK, E. (2000): Zoologie bezobratlých. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 118

SKUHROVEC, T. (2011): Monitoring invazivního druhu mechovky *Pectinatella magnifica*

(*Bryozoa*) ve vybraných lokalitách Třeboňska. (Absolventská práce). 13-16, 27

ŠETLÍKOVÁ, I., BALOUNOVÁ, Z., LUKAVSKÝ, J., RAJCHARD, J. (2005):
Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. *Živa*, LIII, 4:172-174

ŠINKO, J. (2010): Nový obyvatel naší přírody Bochnatka americká. Dostupné na
<http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1210>. Staženo 10.2.2014.

ŠINKO, J., MUSIL, M., BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J., NAVRÁTIL, J.
(2013): Ekologické podmínky výskytu invazního druhu. Zatopená štěrkořískovna
jako brána invaze *Pectinatella magnifica* do Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko.
České Budějovice. 6

ŠINKO, J., RAJCHARD, J., BALOUNOVÁ, Z., FIKOTOVÁ, L. (2012):
Biologically active substances from water invertebrates. *Veterinarni Medicina*, 57,
2012 (4): 00

ŠINKO, J., MUSIL, M., BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J. a NAVRÁTIL, J.
(2013): Zatopená štěrkořískovna jako brána invaze *Pectinatella magnifica* do
Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko. Ekologické podmínky výskytu invazního
druhu.

REISCHIG, J. (1988): Genetická praktika. Státní pedagogické nakladatelství.
Univerzita Karlova v Praze. 6-18

RICHARDS, M., FONG, C.Y., CHAN, W.K, WONG, P.C. a BONGSO, A.
(2002): Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner
cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20: 933-936.

WILCOX, A. W. (1906): Locomotion in young colonies of *Pectinatella magnifica*.
Brown University. Anatomical laboratory. Vol. XI.

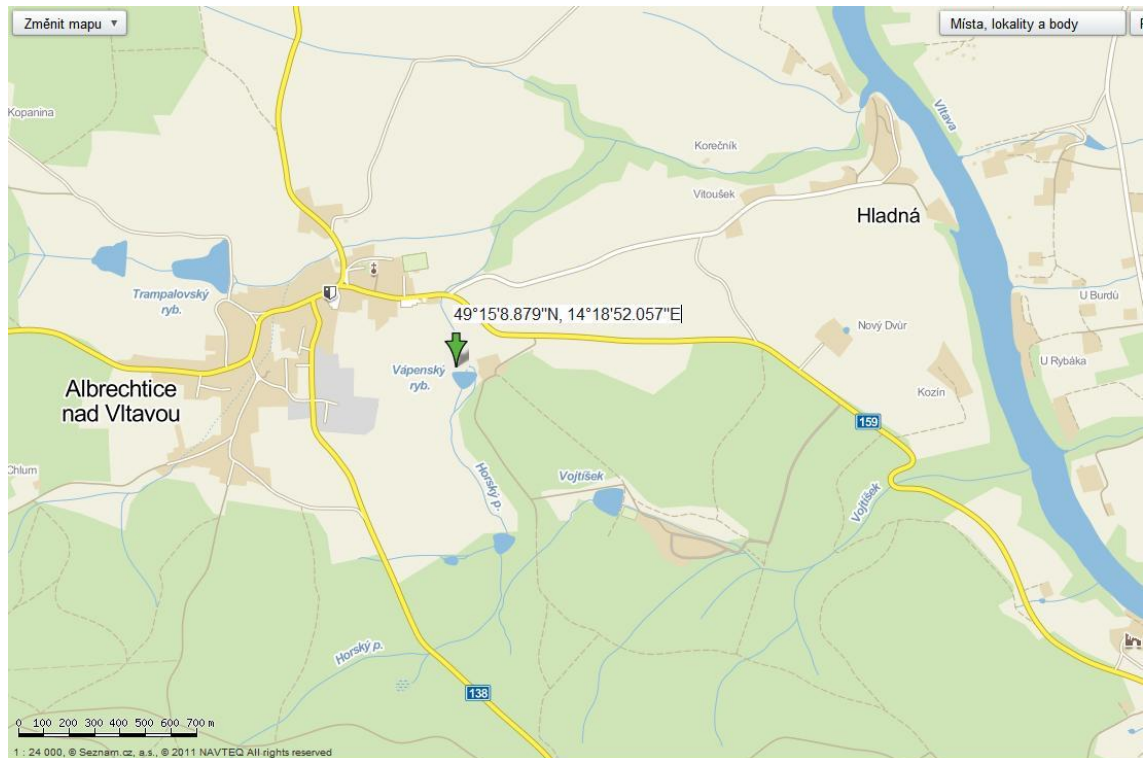
ZÁVODSKÁ, R. (2006): Biologie buněk. SCIENTIA, spol. s.r.o., Praha. 160

