

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

## **Magisterská práce**



## **Vitelogeneze karyofylidních tasemnic**

Petra Drobníková

Vedoucí práce: RNDr. Magdaléna Bruňanská, CSc.

České Budějovice 2010

Petra Drobníková 2010: Vitelogeneze karyofylidních tasemnic. Magisterská práce [Vitellogenesis in caryophyllidean cestodes. Mgr.Thesis, in Czech] – The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Vitellogenesis in two caryophyllidean cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllaeidae) and *Khawia sinensis* (Lytocestidae), parasitizing cyprinid fishes *Abramis brama* and *Cyprinus carpio* were examined using light (LM) and transmission electron microscopy (TEM) and cytochemical staining with periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate for glycogen. Mature vitelline follicles consist of vitelline cells at various stages of development and an interstitial tissue. Maturing and mature vitellocytes contain vitelline material in the form of single small shell globules, which fuse and give rise to the large shell globule clusters. Shell globule clusters are of two types. The first type is represented by loosely packed electron-dense shell globules situated in electron-dense matrix. The second type are tightly packed shell globules embedded in matrix of moderate density. The basic pattern of vitellogenesis was same as was described for other caryophyllideans cestodes. Glycogen was present in the cytoplasm and in the nucleus of the mature vitellocytes. Small lipid droplets were found occasionally in the cytoplasm of *C. laticeps* for the first time within the Caryophyllidea. In addition, “lamellar granules“ were observed in the cytoplasm of the mature vitellocytes in *Khawia sinensis*.

Tato práce byla financována z interního grantu PaÚ BC AV ČR č. 560/8561 (P.I.: M. Bruňanská) a z grantu VEGA č. 2/0018/08 (P.I.: M. Bruňanská).

Prohlašuji, že jsem svoji magisterskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne

.....  
Petra Drobníková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomohli s vypracováním této práce, především pak své školitelce RNDr. Magdaléně Bruňanské za její odborné vedení, rady a čas, který mi věnovala. Za cenné rady také děkuji Prof. Tomáši Scholzovi. Dále bych chtěla poděkovat Prof. Zdislawu Świdorskému a Dr. Larise G. Poddubné za poskytnutý materiál.

# Obsah

1	<b>Úvod a literární přehled</b> .....	1
1.1	Třída Cestoda .....	1
1.2	Řád Caryophyllidea .....	3
1.3	Vitelocyty a vitelinní systém tasemnic .....	5
1.4	Vitelogeneze u tasemnic .....	7
1.4.1	Nezralé vitelocyty .....	8
1.4.2	Zrající vitelocyty .....	8
1.4.3	Zralé vitelocyty .....	10
1.5	Srovnání zralých vitelocytů – cytoplazmatické inkluze .....	10
1.5.1	Vitelinní materiál .....	10
1.5.2	Glykogen ( $\alpha$ a $\beta$ forma) .....	12
1.5.3	Lipidy (nenasycené a nasycené mastné kyseliny) .....	12
1.6	Vitelogeneze u Caryophyllidea .....	13
2	<b>Cíle práce</b> .....	17
3	<b>Materiál a metody</b> .....	18
3.1	Materiál .....	18
3.2	Metody .....	18
3.2.1	Zpracování materiálu pro světelný a transmisní elektronový mikroskop .....	18
3.2.2	Příprava a barvení polotných řezů .....	19
3.2.3	Příprava a kontrastování ultratenkých řezů .....	19
3.2.4	Thiéryho metoda pro důkaz glykogenu .....	19
4	<b>Výsledky</b> .....	21
4.1	<i>Caryophyllaeus laticeps</i> (Pallas, 1781)(Caryophyllaeidae) .....	21
4.1.1	Nezralé vitelocyty .....	21
4.1.2	Zrající vitelocyty .....	21
4.1.3	Zralé vitelocyty .....	22
4.1.4	Vitelodukt .....	22
4.2	<i>Khawia sinensis</i> Hsü, 1935 (Lytocestidae) .....	27
4.2.1	Nezralé vitelocyty .....	27
4.2.2	Zrající vitelocyty .....	27
4.2.3	Zralé vitelocyty .....	28
4.2.4	Vitelodukt .....	28
4.2.5	Vitelinní rezervoár .....	29
4.2.6	Vajíčka .....	29
5	<b>Diskuze</b> .....	37
5.1	Porovnání vitelinního systému tasemnic (Cestoda) .....	37
5.2	Porovnání průběhu vitelogeneze tasemnic (Cestoda) .....	38
5.3	Porovnání ultrastruktury zralých vitelocytů - cytoplazmatické inkluze .....	38
6	<b>Závěr</b> .....	42
7	<b>Literatura</b> .....	43

