

Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Vitelocyty karyofylidních tasemnic



Bakalářská práce

Petra Drobníková

Vedoucí práce: RNDr. Magdaléna Bruňanská, CSc.

2007

Bakalářská práce

Petra Drobníková 2007: Vitelocyty karyofylidních tasemnic. Bakalářská práce [Vitellocytes caryophyllidean cestod. Bc. Thesis, in Czech] – University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Vitellogenesis in caryophyllidean cestode *Atractolytocestus huronensis*, parasitizing cyprinid fish *Cyprinus carpio* was examined using light (LM) and transmission electron microscopy (TEM). Vitelline follicles contain vitelline cells at various stages of development: immature, maturing and mature cells. Maturing and mature vitellocytes contain vitelline material in the form of single small shell globules that gradually fuse and give rise to the large shell globule clusters. Glycogen is present in the cytoplasm and in the nucleus of the mature vitellocytes.

Tato práce byla financována z grantu 560/8561 (PaÚ, P.I.: M. Bruňanská)

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích, 30.4.2007

.....

Petra Drobníková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem lidem, kteří mi pomohli s vypracováním této práce. Především své školitelce RNDr. Magdaléně Bruňanské CSc. za rady a trpělivost v průběhu celé mé práce a za čas, který mi věnovala. Dále děkuji Ing. Blance Škoríkové za pomoc při úpravě obrázků v programech Photoshop a CorelDraw.

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED | 1 |
| 1.1 | TŘÍDA: CESTODA | 1 |
| 1.2 | ŘÁD: CARYOPHYLLIDEA | 2 |
| 1.3 | VITELOGENEZE U TASEMNIC..... | 3 |
| 1.3.1 | <i>Nezralé vitelocyty</i> | <i>4</i> |
| 1.3.2 | <i>Zrající vitelocyty.....</i> | <i>4</i> |
| 1.3.3 | <i>Zralé vitelocyty.....</i> | <i>5</i> |
| 1.4 | POROVNÁNÍ ZRALÝCH VITELOCYTŮ TASEMNIC | 7 |
| 1.4.1 | <i>Vitelinní materiál.....</i> | <i>7</i> |
| 1.4.2 | <i>Glykogen (α a/nebo β forma)</i> | <i>8</i> |
| 1.4.3 | <i>Lipidy (nasycené a nenasycené).....</i> | <i>8</i> |
| 2 | CÍLE PRÁCE | 9 |
| 3 | MATERIÁL A METODY | 10 |
| 3.1 | MATERIÁL..... | 10 |
| 3.2 | METODY..... | 10 |
| 3.2.1 | <i>Příprava materiálu pro světelný a transmisní elektronový mikroskop</i> | <i>10</i> |
| 3.2.2 | <i>Příprava a barvení polotenkých řezů</i> | <i>10</i> |
| 3.2.3 | <i>Příprava a kontrastování ultratenkých řezů.....</i> | <i>11</i> |
| 4 | VÝSLEDKY..... | 12 |
| 4.1 | NEZRALÉ VITELOCYTY | 12 |
| 4.2 | ZRAJÍCÍ VITELOCYTY | 12 |
| 4.3 | ZRALÉ VITELOCYTY | 13 |
| 5 | DISKUZE..... | 19 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 22 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATURA | 23 |
| | PŘÍLOHY | 26 |

1 Úvod a literární přehled

Tasemnice (Cestoda) se řadí do kmene Plathelminthes. Jejich charakteristickým znakem je absence střeva, struktura povrchu těla – tegument a parazitický způsob života. Jsou to výhradně endoparazité trávicího ústrojí obratlovců, zejména ryb, ale i plazů, ptáků a savců. Zástupci pouze dvou řádů – Pseudophyllidea a Cyclophyllidea parazitují také u člověka (Caira a Littlewood 2001).

Kromě rodu *Archigetes* mají všechny tasemnice nepřímý vývojový cyklus ve kterém dochází ke střídání hostitelů. V definitivním hostiteli tasemnice dokončuje svůj vývojový cyklus a pohlavně dospívá. Hostitelé se nakazí požitím vajíčka, larvy nebo onkosféry (Horák a Scholz 1998).

1.1 Třída: Cestoda

Většina systémů rozděluje tasemnice na skupiny Cestodaria - s monozoickými řády Amphilinidea a Gyrocotylidea, a Eucestoda („pravé tasemnice“), zahrnující většinu tasemnic (Horák a Scholz 1998).

Podtřídu Eucestoda tvoří řád Caryophyllidea s monozoickými zástupci a 11 řádů polyzoických tasemnic.

Tělo polyzoických tasemnic se skládá ze skolexu s přichycovacími orgány a řady jednotlivých článků (proglotid), které tvoří strobilu (Caira a Littlewood 2001). Povrch těla pokrývá neodermis, která zároveň nahrazuje funkci trávicí soustavy tím, že umožňuje vstřebávání živin.

Na povrchu neodermis se navíc nachází mikrotrichy, které zvětšují absorbní plochu tegumentu a zvyšují přichycovací schopnost parazita (Jíra 1998).

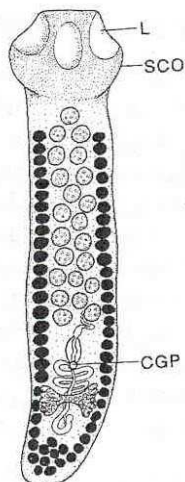
Každý proglotid obsahuje jeden, někdy i dva komplexy samčích a samičích pohlavních orgánů (Horák a Scholz 1998).

Samčí pohlavní soustava je tvořena především různým počtem varlat, která vyplňují větší část vnitřního prostoru článku. Samičí pohlavní soustavu tvoří vaječník, děloha, vitelária.

Samičí rozmnožovací soustava je heterocelulární, protože se skládá ze dvou oddělených orgánů, ovária a vitelária, produkujících ektolecitální vajíčka a vitelinní buňky (Caira a Littlewood 2001).

Vitelária jsou složena z mnoha vitelinních folikulů, které na každé straně proglotidu utváří dva postranní laterální pásy. Vitelária vytváří žlutkový materiál, který se podílí na tvorbě vaječného obalu, formování vajíčka a vývoji embrya.

1.2 Řád: Caryophyllidea



Tasemnice řádu Caryophyllidea jsou monozoické - tělo není segmentované a obsahuje pouze jeden komplex pohlavních orgánů (Caira a Littlewood 2001).

Vývojový cyklus začíná vždy ve vodním kroužkovci, nejčastěji z čeledi Naididea a Tubificidea (Mackiewicz 1981). Dospělci parazitují ve střevě sladkovodních, benticky se živících ryb řádu Siluriformes a Cypriniformes. Vyjimku tvoří tasemnice rodu *Archigetes*, která je schopna dokončit svůj vývojový cyklus v kroužkovci a nepotřebuje dalšího hostitele.

Obr. I: Caryophyllidea – dospělý jedinec *Paraglaridacris*. CGP – pohlavní otvor, SCO - skolex (Caira a Littlewood 2001)

Postavení řádu Caryophyllidea v rámci Eucestod není dosud jednoznačně určené. Studie, zabývající se fylogenetickým a systematickým postavením řádu jsou primárně založené na morfologických znacích, typu vývojového cyklu a molekulárních analýzách (Mackiewicz 2003). Molekulární analýzy naznačují bazální postavení Caryophyllidea (Mackiewicz 2003).

V pracích Hoberga a kol. (1997), Brookse a kol. (1991) a Olsona a kol. (2001) jsou jednotlivé morfologické znaky karyofylidních tasemnic (stavba těla, typ skolexu, vývoj vajíčka a embryoforu, stavba a pozice dělohy a varlat, uspořádání vitelárií a spermiogeneze) porovnávány k ostatním Eucestodám.