9. Přílohy

Příloha 1: Mapy zkoumaných lokalit

Zdroj: <http://www.mapy.cz>

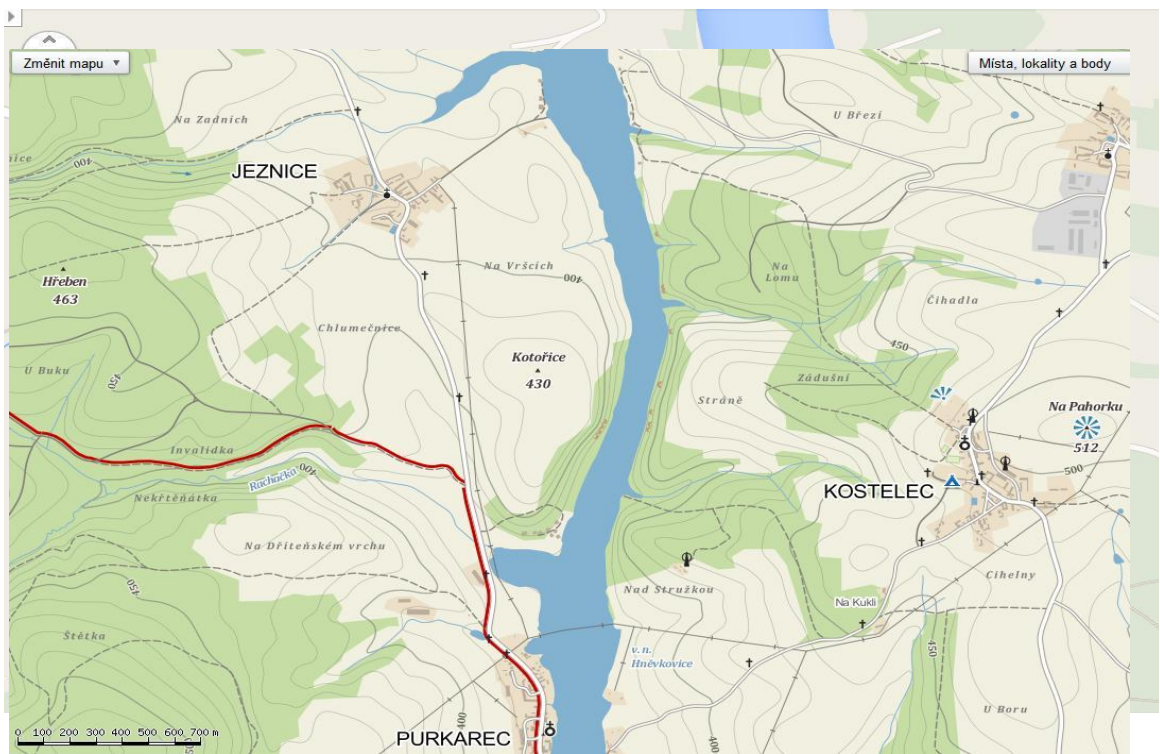