# 1 Úvod a literární přehled

## 1.1 Třída Cestoda

Tasemnice (Cestoda) jsou výhradně parazitickou skupinou kmene Platyhelminthes (ploštěnci), který se vyznačuje bilaterální symetrií a jeho zástupci jsou převážně dorzoventrálně zploštělí. Typická je absence tělních dutin, oběhového a dýchacího systému. Vnitřní orgány jsou uloženy v pojivové tkáni – parenchymu. Vylučovací soustava je protonefridiálního typu.

Charakteristickým znakem tasemnic je absence střeva a stavba povrchu těla – neodermis (pokožkový syncytiální epitel), který umožňuje vstřebávání živin, a tím tedy nahrazuje funkci trávicí soustavy. Na povrchu neodermis se navíc nachází mikrotrichy, které zvětšují absorpční plochu tegumentu a zvyšují přichycovací schopnost parazita (Chervy 2009).

Většina systémů rozděluje tasemnice na skupiny Cestodaria – s monozoickými řády Amphilinidea a Gyrocotylidea, a eucestoda („pravé tasemnice“), zahrnující s výjimkou řádu Caryophyllidea a Spathebothriidea zástupce s článkovaným tělem (Khalil a kol. 1994).

Tělo polyzoických (článkovaných) tasemnic je rozděleno na skolex s přichycovacími orgány a strobilu, která se skládá z jednotlivých článků (proglotid) (Caira a Littlewood 2001). Každý článek obsahuje jednu, někdy i dvě sady samčích a samičích pohlavních orgánů. U některých tasemnic (*Dipylidium caninum*) jsou reprodukční sady zdvojeny. Díky těmto adaptacím a často složitým vývojovým cyklům mají tasemnice obrovský reprodukční potenciál a jsou tedy schopné velké produkce vajíček.

Tasemnice jsou převážně paraziti trávicího traktu obratlovců. Nejvyšší počet řádů cizopasí v parybách a rybách. Druhově nejpočetnější je řád Cyclophyllidea, jehož zástupci parazitují především u ptáků a savců. Mezi tasemnicemi nalezneme celou řadu medicínsky (*Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Diphyllobothrium latum*) i veterinárně (*Taenia ovis*, *Echinococcus granulosus*) významných zástupců (Khalil a kol. 1994).

Většina tasemnic jsou hermafroditi (kromě čeledí Dioecocestidae a Dioecotaeniidae) a k oplození nejčastěji dochází mezi jednotlivými články stejného jedince (Khalil a kol. 1994). Všechny tasemnice (kromě *Archigetes* a *Hymenolepis*

*nana*) mají nepřímé vývojové cykly, ve kterých dochází ke střídání hostitelů. Mezihostitelé se nakazí požitím vajíčka, larvy nebo onkosféry. V definitivním hostiteli dochází k dokončení vývojového cyklu a tasemnice pohlavně dospívá.

Samčí pohlavní soustava je tvořena různým počtem varlat, která zaujímají větší část vnitřního prostoru článku. Varlata jsou navzájem propojena semennými kanálky (*vasa efferentia*), které ústí do společného chámovodu (*vas deferens*) a ten přechází do cirrového vaku. Dále se zde nachází semenný váček, sloužící jako zásobárna spermií před kopulací, a vychlípitelný orgán cirrus (Khalil a kol. 1994).