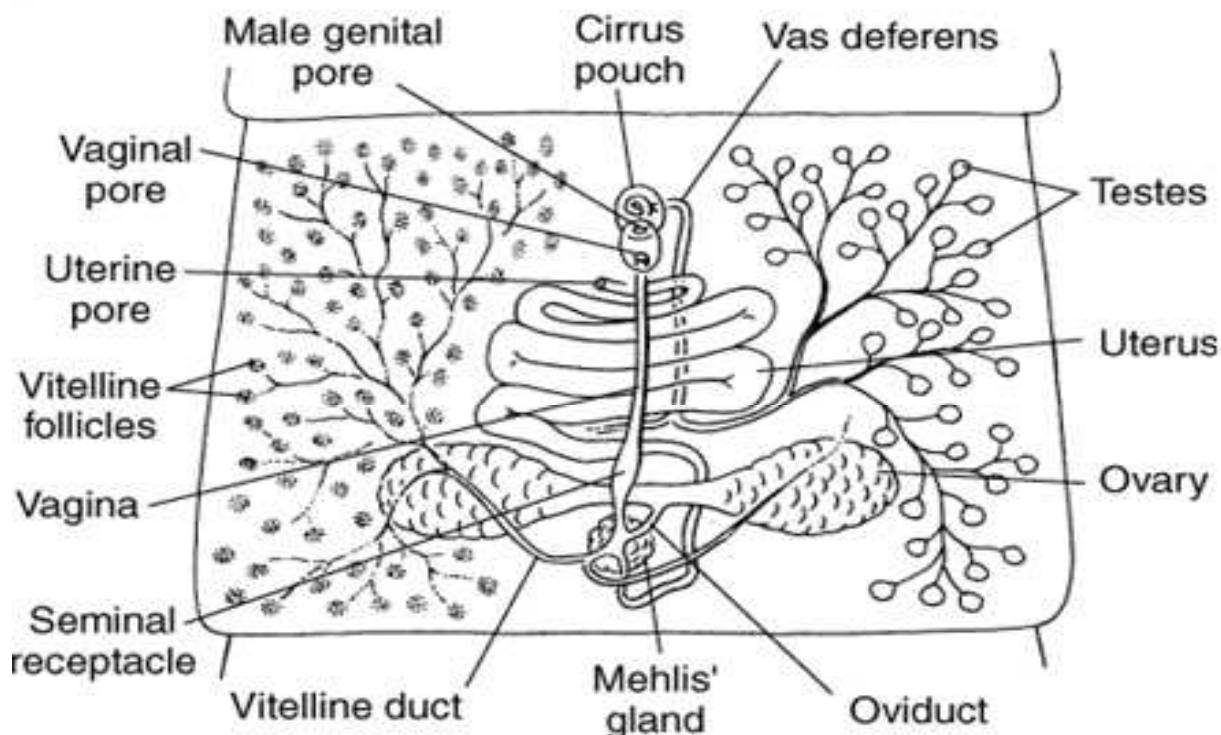
Doposud panují neshody, zda monozoickost karyofylidních tasemnic je primární nebo sekundární stav a tedy zda jsou Caryophyllidea předky ostatních Eucestod nebo zda se vyvinuly z polyzoického předchůdce tasemnic (Swiderski a kol. 2004).

Výsledky kladogramu založeného na morfologii závisí na přesném zaznamenání znaků do matice a jsou negativně ovlivněny nedostatečným množstvím dat a nejednotnou terminologií. Z toho vyplývá potřeba dalších studií ultrastruktury Eucestod a zpracování jednotné terminologie (Mackiewicz 2003).

Atractolytocestus huronensis (Anthony, 1958)

Dospělí jedinci tohoto druhu tasemnice dosahují délky 0,7 – 1,5cm. Parazitují ve střevě kaprovitých ryb, kde jsou trvale přichyceni ke střešní stěně pomocí svalnatého skolexu.

1.3 Vitelogeneze u tasemnic



Obr. II: Pohlavní soustava

(<http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/nayduch/parasitwebpage/cestodes-intro.doc>)

Vitelinní systém tasemnic se skládá z vitelárií a viteloduktů. Vitelária většiny tasemnic (výjimka Cyclophyllidea), jsou uspořádána ve formě četných oddělených folikulů. Jsou umístěna ve dvou laterálních pásech v kortikálním (Amphilinidea, Pseudophyllidea) nebo medulárním (Caryophyllidea, Tetracyphyllidea, Proteocephalidea) parenchymu. U řádu Cyclophyllidea jsou vitelária redukována nebo zcela chybí.

Uspořádání vitelinních žláz a viteloduktů se může mezi jednotlivými řády lišit. U řádu Caryophyllidea malé kanálky spojují jednotlivé folikuly a vytváří dva velké laterální kanály. Ty ústí do příčného kanálu, který se rozšiřuje ve vitelinní rezervoár. Vitelodukt začíná ve vitelinním rezervoáru a spojuje vitelinní systém žláz s oviduktem (Mackiewicz 1972).

Jednotlivé folikuly jsou ohraničeny vnější bazální membránou a jsou tvořeny vitelinními buňkami (vitelocyty) v různých stádiích vývoje. U většiny druhů se nezralé vitelocyty nalézají

především v periférii folikulu a vývojově pokročilejší stádia v blízkosti jeho středu. Ve viteláriu jsou navíc přítomny další dva typy buněk – kmenové a intersticiální buňky (Mackiewicz a Swiderski 1976).

Vitelocyty mají dvě důležité funkce v embryogenezi tasemnic:

- podílí se na utváření pevného vaječného obalu (Gyrocotyloidea, Amphilinidea, Pseudophyllidea, Trypanorhyncha a Caryophyllidea) nebo jemné tenké kapsule (Tetraphyllidea, Proteocephalidea, Cyclophyllidea)
- poskytují zásobní látky pro vyvíjející se embryo (u všech tasemnic)

Každá z těchto dvou funkcí může být redukována nebo zesílena u různých skupin tasemnic v závislosti na typu jejich embryonálního vývoje, stupni ovoviviparity, typu larvy a životním cyklu.

U cyklofyliidních tasemnic se vajíčka vyvíjí v děloze a mateřský organizmus jim poskytuje ochranu a výživu, proto se kolem vyvíjejícího se embrya vytváří pouze tenká křehká kapsule a výživná funkce vitelocytu je redukována.

U pseudofyliidních tasemnic dokončuje vajíčko svůj vývoj až ve vnějším prostředí, a proto potřebuje pevný ochranný obal a vnitřní zásoby živin.

Vitelogeneze je souvislý proces se třemi odlišnými stádii vývoje vitelocytů – nezralé, zrající a zralé buňky.

1.3.1 Nezralé vitelocyty

Představují nediferencované buňky, které jsou prekurzory zralých vitelocytů. Mají velké jádro s nápadným homogenním jadérkem a nepravidelnými shluky kondenzovaného chromatinu, rozptýleného v nukleoplazmě.

Vykazují vysoký nukleo-cytoplazmatický poměr a velkou koncentraci volných ribozomů. Cytoplazma obsahuje několik malých mitochondrií, které mají densní matrix a pár krist. Ojediněle se zde může vyskytovat rozptýlené endoplazmatické retikulum (ER) a Golgiho aparát (GA), sestávající pouze z několika zploštělých váčků.

1.3.2 Zrající vitelocyty

Tato fáze zrání je charakteristická zvětšením buněčné velikosti, jadernou transformací a postupným vývojem buněčných organel.

Objevují se buněčné inkluze – tukové kapénky a kapénky obalového materiálu (shell-globule) a začíná postupné formování a ukládání glykogenu v cytoplazmě.

Při jaderné transformaci dochází ke zvětšení jaderného povrchu vytvářením četných vchlípenin jaderné membrány. Malé shluky kondenzovaného chromatinu jsou roztroušené v periferní oblasti jádra a často přiléhají k jaderné membráně.

U mnoha druhů tasemnic je jaderná transformace doprovázena transformací jádérka. Během ní se jádérko stává heterogenním.

V této fázi se zvyšuje počet a velikost GA a vyvíjí se spojení s tubulárními elementy ER, které se stává dominantní složkou cytoplazmy. V blízkosti ER se často nalézají mitochondrie, které mají oproti mitochondriím v nezralých vitelocytech méně hustou matrix a zřetelné krystaly.

Golgiho aparát se skládá z protáhlých váčků různé velikosti. Některé váčky se mění na sekreční zrna, obsahující prekurzory kapének obalového materiálu. Spojováním jednotlivých kapének vznikají shluky obalového materiálu, označované jako „shell-globule cluster“.

Tvorba „shell-globule cluster“ je charakteristická pro vitelocyty monozoických cestod-Amphilinidea, Gyrocotylidea a Caryophyllidea, a dvou řádů polyzoických – Pseudophyllidea a Trypanorhyncha. Kapénky vitelinního materiálu jsou heterogenní u řádu Proteocephalidea a homogenní u řádu Cyclophyllidea.

Po vytvoření obalového a vitelinního proteinu následuje syntéza a ukládání glykogenu a hromadění lipidů.

V první fázi glykogeneze stoupá počet β glykogenových částic, které jsou postupně částečně nahrazovány rozety α glykogenu.

1.3.3 Zralé vitelocyty

Plně diferencované vitelocyty tasemnic představují holokrinní typ sekrece, kdy je celá buňka vyloučena do viteloduktu i se všemi svými sekrečními produkty, které se vytvořily a uložily v její cytoplazmě.

Jádro zralých vitelocytů má rozptýlený heterochromatin. Zploštělé jádérko a nukleoplazma jsou vytlačeny do periferních oblastí přiléhajících k jaderné membráně. Pokud je přítomno ER je redukováno ve velikosti a omezeno na perinukleární oblast nebo buněčnou periférii.