Mapa č. 1 - Hněvkovice



Mapa č. 2 – Hněvkovice, Kanadské sruby

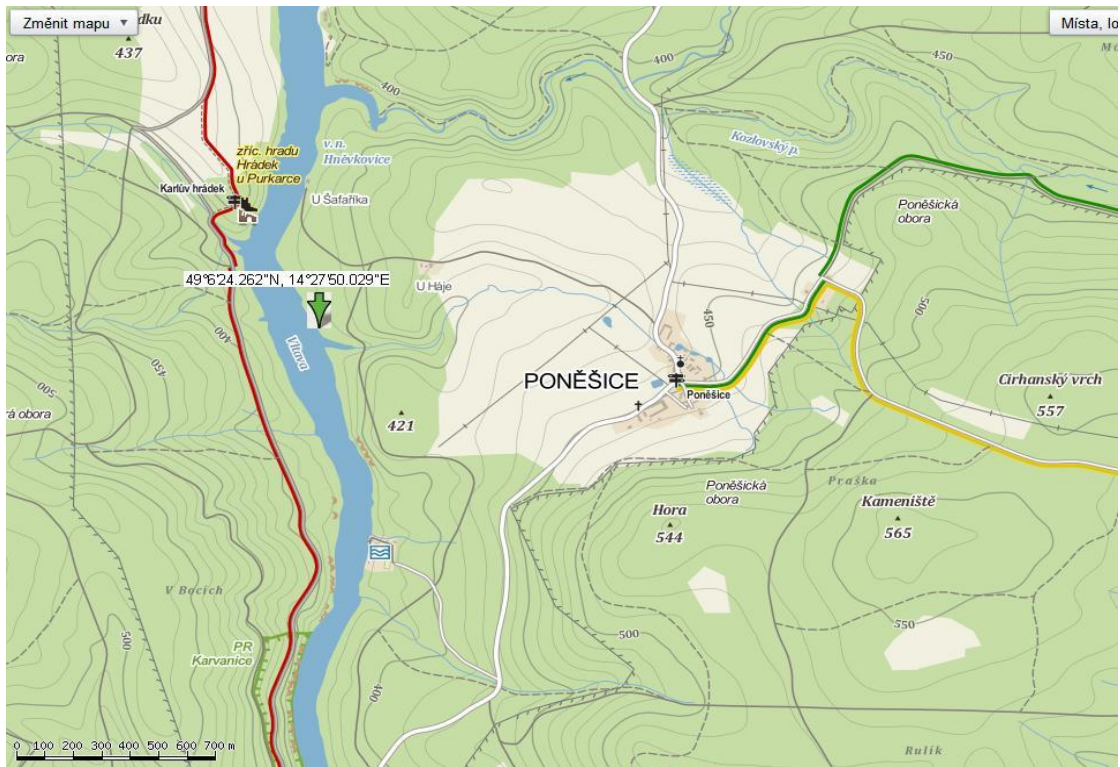


Mapa č. 3 - Hněvkovice, Jeznice