Samičí pohlavní soustava je heterocelulární, skládá se ze dvou oddělených orgánů – nepárového vaječníku (*ovarium*) a žlutkových folikulů (*vitelaria*) (Xylander 1988, Caira and Littlewood 2001). Vitelária produkují žlutkové buňky (*vitelocyty*), v nichž se vytváří žlutkový materiál, který se podílí na tvorbě vaječného obalu a poskytuje zásobní látky pro vyvíjející se embryo.

Vajíčka tasemnic jsou ektolecitálního typu. Oocyty jsou uvolňovány z vaječníku do oookaptu a poté putují vejcovodem (*ovidukt*) do rozšířené části vejcovodu (*ootyp*), kam ústí i vývody vitelárií. Na tomto místě dochází k tvorbě vajíčka. Oocyty jsou obklopeny několika vitelocyty a obalí se pouzdrém. Na tvorbě vaječných obalů se také podílí produkty Mehlisovy žlázy. Zralá vajíčka se nacházejí v děloze.

Podle počtu vitelocytů, podílejících se na tvorbě oocyty, a množství vitelinního materiálu ve vitelocyty rozlišujeme dva typy ektolecitálních vajíček – polylecitální a oligolecitální (Świdorski a Xylander 2000).

U primitivních monozoických řádů tasemnic (*Gyrocotylidea* a *Amphilinidea*) a nižších eucestod (*Caryophyllidea*, *Spathebothriidea*, *Bothriocephalidea* a *Trypanorhyncha*) se utvářejí polylecitální vajíčka. Tato vajíčka jsou charakterizována velkým množstvím vitelinního materiálu a velkým množstvím zúčastněných vitelocytů. Počet vitelocytů se u jednotlivých druhů a skupin tasemnic liší. Vajíčka těchto tasemnic dokončují svůj vývoj až ve vnějším prostředí, a proto potřebují pevný ochranný obal a vnitřní zásoby živin.

U ostatních řádů tasemnic (*Tetraphyllidea*, *Cyclophyllidea*, *Proteocephalidea*) se formují oligolecitální vajíčka. Na tvorbě těchto vajíček se podílí menší množství vitelocytů a tedy i menší množství vitelinního materiálu. Tento typ vajíček se vyvíjí v děloze a mateřský organizmus mu poskytuje ochranu a výživu. Proto se kolem vajíčka vytváří pouze tenká, křehká kapsule a výživná funkce vitelocytu je redukována.

## 1.2 Řád Caryophyllidea

Tento řád zahrnuje 41 rodů se 150 druhy, které se nacházejí ve 4 čeledích (Mackiewicz 1994): Balanotaeniidae, Capingentidae, Caryophyllidae a Lytocestidae. Jeho zástupci se vyskytují ve všech zoogeografických oblastech, ale nejvíce jich nalezneme v nearktické oblasti (Mackiewicz 1981). Je u nich patrný vysoký stupeň endemismu, neboť zde nenalezneme kosmopolitní druhy a je jen pár rodů, které se nachází ve více než jedné zoogeografické oblasti (Mackiewicz 1972). Jejich výskyt je vázán na ryby řádu Cypriniformes a Siluriformes.

Tasemnice řádu Caryophyllidea jsou monozoické – tělo není segmentované a obsahuje pouze jednu sadu pohlavních orgánů (Caira a Littlewood 2001). Přichycovací orgány jsou slabě vyvinuty a jsou tvořeny mělkými zářezy nebo rýhami. Vedle mechanického přichycení hraje významnou roli přichycení pomocí sekretů četných žlázek umístěných na skolexu (Khalil a kol. 1994).