Cytoplazma obsahuje velké množství tukových kapének, glykogenu a vitelinního materiálu.

Zralé vitelocyty opouští vitelinní folikuly a putují vitelinním kanálkem k ootypu, kde se podílí na formování vajíčka a jeho obalu.

U řádu Caryophyllidea dochází k syntéze a ukládání glykogenu i v jádře a vzniku tzv. „jaderné vakuoly“. Glykogen se v jádře nejdříve objevuje ve formě β částic nepravidelného tvaru. V některých oblastech jsou volně roztroušené v nukleoplazmě, zatímco v jiných se seskupují a vytváří rozety α částic, které dohromady tvoří „glykogenové ostrůvky“. Velikost a počet jaderných „glykogenových ostrůvků“ se postupně zvětšuje v průběhu vitelogeneze.

Nukleoplazma uvnitř „glykogenových ostrůvků“ se rozpadá a dochází ke splývání jednotlivých glykogenových oblastí dohromady. Glykogen v jádře zralého vitelocyty zabírá více jak polovinu jaderného objemu a vytlačuje zploštělé jádérko a chromatin k jaderné periférii. (Mackiewicz 1972, Swiderski a Mackiewicz 1976).

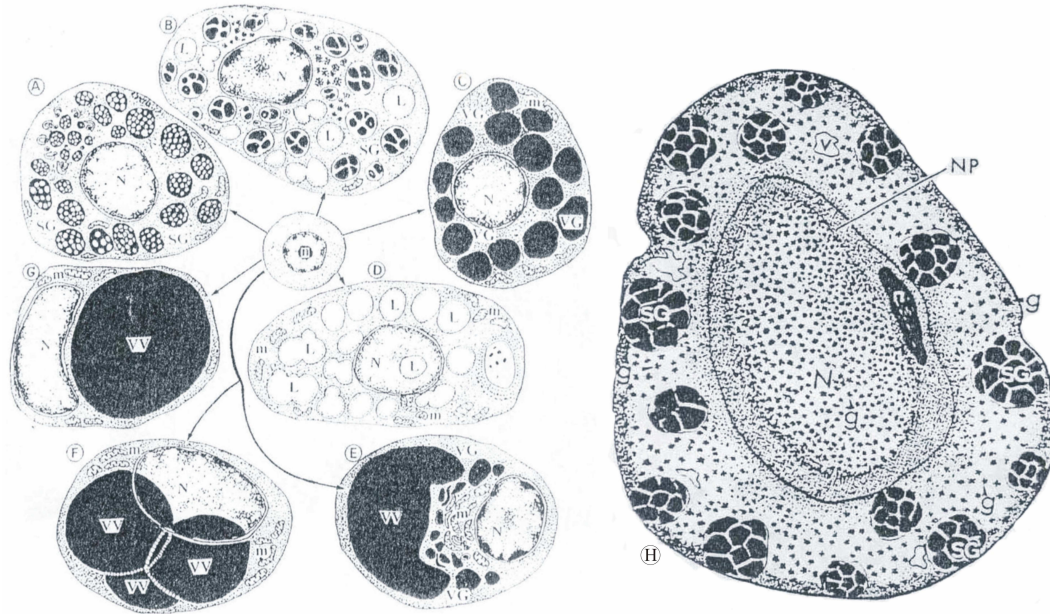
U řádu Tetracyllidea a Spathebothriidae se v jádře hromadí lipidy (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1976; Bruňanská a kol. 2005).

Význam ukládání jaderného glykogenu je, že vajíčka mající v jádře vitelinních buněk nahromaděný glykogen jsou lépe přizpůsobena k přežití v anaerobních podmínkách, po dobu než jsou pozřena mezihostitelem (Mackiewicz 1981). Dalším možným vysvětlením je, že jaderný glykogen představuje dodatečný zdroj energie v embryogenezi vajíček postrádajících žloutek (Swiderski a Mackiewicz 1976).

Ukládání glykogenu v jádře buněk obratlovců a bezobratlých je vzácné a objevuje se v patologických buňkách, např. v lidských jaterních buňkách při cukrovce a v kuřecím a Ehrlichově tumoru (Swiderski a kol. 2004).

1.4 Porovnání zralých vitelocytů tasemnic

Mezi hlavní rozdíly zralých vitelocytů jednotlivých řádů tasemnic patří typ, relativní množství a chemická povaha vitelinního materiálu, glykogenu a lipidů v cytoplazmě.



Obr. III: Zralé vitelocyty jednotlivých řádů tasemnic:

a – Proteocephalidea

b – Pseudophyllidea

c – Cyclophyllidea, Hymenolepididae

d – Tetracyphyllidea, Phyllobothriidae

e – Cyclophyllidea, Nematotaeniidae

f – Cyclophyllidea, Catenotaeniidae

g – Cyclophyllidae, Anoplocephalidae

h – Caryophyllidea

L – tukové kapénky, m – mitochondrie, N – jádro, SG – obalové kapénky (shell-globule), VG – vitelinní granule, VV – vitelinní váčky

(Swiderski a Xylander 2000), (Swiderski a Mackiewicz 1976)

1.4.1 Vitelinní materiál

Vitelinní materiál se může vyskytovat v několika formách a vytváří buď:

- četné shluky obalových kapének uzavřených v membráně, u řádů Gyrocotylidea, Amphilinidea (Xylander 1988), Caryophyllidea (Swiderski a Mackiewicz 1976), Pseudophyllidea (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1974) a Trypanorhyncha (Swiderski 2006).
- velké množství obalových kapének heterogenního typu u řádu Proteocephalidea (Swiderski a Eklun-Natey 1978, Bruňanská 1997)
- několik velkých obalových kapének homogenního typu
- tři velké vitelinní váčky
- jeden velký vitelinní váček

1.4.2 Glykogen (α a/nebo β forma)

V cytoplazmě vitelocytu se glykogen nejprve objevuje ve formě β částic nepravidelného tvaru.

U jednotlivých taxonomických skupin tasemnic se liší množství a typ glykogenu (α nebo β forma).

Karyofylidní tasemnice mají α i β formu glykogenu. V některých oblastech jejich cytoplazmy a nukleoplazmy je glykogen rozptýlený, zatímco v jiných vytváří shluky větší velikosti označované jako α částice nebo rozety, které se podílí na tvorbě „glykogenových ostrůvků“. Velikost a počet „glykogenových ostrůvků“ se během zrání vitelocytu postupně zvětšuje a uvnitř začínají převládat rozety.

Zvětšováním množství glykogenu v jádře Caryophyllidea dochází k vytlačování zploštělého jádérka a chromatinu k jaderné periférii (Swiderski a Mackiewicz 1976).

U řádu Proteocephalidea je střední množství glykogenu tvořeno pouze β částicemi (Swiderski a Ekl-Natey 1978).

Velmi malé množství glykogenu bylo nalezeno v cytoplazmě vitelocytů u Tetrphyllidea (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1976).

1.4.3 Lipidy (nasycené a nenasycené)

Největší množství lipidů bylo objeveno u Tetrphyllidea, u kterých se tukové kapénky hromadí nejen v cytoplazmě, ale i v jádře zralých vitelocytů (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1976).

U Gyrocotylidea a Amphilinidea nalezneme v cytoplazmě vitelocytů velké množství tukových kapének, ale téměř žádný glykogen (Xylander 1988).

Vitelinní buňky cyklofylidních tasemnic obecně nemají žádné lipidy (Swiderski a kol. 2000, Swiderski a Xylander 2000).

Malé tukové kapénky mají vysokou elektronovou densitu a obsahují především nenasycené mastné kyseliny. Velké tukové kapénky, které nalezneme ve zralých vitelocytech, jsou složeny z velkého množství nasycených mastných kyselin.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo prozkoumat a popsat průběh vitelogeneze u tasemnice *Atractolytocestus huronensis* (Caryophyllidea: Caryophyllaeidae).