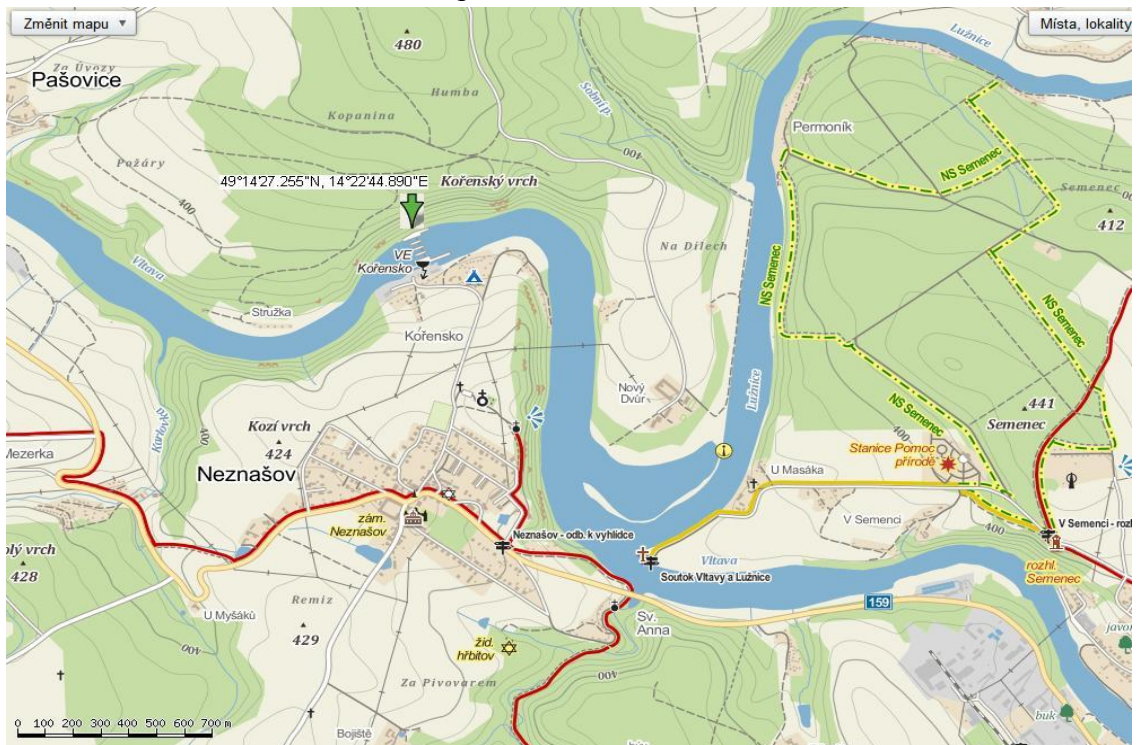


Mapa č. 4 - Purkarec

Mapa č. 5 - Poněšice