Životní cykly jsou nepřímé, s účastí jednoho mezihostitele. Operkulární vajíčka se dostávají s výkaly ryb do vody a usazují se na dně. Uvnitř vajíčka se formuje neobrvená larva onkosféra, která je opatřena 6 embryonálními háčky. Po pozření mezihostitelem se larva uvolňuje a putuje do přední části tělní dutiny nebo semenného vaku máloštětinatce (čeleď Naididae a Tubificidae), kde se postupně mění na plerocerkoid (Chervy 2003). Infekční plerocerkoid je charakterizován přítomností cercomeru s 6 embryonálními háčky avšak pohlavní orgány nejsou ještě zcela vyvinuty (Mackiewicz 1972). Plerocerkoid se dostane do trávicího traktu ryby pozřením napadeného mezihostitele, ztrácí cercomer a pohlavně dospívá. Dospělci parazitují ve střevě sladkovodních, benticky se živících ryb řádu Siluriformes a Cypriniformes. Tasemnice rodu *Archigetes* tvoří mezi Caryophyllidea výjimku a je schopna dokončit svůj vývojový cyklus již v tělní dutině máloštětinatců (Tubificidae) a nepotřebuje dalšího mezihostitele.

Vajíčka jsou operkulární a jsou obklopena tenkým vaječným obalem. Velikost se pohybuje v rozmezí od 17 x 11  $\mu\text{m}$  do 111 x 80  $\mu\text{m}$ . Uvnitř vajíčka se nachází jeden oocyt a několik vitelinních buněk. Počet vitelinních buněk potřebných pro tvorbu vajíčka se pohybuje od 3 do 10 vitelocytů na jeden oocyt (Mackiewicz 1972). Vajíčka většiny Caryophyllidea dokončují svůj vývoj až ve vodě. Výjimkou jsou *Djombangia*, *Wenyonia*, *Hunterella* a *Biacetabulum*, u kterých k vývoji dochází již v děloze (Świdorski a Xylander 2000).

Caryophyllidea zaujímají v evoluci tasemnic klíčovou roli a to především kvůli monozoické stavbě těla a životnímu cyklu, kde jako mezipositel vystupuje vždy vodní kroužkovec.

Postavení řádu Caryophyllidea v rámci nižších eucestod není dosud jednoznačně určené. Otázkou zůstává, zda monozoická stavba těla je primárně nebo sekundárně odvozená a tedy zda jsou Caryophyllidea předky ostatních eucestod nebo zda se vyvinuly z polyzoické tasemnice. Také se předpokládá, že hlavní roli v evoluci Caryophyllidea mohla hrát progeneze, což znamená schopnost dosáhnout pohlavní dospělosti už v bezobratlém hostiteli (Mackiewicz 2003).

Fylogenetické a systematické postavení řádu je založené na morfologických znacích, životních cyklech a molekulárních metodách. Molekulární analýzy založené na kompletní sekvenaci malé (18S) a velké (28S) podjednotky ribosomální DNA (Waeschenbach a kol. 2007, Olson a kol. 2008) nepodporují bazální postavení Caryophyllidea. Na bázi eucestod se podle jejich výsledků nachází řád Spathebothriidea a teprve poté následuje řád Caryophyllidea tvořící sesterskou skupinu s Diphyllbothriidea a Haplobothriidea. Výsledky kladistických metod založených na morfologii (Brooks a kol. 1991, Hoberg a kol. 1997, Olson a kol. 2001, Oros a kol. 2009) jsou negativně ovlivněny nedostatečným množstvím dat, nejednotnou terminologií a homoplasí znaků. Nedostatečná pozornost je věnována rozdílům na cytohistologické úrovni. Jedním z cytohistologických znaků, který by se mohl uplatnit v kladistických metodách je tvorba velkého množství glykogenu ve zralých vitelocytech karyofylidních tasemnic a vznik tzv. „jaderné vakuoly“. „Jaderná vakuola“ byla pozorována u 50 druhů a mohla by tedy být diagnostickým znakem Caryophyllidea (Mackiewicz 2003). Tato vakuola nebyla nalezena ve zralých vitelocytech ostatních eucestod ani primitivních řádů Gyrocotylidea a Amphilinidea (Świderski a Xylander 2000).