- I. zjistit a popsat lokalizaci vitelinních folikulů pomocí světelné mikroskopie
- II. prostudovat ultrastrukturu vitelocytů pomocí transmisní elektronové mikroskopie

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Tasemnice *Atractolytocestus huronensis* byly získány pitvou ze střeva hostitele *Cyprinus carpio* z řeky Tisy (východní Slovensko – Kamenec) ve spolupráci s M.Orosom, pracovníkem Parazitologického ústavu SAV Košice dne 31.5. 2006 a 22.10.2006.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava materiálu pro světelný a transmisní elektronový mikroskop

Tasemnice byly krájením rozděleny na malé kousky, které byly fixovány 3% roztokem glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru (pH 7,4) 10 hodin. Následovalo propláchnutí ve vypíracím roztoku (0,1M kakodylátový pufr) 3x po 15 minutách. Na postfixaci byl použit 2% roztok oxidu osmičelého v 0,1M kakodylátovém pufru v poměru 1:1, působící po dvě hodiny při pokojové teplotě. Následně byly vzorky propláchnuty v 0,1M kakodylátovém pufru 3x po 15 minutách, odvodněny vzestupnou etanolovou řadou (vzorek prochází řadou roztoků o stoupající koncentraci - 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%) a přesyceny směsí pryskyřice SPURR a etanol (v poměru 1:2, 1:1, 2:1, vždy po jedné hodině) a umístěny do eksikátoru (24 hodin). Na zalévání se použilo silikonových forem s otvory ve tvaru bločku, do kterých se vhodně orientovaly vzorky a infiltrovaly čistou pryskyřicí SPURR. Vše se nechalo po 48 hodin polymerovat při 60°C. Vzorek je správně orientován pokud oblast, kterou chceme připravit pro prohlížení, leží co nejbližší rezné roviny bločku.

3.2.2 Příprava a barvení polotenkých řezů

Bločky vzorku byly krájeny pomocí skleněného nože na ultramikrotomu LKB Bromma 8800. Polotenské řezy na podložních sklíčkách byly umístěny na histologickou plotýnku ohřátou na 70-90°C a barveny toluidinovou modří (1% roztok tetraboritanu sodného a 1% roztok toluidinové modře v poměru 1:1) po dobu 30s. Po opláchnutí destilovanou vodou byly polotenské řezy prohlíženy světelným mikroskopem Olympus CX 41 a foceny pomocí programu QuickPhoto Pro 1.2.

3.2.3 Příprava a kontrastování ultratenkých řezů

Ultratenké řezy byly krájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu LKB Bromma 8800 a sbírány na měděné síťky. Potom následovalo kontrastování ultratenkých řezů uranyl acetátem a citrátem olova.

Nejdříve se kontrastovalo octanem uranylu (viz příloha 1). K tomu se použily Petriho misky s kouskem parafilmu, na který se injekční stříkačkou s jednorázovým filtrem (0.45 μ m) nakapalo kontrastující činidlo. Petriho misky je nutné zabalit do hliníkové fólie, protože v přítomnosti světla vzniká v roztoku hnědá sraženina. Na kapky se pinzetou přiložily síťky a po 20 minutách se opláchly 30% etanolem a osušily přiložením na filtrační papír.

Potom následovalo kontrastování roztokem citrátu olova (viz příloha 2). Protože roztok citrátu olova reaguje se vzdušným CO₂ byly do Petriho misky přidány pecičky NaOH zalitých vodou. Na kapky citrátu olova se opět přiložily síťky a po 20 minutách byly opláchnuty destilovanou vodou a osušeny filtračním papírem.

Ultratenké řezy byly prohlíženy pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80kV. Snímky, zachycující ultrastrukturu vitelinních buněk, byly pořízeny pomocí kamery Mega View (Soft Imaging System) a poté zpracovány v programech Photoshop a CorelDraw 11.

4 Výsledky

Vitelária tasemnice *Atractolytocestus huronensis* jsou umístěna ve dvou laterálních pásech v kortikálním parenchymu (obr.1). Skládají se z mnoha vitelinních folikulů kulatého nebo oválného tvaru a různé velikosti (obr.2, 3).

Každý folikul je obklopen cytoplazmatickým pouzdrem (obr.5) a je složen z vitelinních buněk v různém stádiu zrání – nezralé, zrající a zralé vitelocyty (obr.4).

Nezralé vitelocyty se objevují především na periférii folikulu, zatímco pokročilejší stádia zrání jsou blíže ke středu. Během zrání dochází ke zvětšení buněčného objemu. V cytoplazmě zrajících vitelocytů dochází k rozvoji buněčných organel, mitochondrií, endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, a k tvorbě kapének vitelinního materiálu. V cytoplazmě a jádře zralých vitelocytů se ukládá velké množství glykogenu.

4.1 Nezralé vitelocyty

Nezralé vitelocyty (obr.6) představují nediferencované buňky, které jsou prekurzory zralých vitelocytů. Jsou převážně kulatého až oválného tvaru a v průměru dosahují velikosti 5 μ m. Vykazují vysoký nukleo-cytoplazmatický poměr. Uvnitř vitelocytu se nachází velké jádro (až 4 μ m) s výrazným densním jadérkem a nepravidelnými shluky kondenzovaného chromatinu roztroušenými volně v nukleoplazmě.

V cytoplazmě jsou buněčné organely zastoupeny pouze několika malými mitochondriemi o velikosti 0,4 μ m.

4.2 Zrající vitelocyty

V této fázi dochází ke zvětšení velikosti buňky a rozvoji buněčných organel.

V počátečním stádiu zrajícího vitelocytu (obr.7) dochází k jaderné transformaci, při které se zvětšuje jaderný povrch tvorbou četných vchlípenin jaderné membrány. V jádře jsou shluky kondenzovaného chromatinu roztroušené v periferní oblasti jádra a často přiléhají k jaderné membráně. V cytoplazmě je možno vidět endoplazmatické retikulum a malé množství jednotlivých kapének obalového materiálu.

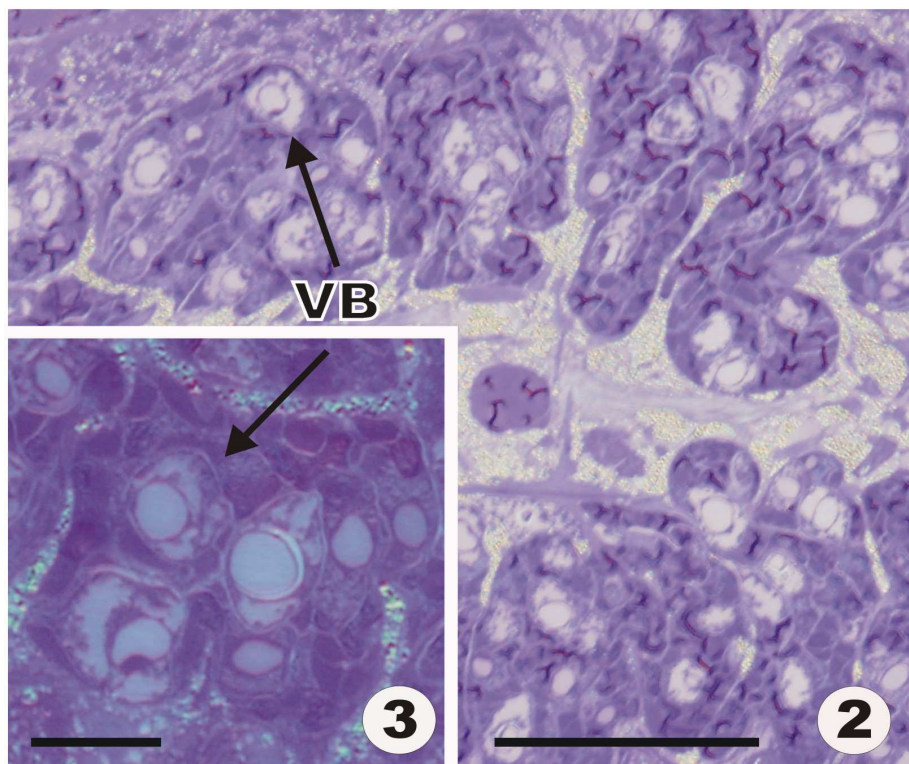
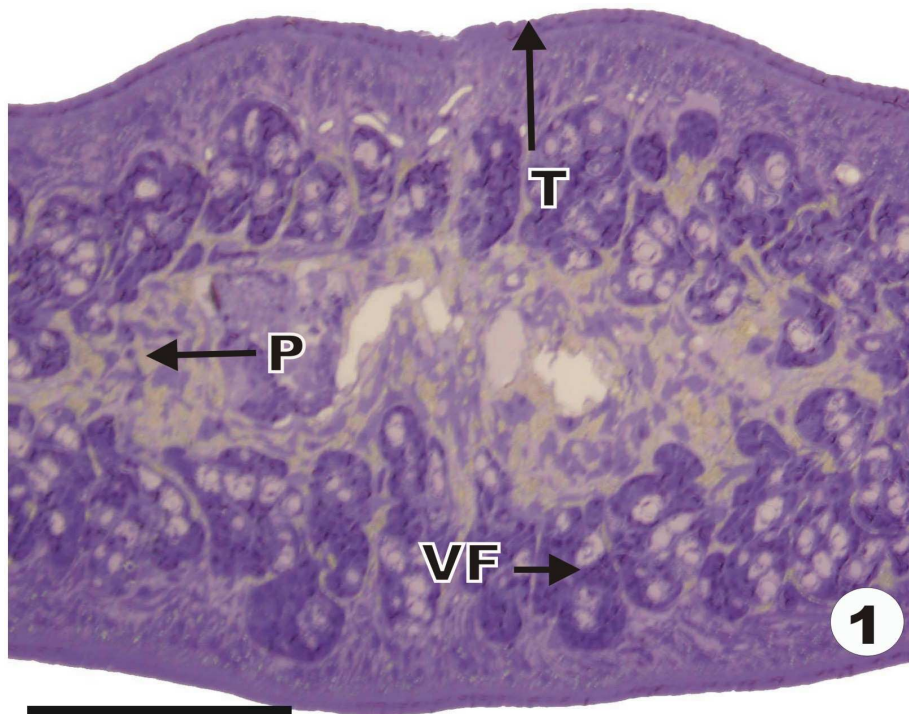
V pokročilejším stádiu zrajícího vitelocytu (obr.8) nastává rychlý nárůst počtu buněčných organel, především Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula, mezi nimiž se utváří vazby potřebné pro tvorbu obalového materiálu. Endoplazmatické retikulum vytváří četné podlouhlé