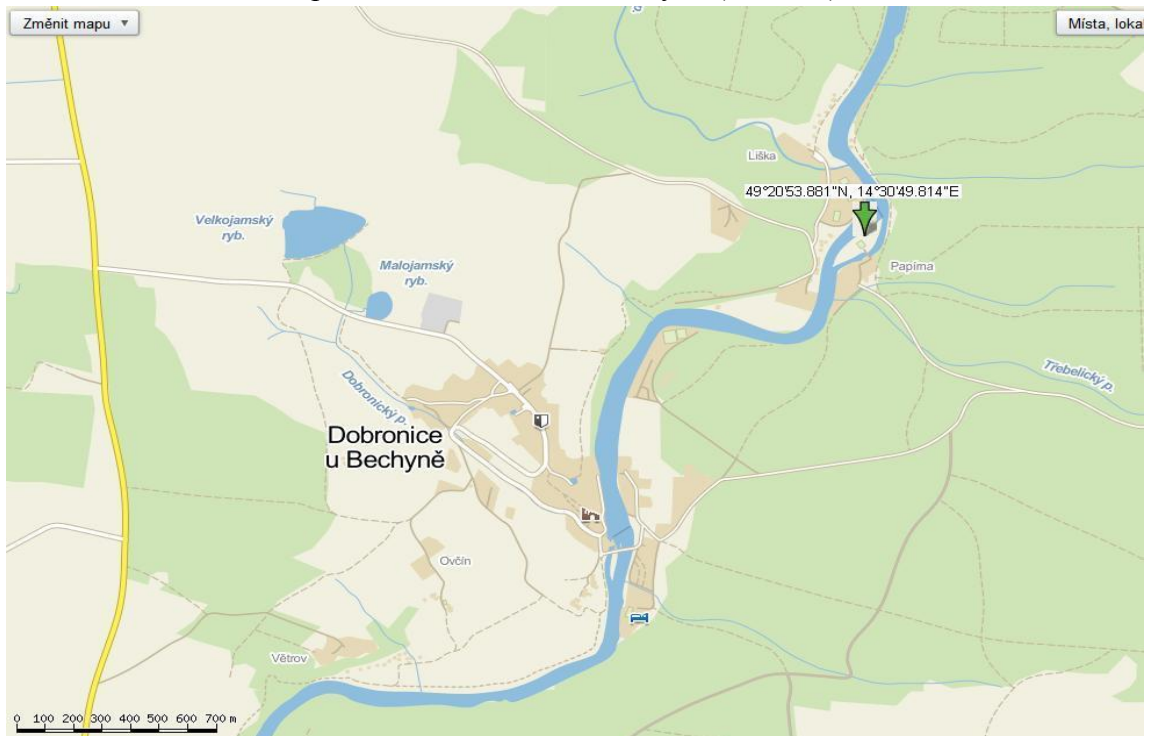
Mapa č. 6 - Kořensko



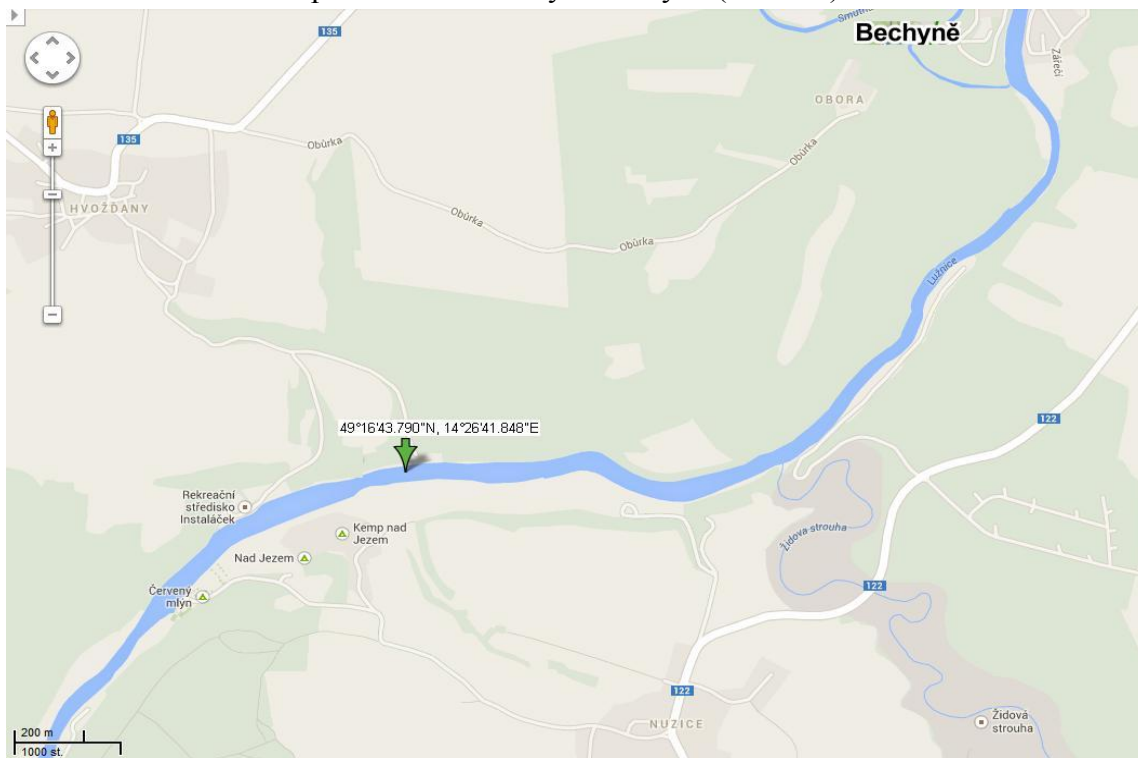
Mapa č. 7 – Bechyně (Lužnice)