Postavení a příbuzenské vztahy Caryophyllidea k dalším bazálním skupinám tasemnic by mohlo být osvětleno podrobnější znalostí evoluce životních cyklů tasemnic a původem strobilizace (Mackiewicz 2003, Beveridge 2001). Důležité je hledání nových morfologických a ultrastrukturálních znaků vhodných pro vyhodnocení vztahů mezi bazálními skupinami tasemnic. Pro fylogenetické analýzy by mohla být důležitým znakem ultrastruktura rozmnožovací soustavy (spermiogeneze a vitelogeneze) různých skupin tasemnic (Justine 1998, Świderski a Xylander 2000).



### ***Caryophyllaeus laticeps*** (Pallas, 1781)

Systematicky se řadí do čeledi Caryophyllaeidae, podle umístění vitelinních folikulů v medulárním parenchymu. Dospělí jedinci jsou 20–40 mm dlouzí. Původně byl popsán jako parazit *Abramis brama*. Nyní je znám asi u 30 druhů sladkovodních ryb, především z čeledi Cyprinidae. Nalezen také u některých dravých ryb (štika a okoun). Parazituje ve střevě ryb. Vyskytuje se v severní Eurasii, Evropě, Sibiři, střední Asii, Rusku a na Dálném Východě (Oros a kol. 2009).

### ***Khawia sinensis*** Hsü, 1935

Systematicky se tasemnice *K. sinensis* řadí do čeledi Lytocestidae, podle umístění vitelinních folikulů v kortikálním parenchymu. Dospělí jedinci dosahují délky 27–35 mm, ale mohou mít až 120 mm. Na přední části skolexu jsou hluboké zářezy, které utvářejí jeho vějířovitý tvar. Parazituje ve střevě kaprovitých ryb (Cyprinidae), kde je trvale přichycena ke střešní stěně. Při silné invazi způsobuje úmrtnost plůdku a tedy ekonomické ztráty v chovech kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

*K. sinensis* se původně vyskytovala pouze ve východní Asii. Od roku 1960 se úspěšně rozšířila do mnoha evropských zemí, Severní Ameriky a Japonska (Oros a kol. 2009). V současné době je zaznamenán pokles jejího výskytu, který by mohl souviset s rozšířením další karyofylidní tasemnice *Atractolytocestus huronensis*.

## **1.3 Vitelocyty a vitelinní systém tasemnic**

Na rozdíl od ostatních živočichů je pro ploštěnky (Neophora) a Neodermata (Cestoda, Monogenea a Trematoda) typické, že žlutkové zásoby nejsou uloženy v oocytu samotném, ale ve specializovaných buňkách – vitelocytech. Samičí pohlavní soustava těchto skupin je proto heterocelulární – skládá se ze dvou oddělených orgánů – vitelária a ovaria. Vajíčka jsou ektolecitálního typu.

Vitelinní systém tasemnic se skládá z vitelárií a viteloduktů.

### Vitelárium

U většiny tasemnic je vitelárium tvořeno vitelinními folikuly, uspořádanými v laterálních pásech umístěných buď v kortikálním (Amphilinidea, Bothriocephalidea, Trypanorhyncha) nebo medulárním (Caryophyllidea, Tetraphyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea) parenchymu (Świdorski a Xylander 2000). Existují výjimky např. u

řádu Caryophyllidea – čeleď Lytocestidae a u řádu Proteocephalidea – čeleď Monticellinae, u kterých se vitelinní folikuly nacházejí v kortikálním parenchymu. Kortikální a medulární parenchym je oddělen podélnými svalovými vlákny, které procházejí celým tělem tasemnice (Khalil a kol. 1994). Tvar folikulů může být kulatý, oválný nebo nepravidelný. U Cyclophyllidea je vitelárium buď redukováno do jediného útvaru a leží v blízkosti ovaria, nebo zcela chybí (Avitellina).