kanálky, které se postupně stávají hlavní složkou cytoplazmy. Golgiho aparát vytváří sekreční zrna, obsahující prekurzory kapének obalového materiálu. Postupným spojováním jednotlivých kapének (obr. 11) vznikají shluky nazývané „shell globule cluster“ (obr. 12), které představují poslední stádium tvorby obalového materiálu a nachází se především v cytoplazmě zralých vitelocytů.

4.3 Zralé vitelocyty

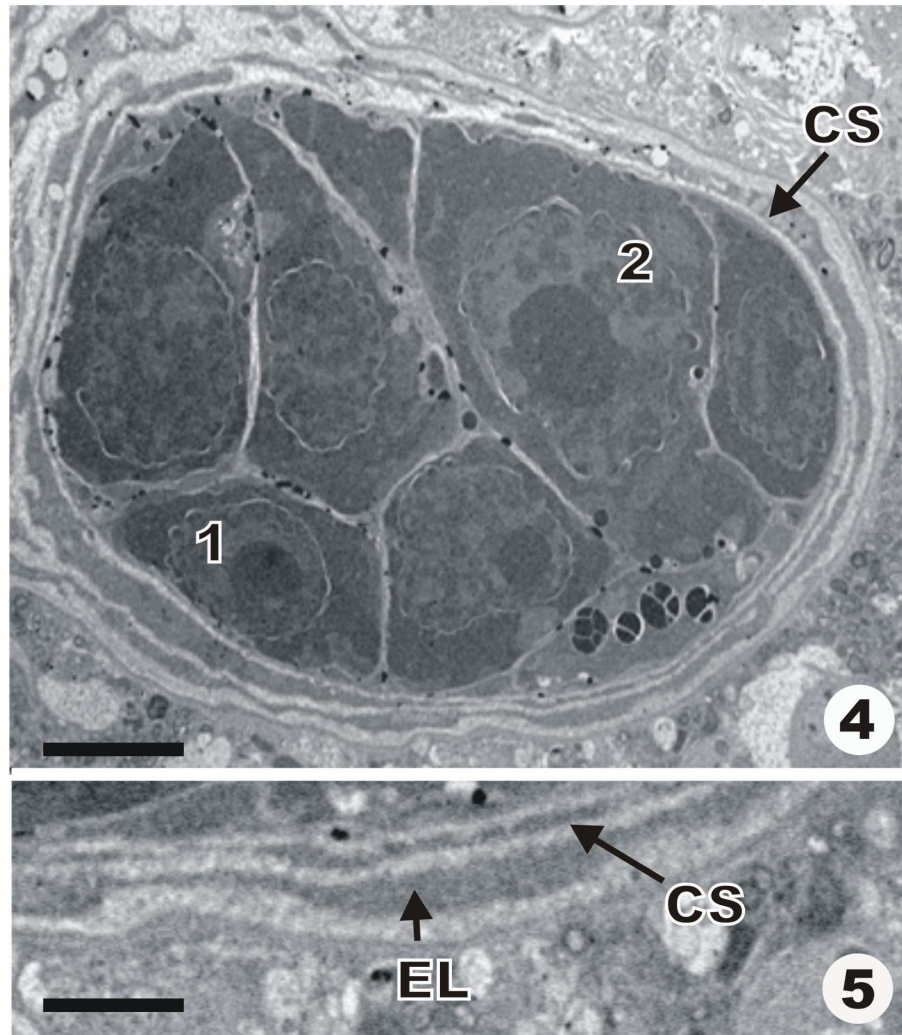
Zralé vitelocyty (obr.9) jsou oválného tvaru a představují plně diferencované vitelocyty. V průměru dosahují velikosti až 18 μ m. Jádru zralých (10 μ m) vitelocytů má rozptýlený heterochromatin a je zcela vyplněno glykogenem, který vytlačuje zploštělé jádérko a nukleoplazmu do periférních oblastí přiléhajících k jaderné membráně.

V cytoplazmě se nachází jak jednotlivé kapénky obalového materiálu (obr.11), tak i shluky „shell globule cluster“ (obr.12), které společně s glykogenem tvoří dominantní složku. Malé množství endoplazmatického retikula je redukováno ve velikosti a koncentrováno na perinukleární oblast nebo buněčnou periférii. Stále dochází k tvorbě jednotlivých kapének obalového materiálu (obr.9). V cytoplazmě se v malém množství vyskytují elektron-lucidní tukové kapénky (obr.9) o velikosti 0,8 μ m. V cytoplazmě některých zralých vitelocytů bylo možno vidět lamelární granule (obr.13), které se především nalézaly v blízkosti endoplazmatického retikula.

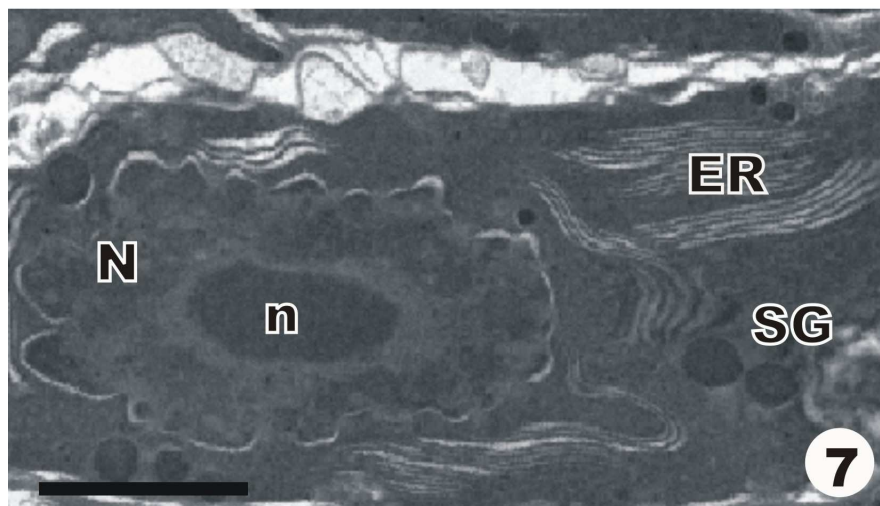
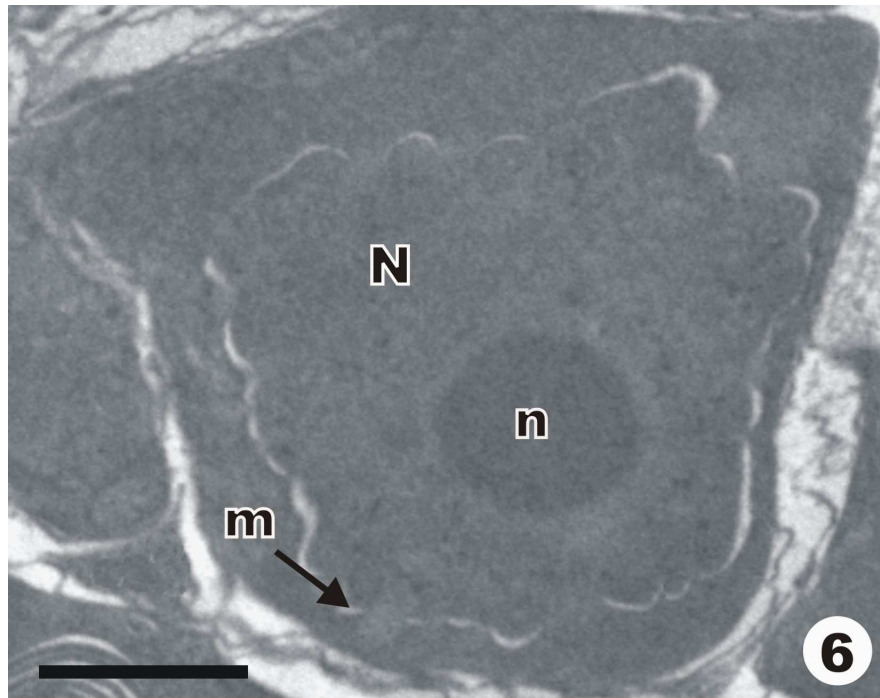