Mapa č. 8 – Dobronice u Bechyně (Lužnice)



Mapa č. 9 – Hvožd'any u Bechyně (Lužnice)



Mapa č. 10 – Sezimovo Ústí – Tábor (Lužnice)



Mapa č. 11 – sledované lokality v roce 2012 a 2013



Příloha 2: Obrázky a fotodokumentace zkoumaných lokalit

Obrázky ze zdroje: <http://www.mapy.cz>

Fotodokumentace: (ŠUSTEROVÁ, 2013)

Obr. č. 1 Rekreační středisko AMU



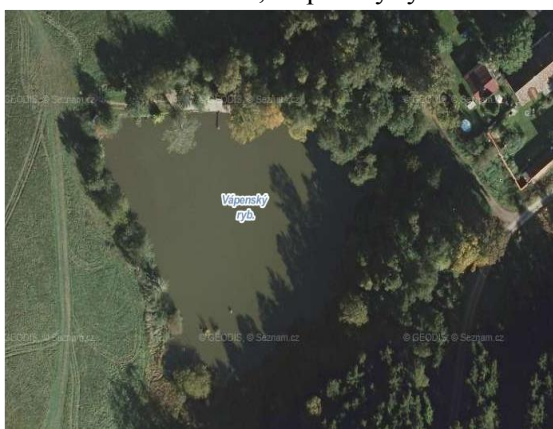
Obr. č. 2 Hněvkovický jez



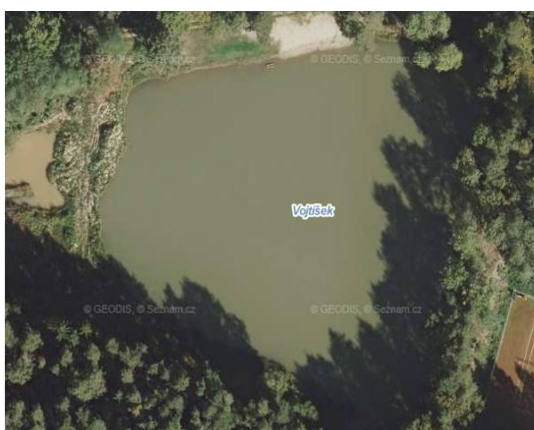
Obr. č. 3 Hněvkovická hráz



Obr. č. 4 Albrechtice, Vápenský rybník



Obr. č. 5 Albrechtice, rybník Vojtíšek



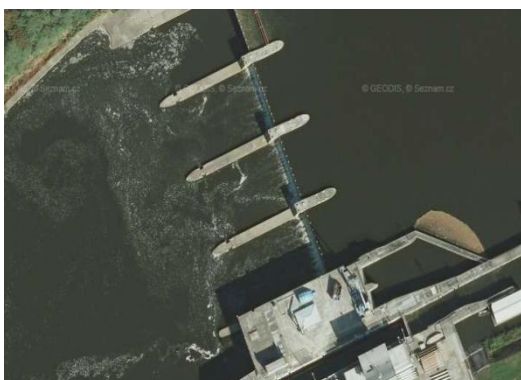
Obr. č. 6 Bechyně



Obr. č. 7 Dobronice u Bechyně



Obr. č. 8 Kořensko



(RAJCHARD, 2013)

Příloha 3: Fotodokumentace z laboratoře biologických technologií v Nových Hradech

(ŠUSTEROVÁ, 2013)

Foto č. 1 Vybavená laboratoř



Foto č. 2 HERASAFE - kabinet biologické bezpečnosti
v laboratoři tkáňových kultur



Foto č. 3 BBD 6220 CO₂ Incubator - teplotní vědecký CO₂ inkubátor (termostat), aktivní zvlhčování kontroly a integrální vysoké teploty sterilizačního cyklu



Foto č. 4 Nikon BioStation 21 - kompaktní buněčný inkubátor, snímá živé buňky





Foto č. 5 Mikroskop se záznamovým zařízením