### Vitelinní folikuly

Každý vitelinní folikul je tvořen vitelinními buňkami (vitelocyty) různého stupně zrání od nezralých a zrajících až po zralé. Nezralé vitelinní buňky se nacházejí především na okraji folikulu, zatímco zralé v blízkosti jeho středu. Kromě vitelinních buněk zde byly popsány buňky kmenové a „buňky“ intersticiální (Mackiewicz a Świdorski 1976). Kmenové buňky jsou velké buňky umístěné obvykle ve středu každého folikulu (Świdorski a Mackiewicz 1976). Intersticiální tkáň má syncytiální charakter. Svými výběžky obklopuje jednotlivé vitelinní buňky a na okraji vitelinního folikulu vytváří cytoplazmatický obal. Cytoplazma obsahuje jádra s rozptýleným heterochromatinem, volné ribosomy, mitochondrie a malé vesikuly (Poddubnaya a kol. 2006).

### Vitelocyty

Žloutkové buňky (vitelocyty) jsou vytvářeny uvnitř vitelinních folikulů a jsou bohaté na zásobní látky.

Vitelocyty zastávají v embryogenezi tasemnic dvě důležité funkce:

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

Během evoluce mohla být každá z těchto dvou funkcí redukována nebo zesílena u různých skupin v závislosti na jejich typu embryonálního vývoje, stupni ovoviviparity, a životním cyklu (Świdorski a Xylander 2000).

### Vitelodukty

Vitelodukt je kanálek spojující vitelinní folikuly. Je tvořen epiteliální stěnou pokrytou lamely a řasinkami. Každá řasinka je ke stěně ukotvena bazálním tělískem

a na příčném řezu má po obvodu 9 pravidelně uspořádaných mikrotubul, střední pár mikrotubulů nemusí být vždy přítomen (Poddubnaya a kol. 2005).

U tasemnic řádu Caryophyllidea a Spathebothriidea malé vitelinní kanálky navzájem propojují jednotlivé vitelinní folikuly a vytváří dva velké laterální kanálky. Tyto kanálky ústí do příčného kanálku, který se nachází v blízkosti vaječníku a zastává funkci vitelinního rezervoáru (Mackiewicz 1972). Z vitelinního rezervoáru vybíhá ovovitelodukt, který spojuje vitelinní systém žláz s oviduktem (Świderski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2005a, b).

### Vitelinní rezervoár

Vitelinní rezervoár se vyskytuje pouze u některých skupin tasemnic, např. u Caryophyllidea (Mackiewicz 1968), Spathebothriidea (Poddubnaya a kol. 2005), Diphyllbothriidea (Poddubnaya 2002). Nachází se v blízkosti vaječníku a vzniká spojením velkých laterálních kanálků. Jeho syncytiální stěna je tvořena několika malými jádry, které jsou obklopené cytoplazmou s četnými ribosomy a mitochondriemi. Na rozdíl od viteloduktů nejsou součástí stěny řasinky, ale pouze lamely (Poddubnaya a kol. 2005). Slouží jako zásobárna zralých vitelocytů (Świderski a Xylander 2000).

## 1.4 Vitelogeneze u tasemnic

Ultrastrukturální charakteristiky vitelogeneze byly dosud studovány u těchto druhů tasemnic:

**Amphilinidea** – *Amphilina foliacea* (Xylander 1988)

**Bothriocephalidea** – *Bothriocephalus clavibothrium*, *Paraechinophallus japonicus*, *Triaenophorus nodulosus*, (Świderski a Mokhtar-Maamouri 1974, Levron a kol. 2007, Korneva 2001)

**Caryophyllidea** – *Atractolytocestus huronensis*, *Caryophyllaeus laticeps*, *Glaridacris catostomi*, *Khawia armeniaca* a *Wenyonia virilis* (Bruňanská a kol. 2009, Świderski a kol. 2004a, Świderski a Mackiewicz 1976, Świderski a kol. 2004b, Świderski a kol. 2009)

**Cyclophyllidea** – *Catenotaenia pusilla*, *Inermicapsifer madagascariensis*, *Moniezia expansa* a *Mosgovoyia ctenoides* (Świderski 1973, Świderski a kol. 2000, Hai-Yun a kol. 2003, Świderski a kol. 2005)