Obr. 1: Podélný řez těla *Atractolytocestus huronensis* zobrazuje umístění vitelinních folikulů (VF) v kortikálním parenchymu (P) ve dvou laterálních pásech. (měřítko: 0,5mm)

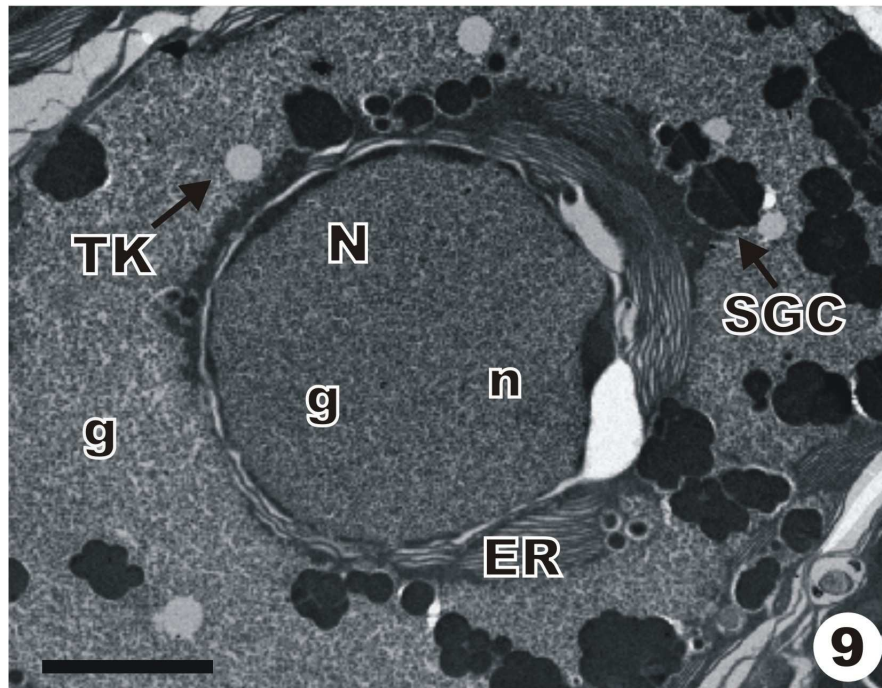
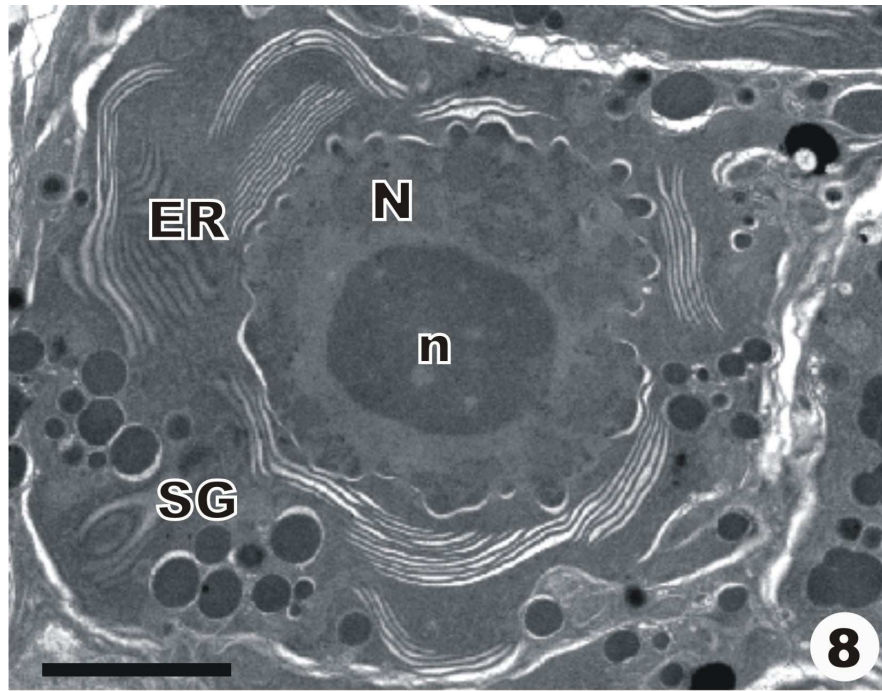
Obr.2+ 3: Detaily vitelinních buněk (VB), které se nachází ve vitelinním folikulu. Na obr.2 jsou vidět i jádra jednotlivých vitelocytů. (měřítko: 100 μ m; 30 μ m)



Obr. 4: Vitelinní folikul obsahující vitelocyty v různém stádiu vývoje – 1 nezralá ,
 2 – zrající buňka. CS – cytoplazmatické pouzdro (měřítko: 4 μ m)
 Obr. 5: Detail cytoplazmatického pouzdra (CS). EL – extracelulární lamina
 (měřítko: 1 μ m)



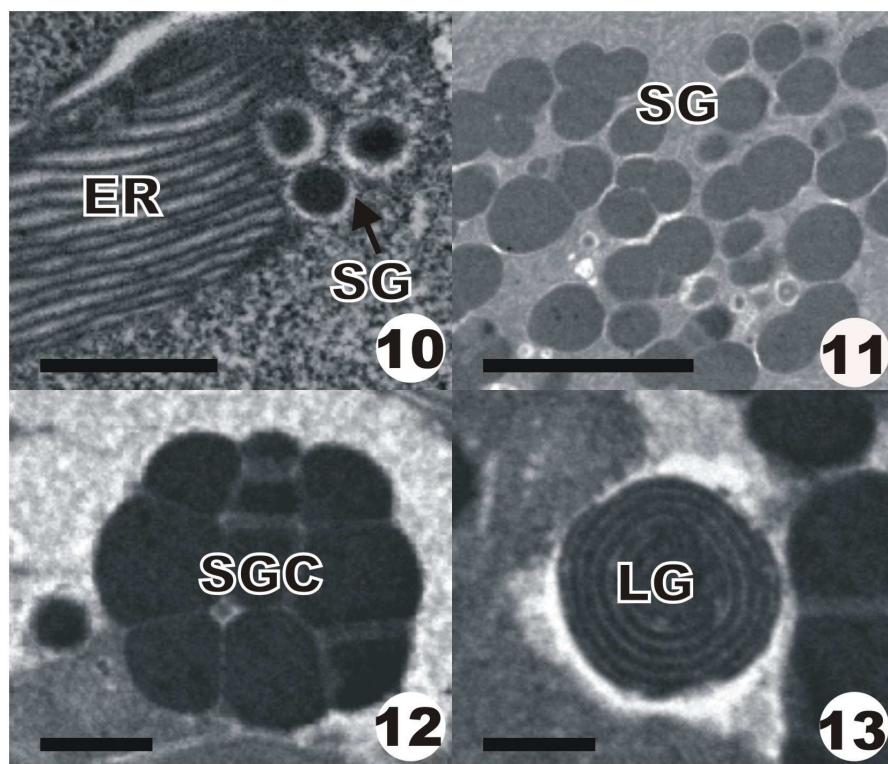
Obr. 6: Nezralá vitelinní buňka s velkým jádrem (N) a elektron-densním jadérkem (n). V cytoplazmě je několik malých mitochondrií (m). (měřítko: 1,5 μ m)
 Obr. 7: Počáteční stádium zrající buňky. Dochází k rozvoji endoplazmatického retikula (ER) a k tvorbě kapének obalového materialu (SG). N – jádro, n – jadérko (měřítko: 3 μ m)



Obr. 8: Pokročilejší stádium zrajícího vitelocytu. Jaderný povrch zvětšen četnými vchlípeninami jaderné membrány. Opět je zde možno vidět velké množství endoplazmatického retikula (ER) a kapének obalového materiálu různých velikostí (SG). N – jádro, n – jadérko (měřítko: 2,5 μ m)

Obr. 9: Zralý vitelocyt. Objevují se shluky kapének obalového materiálu (SGC) vznikající spojováním malých kapének. Ukládáním jaderného glykogenu (g) v jádře dochází k vytlačení jadérka k jaderné membráně. Endoplazmatické retikulum (ER) je soustředěno v perinukleární oblasti. N – jádro, n- jadérko

Cytoplazma obsahuje velké množství glykogenu (g) a několik tukových kapének (TK). (měřítko: 4 μ m)



Obr. 10: Vznik kapének obalového materiálu (SG) je vždy vázáno na přítomnost endoplazmatického retikula (ER). (měřítko: 0,5 μ m). Obr. 11 Jednotlivé kapénky obalového materiálu (SG) se v pokročilém stádiu zrajícího vitelocytu spojují dohromady za vzniku struktury, kterou je možno vidět na snímku 12. (měřítko: 1,5 μ m) Shluky kapének obalového materiálu (SGC) se nejčastěji nalézají ve zralých vitelocyttech (měřítko:0,6 μ m)
 Obr. 13: V cytoplazmě některých zralých vitelocytů se objevuje lamelární granule (LG). (měřítko: 0,5 μ m)

5 Diskuze

U většiny tasemnic (s výjimkou Cyclophyllidea) se vitelinní systém skládá z mnoha jednotlivých folikulů, které tvoří dva podélné laterální pásy uložené v kortikálním (Amphilinidea a Pseudophyllidea) nebo medulárním (Caryophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetraphyllidea) parenchymu (Swiderski a Xylander 2000).

Čeď Lytocestidae tvoří mezi Caryophyllidea výjimku, neboť vitelária jsou umístěna v kortikálním parenchymu (Mackiewicz 2003). To platí i pro tasemnici *Atractolytocestus huronensis*, která patří do zmíněné čeďe.

Atractolytocestus huronensis má dobře vyvinutý vitelinní systém s velkým množstvím vitelocytů umístěných ve folikulech. Vitelocyty se v embryogenezi všech monozoických a některých polyzoických řádů – Pseudophyllidea a Trypanorhyncha podílí na formování pevného vaječného obalu a poskytování zásobních látek pro vyvíjející se embryo (Swiderski a Xylander 2000). U Proteocephalidea, Cyclophyllidea a Tetraphyllidea přebírá ochrannou a výživnou funkci mateřský organizmus. Z toho důvodu je počet vitelocytů u zástupců těchto skupin redukován a kolem vajíčka se vytváří jen jemná a tenká kapsule (Swiderski a Xylander 2000).

Průběh vitelogeneze u *Atractolytocestus huronensis* připomíná v hlavních rysech tento proces dříve popsany u jiných Cestod (Mackiewicz 1968, Swiderski a kol. 2004, Swiderski a Xylander 2000, Bruňanská 1997, Swiderski a Mokhtar 1976, Swiderski a Mackiewicz 1976, Swiderski a Mokhtar 1974, Korneva 2001, Levron a kol. 2007), Monogeneí (Halton a kol. 1974) a Digeneí (Erasmus a kol. 1982).

Mezi zmíněné hlavní rysy patří:

- zvětšení buněčné velikosti a zvětšení jaderného povrchu
- postupný rozvoj buněčných organel - endoplazmatického retikula, mitochondrií a Golgiho aparátu, důležitých pro tvorbu vitelinního materiálu
- ukládání glykogenu a/nebo lipidů v cytoplazmě

Nezralé vitelocyty *Atractolytocestus huronensis* představují nediferencované buňky s velkým jádrem a malým množstvím buněčných organel, což je typické i pro jiné skupiny tasemnic.

V další fázi zrání dochází k rozvoji buněčných organel – endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, které jsou zodpovědné za tvorbu kapének obalového materiálu. Spojováním malých kapének obalového materiálu vznikají tzv. „shell globule clusters“ (shluky kapének obalového materiálu). „Shell globule cluster“ jsou typické pro všechny monozoické a dva polyzoické řády Pseudophyllidea a Trypanorhyncha (Swiderski a Xylander 2000).

U *A. huronensis* jsou elektron-densní kapénky obalového materiálu těsně spojené dohromady ve středně elektron-densní matrix. Toto uspořádání se nachází u karyofylidní tasemnice *Caryophyllaeus laticeps*, spatebotridní *Cyathocephalus truncatus* a pseudofylidní *Diphyllobothrium latum* (Levron a kol. 2007). U tetrafylidních tasemnic, pseudofylidní - *Paraechinophallus japonicus* a primitivních tasemnic – Amphilinidae a Gyrocotyliidea se „shell globule cluster“ skládají z volně uspořádaných „shell globule“ umístěných v elektron-lucidní matrix (Levron a kol. 2007). U Cyclophyllidea je vitelinní materiál ukládán v podobě velkých vitelinních váčků (Swiderski a kol. 1970, 2005, Świderski 1973).

Ve zralém vitelocytu *Atractolytocestus huronensis* dochází k ukládání velkého množství glykogenu v cytoplazmě a jádře a vzniku tzv. „jaderné vakuoly“, která byla pozorovaná u studovaných druhů tasemnic řádu Caryophyllidea – *Caryophyllaeus laticeps* a *Caryophyllaeides fennica* (Mackiewicz 1968), *Glaridacris catostomi* (Swiderski a Mackiewicz 1976), *Khawia armeniaca* (Swiderski a kol. 2004) a *Archigetes sieboldi* (Poddubnaya a kol. 2003).

Studie polyzoických pseudofylidních (Swiderski a Mokhtar 1974) nebo cyklofylidních tasemnic (Swiderski 1973, Swiderski, a kol. 1970) ukazují, že vitelinní buňky těchto tasemnic nemají schopnost ukládat glykogen do jádra. „Jaderná vakuola“ nebyla nalezena ani u Proteocephalidea *Proteocephalus longicollis* (Swiderski a kol. 1978), Cyclophyllidea *Catenotaenia pusilla*, *Inermicapsifer madagascariensis* a *Hymenolepis diminuta* (Swiderski a kol. 1970), Tetraphyllidea *Echeneibothrium beauchampi* (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1976) a Pseudophyllidea *Cyathocephalus truncatus* (Wisniewski 1932), *Schistocephalus solidus* (Smyth 1956) a *Bothriocephalus clavibothrium* (Swiderski a Mokhtar 1974). Nebylo to objeveno ani u Trematod (Mackiewicz 1968) a Digenea *Fasciola hepatica* a *Schistosoma mansoni* (Halton a kol. 1974).

U obratlovců byl vnitrojaderný glykogen nalezen v patologických buňkách. (Swiderski a kol. 2004).

Glykogen se u studované tasemnice ukládal také v cytoplazmě zralého vitelocytu, což je známé u Cestod a Trematod (Mackiewicz 1968).

Ve zralém vitelocytu *Atractolytocestus huronensis* byly v malém množství pozorovány elektron-lucidní tukové kapénky. Ty nebyly nalezeny u ostatních studovaných druhů tasemnic řádu Caryophyllidea. (Swiderski a kol. 2004).

Swiderski a Xylander (2000) vysvětlují nepřítomnost tukových kápenek u karyofylidních tasemnic tím, že jaderný glykogen vyrovnává nedostatek lipidů. Lipidy zřejmě nemohou být vajíčkem využity v prostředí s nízkým obsahem kyslíku.

Podle mých výsledků se lipidy u *Atractolytocestus huronensis* nachází a zřejmě tedy mohou být vajíčkem využity. Bylo by dobré udělat novou studii karyofylidních tasemnic, zda se u nich lipidy skutečně nevyskytují.

U ostatních řádů Cestod se lipidy v cytoplazmě nalézají v různém poměru ke glykogenu a vitelinnímu materiálu (Swiderski a Xylander 2000).

U řádu Tetracanthocephala se lipidy ukládají také v jádře zralých vitelocytů (Mokhtar-Maamouri a Swiderski 1976).

V cytoplazmě některých zralých vitelocytů *A. huronensis* byly v blízkosti endoplazmatického retikula nalezeny „lamelární granule“. Stejná struktura byla též objevena v cytoplazmě zralých vitelocytů spathebothridní tasemnice *Cyathocephalus truncatus* (Bruňanská a kol. 2005). Podobné granule se vyskytly i ve vitelocytech Monogeneí (Halton a kol. 1974) a Digeneí (Irwin a Threadgold 1970, Colhoun a kol. 1998). Jejich funkce není dosud známa.

6 Závěr

U *Atractolytocestus huronensis* byla pomocí světelné mikroskopie zjištěna lokalizace vitelinních folikulů a pomocí transmisní elektronové mikroskopie prostudována vitelogeneze a ultrastruktura vitelocytů.

Průběh vitelogeneze se v hlavních rysech podobá tomuto procesu u ostatních řádů Cestod, proto bych chtěla na závěr zdůraznit jen některé významné charakteristiky, zjištěné u studovaného druhu tasemnice:

1. Umístění vitelinních folikulů v kortikálním parenchymu potvrzuje, že toto uspořádání je typické pro čeleď Lytocestidae.
2. Vitelinní folikuly se skládají z vitelinních buněk v různých stádiích vývoje: nezralé, zrající a zralé vitelocyty
3. Nezralé vitelocyty jsou nediferencované buňky s malým množstvím buněčných organel.
4. Ve zrajících vitelocytech dochází ke zvětšení buněčné velikosti, zvýšení počtu buněčných organel a tvorbě vitelinního materiálu.
5. V cytoplazmě zralých vitelocytů vznikají spojováním kapének obalového materiálu „shell globule cluster“.
6. K ukládání glykogenu dochází nejen v cytoplazmě, ale i v jádře zralých vitelocytů, což je charakteristickým a významným znakem pouze řádu Caryophyllidea.
7. V cytoplazmě zralých vitelocytů bylo objeveno malé množství tukových kapének, které dosud nebyly pozorovány u jiných tasemnic z řádu Caryophyllidea
8. Lamelární granule nalezená v cytoplazmě zralého vitelocytu byla popsána také u spatebotridní tasemnice *Cyathocephalus truncatus*. U jiných Cestod se dosud nevyskytla (Bruňanská a kol. 2005). O možné příbuznosti řádů Spathebothriidae a Caryophyllidea uvažuje ve své práci Brooks a kol. (1991).

7 Použitá literatura

- Brooks D.R., Hoberg E.P., Weeks P.J. (1991):** Preliminary phylogenetic systematic analysis of the major lineages of the Eucestoda (Platyhelminthes: Cercomeria). Proceeding of the Biological Society of Washington, 104:651-668
- Bruňanská M. (1997):** *Proteocephalus exiguus* La Rue, 1911 (Cestoda, Proteocephallidea): ultrastructure of the vitelline cells, *Helmintologica*, 34 (1):9-13
- Bruňanská M., Poddubnaya L.G. a Dezfuli B.S. (2005):** Vitellogenesis in two spathebothriidean cestodes *Parasitol Res*, 96:390-397
- Caira J.N., Littlewood D.T.J. (2001):** Worms, Platyhelminthes. *Encyclopedia of biodiversity*, Academic Press, 5:863-899
- Colhoun L.M., Fairweather I., Brennan G.P. (1998):** Observations on the mechanism of eggshell formation in the liver fluke, *Fasciola hepatica* *Parasitol.*, 116: 555-567
- Erasmus D.A., Popiel I., Shaw J.R. (1982):** A comparative study of the vitelline cell in *Schistosoma mansoni*, *S. Haematobium* and *S. Mattheei*. *Parasitology*, 84: 283-287
- Halton D.W., Stranock S.D., Hardcastle A. (1974):** Vitelline Cell Development in Monogenean Parasites. *Z Parasitenk*, 45:45-61
- Hoberg E.P., Mariaux J., Justine J.L., Brooks D.R., Weeks P.J. (1997):** Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis *J Parasitol*, 83:1128-1147
- Horák P. a Scholz T. (1998):** *Biologie helmintů*. Skripta PpF UK, Karolinum, Praha
- Irwin S.W. a Threadgold L.T. (1970):** Electron microscope studies on *Fasciola hepatica*. The development of the vitelline cells. *Exp. Parasitol*, 28:399-411
- Jíra J. (1998):** *Lékařská helmintologie*. Galén, Praha
- Korneva J.V. (2001):** Vitellogenesis and capsule formation during embryogenesis in *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda, Pseudophyllidea, Triaenophoridae). *Zool.Zh*, 80:1422-1428
- Levron C., Poddubnaya L.G., Kuchta R., Freeman M. and Scholz T. (2007):** Vitellogenesis and vitelline system in the pseudophyllidean tapeworm *Paraechinophallus japonicus*: ultrastructural and cytochemical studies *Folia Parasitol*, 54:43-50
- Mackiewicz J.S. (1968):** Vitellogenesis and eggshell formation in *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas) and *Caryophyllaeides fennica* (Schneider) (Cestoidea:Caryophyllaeidea) *Z Parasitenk*, 30:18-32
- Mackiewicz J.S. (1972):** Caryophyllidea (Cestoidea): review. *Exp Parasitol*, 31: 417-512

- Mackiewicz J.S. (1981):** Caryophyllidea (Cestoidea): Evolution and classification, Academic Press
- Mackiewicz J.S. (2003):** Caryophyllidea (Cestoidea): Molecules, morphology and evolution Acta Parasitol, 48:143-154
- Mokhtar-Maamouri F. a Swiderski Z. (1976):** Vitellogénèse chez *Echeneobothrium beauchampi* Euzet, 1959 (Cestoda:Tetracyphyllidea, Phyllobothriidae). Z Parasitenk, 50:293-302
- Nebesářová J. (2001):** <http://www.paru.cas.cz/LEM> (skripta v elektronické podobě)
- Olson P.D., Littlewood D.T.J., Bray R.A., Mariaux J. (2001):** Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda), Molecular Phylogenetics and Evolution, 19:443-467
- Poddubnaya L.G., Mackiewicz J.S., Kuperman B.I. (2003):** Ultrastructure of *Archigetes sieboldi* (Cestoda: Caryophyllidea): relationship between progenesis, development and evolution. Folia Parasitol, 50:275-293
- Smyth J.D. (1956):** Studies on tapeworm physiology . A histochemicals study of egg-shell formation in *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea). Exp. Parasitol, 5:519-540
- Swiderski Z., Huggel H. a Schonenberger N. (1970):** Comparative fine structure of vitelline cells in cyclophyllidean cestode. Proceedings of 7th Int. Congress of Electron Microscopy 825-826 Grenoble
- Swiderski Z.(1973):** Vitellogenesis in the cestode *Inermicapsifer madagascariensis* (Davaine, 1870), Baer, 1956 (Abstract). 48th Annual Meeting American Society of Parasitologists p.40 Toronto, Canada
- Swiderski Z., Mokhtar F. (1974):** Étude de la vitellogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). Z Parasitenk, 43:135 - 149
- Swiderski Z., Mackiewicz J.S. (1976):** Electron microscope study of vitellogenesis in *Glaridacris catostomi* (Cestoidea: Caryophyllidea). Int J Parasitol, 6:61-73
- Swiderski Z. a Subilia L. (1978):** Electron microscopy of embryonic envelope formation by the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800) (Proteocephalidea), Proceedings of the 9th Int.Congress on Electron Microscopy, Toronto 2: 444-5
- Swiderski Z. a Eklun-Natey R. (1978):** Fine structure of the spermatozoon of *Proteocephalus longicollis* (Cestoda, Proteocephalidea). Proceedings of 9th Int.Congress on Electron Microscopy, Toronto 572-573

Swiderski Z., Chomicz L.Grytner-Ziecina B.a Tkach V.V (2000): Electron microscope study of vitellogenesis in *Catenotaeniidae pusilla* (Goeze, 1782) (Cyclophyllidea, Catenotaeniidae). Acta Parasitol. 45 (2): 83-88

Swiderski Z., Xylander W.E.R. (2000): Vitelocytes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle Int J Parasitol, 30:805-817

Swiderski Z., Bruňanská M., Poddubnaya L.G., Mackiewicz J.S. (2004): Cytochemical and ultrastructural study on vitellogenesis in caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915) Acta Parasitol, 49:16-24

Wisniewski L:W: (1932): *Cyathocephalus truncatus* Allgemeine Morphologie. Bulletin Int. de l'Academie des Polonaise des Sciences ot de lettres, 2: 311-327

Xylander W.E.R. (1988): Ultrastructural studies on the reproductive system of Gyrocotylidea and Amphilinidea (Cestoda): Vitellarium, vitelocyte development and vitelloduct of *Amphilina foliacea*. Parasitol Res, 74:363-370

Přílohy

Příloha 1 (Nebesářová 2001)

Příprava nasyceného roztoku octanu uranylu (dále UA)

Potřebné chemikálie: uranylacetát, etanol (absolut.)

Postup:

1/ navážíme 2,6g UA a zalejeme jej 20ml 50% etanolu

2/ roztok mícháme 2 hod. na magnetickém míchadle

3/ roztok 3x přefiltrujeme přes stejný filtrační papír nejlépe v lednici

4/ necháme před použitím stát do druhého dne v lednici

Vzhledem k jeho citlivosti na světlo skladujeme připravený roztok v tmavé lahvičce při 4°C.

Příloha 2 (Nebesářová 2001)

Potřebné chemikálie: citrát olova, hydroxid sodný, čerstvě převařená destilovaná voda (kvůli snížení obsahu oxidu uhličitého)

Postup:

1/ navážíme 0,02-0,04 g LC a zalejeme jej 20ml převařené dest. vody

2/ přidáme 0,2ml 10N NaOH (získáme jej rozpuštěním 40g NaOH ve 100ml vody)

3/ po úplném rozpuštění uchováváme roztok v tmavé lahvičce při 4°C

4/ před použitím odebereme potřebné množství injekční stříkačkou z oblasti těsně pod hladinou a roztok centrifugujeme při 10000-15000ot/min deset minut.