**Gyrocotylidea** – *Gyrocotyle urna* (Xylander 1987)

**Proteocephalidea** – *Proteocephalus longicollis*, *Proteocephalus percae* a *Proteocephalus torulosus* (Bruňanská 1997, Stránská 2005)

**Spathebothriidea** – *Cyathocephalus truncatus*, *Didymobothrium rudolphii* a *Diplocotyle olrikii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006)

**Tetraphyllidea** – *Echeneibothrium beauchampi* (Mokhtar-Maamouri a Świderski 1976)

**Trypanorhyncha** – *Dolfusiella spinulifera*, *Parachristianella trygonis* a *Progrillotia pastinacae* (Świderski a kol. 2006a, b, Świderski a kol. 2007)

Poznatky o vitelogenezi tasemnic sumarizuje práce Świderského a Xylandera (2000). Vitelogeneze je kontinuální proces a k usnadnění popisu je rozdělen na několik fází vývoje vitelinních buněk: nezralé, zrající a zralé vitelocyty.

#### 1.4.1 Nezralé vitelocyty

Nezralé vitelocyty jsou nediferencované buňky, představující prekurzory zralých vitelocytů. Umístěny jsou především na periférii vitelinního folikulu. Jsou převážně oválného nebo kulovitého tvaru a dosahují v průměru 9  $\mu\text{m}$ .

Velkou část jejich buněčného prostoru zaujímá velké jádro, které obsahuje zřetelné jadérko homogenního typu a nepravidelné shluky kondenzovaného chromatinu. U tasemnice *Gyrocotyle urna* se v nezralých vitelocytech jadérko nenachází a objevuje se až v průběhu zrání (Xylander 1987).

Buněčné organely jsou zastoupeny několika mitochondriemi a četným počtem volných ribosomů nepravidelně roztroušených v cytoplazmě. V této fázi je Golgiho aparát slabě vyvinut a pokud je přítomen, skládá se z několika zploštělých váčků.

#### 1.4.2 Zrající vitelocyty

Tato fáze může být ještě rozdělena na počáteční a pokročilé stádium vývoje. V počátečním stádiu vývoje dochází ke zvětšení buněčné velikosti a také ke zvětšení jaderného povrchu tvorbou četných vchlípenin jaderné membrány (Świderski a Xylander 2000). U některých druhů tasemnic je zvětšení jaderného povrchu doprovázeno přeměnou jadérka, které se postupně stává heterogenním a oproti jadérku v nezralých vitelocytech je nepravidelného tvaru a je složeno ze sítě elektron-densního heterochromatinu (Świderski a Mackiewicz 1976). V cytoplazmě dochází

k vývoji buněčných organel, především Golgiho aparátu (GA) a granulárního endoplasmatického retikula (GER) (Świderski a Xylander 2000). GER tvoří soustava vzájemně propojených membránových cisteren a kanálků. GA je tvořen podlouhlými váčky různé velikosti a vytváří těsnou vazbu na tubulární elementy GER. V této fázi také dochází k ukládání cytoplasmatických inkluzí – tukových kapének, glykogenu, vitelinních granulí nebo kapének obalového materiálu (shell globules).

V pokročilém stádiu vývoje dochází k dalšímu zvětšování buněčné velikosti a jaderného povrchu tvorbou četných vchlípenin jaderné membrány. V jaderné membráně se nachází četné jaderné póry. Malé shluky kondenzovaného chromatinu jsou roztroušené v periférní jaderné oblasti, často přiléhající k jaderné membráně. V cytoplazmě narůstá množství buněčných organel, zejména dochází k rozvoji paralelních cisteren GER a GA, narůstá také počet mitochondrií. Uvnitř GA vznikají malá sekreční zrna, která představují první stupeň vývoje kapének obalového materiálu a obsahují bílkovinné prekurzory obalového materiálu (Świderski a Xylander 2000).

Postupným spojováním kapének obalového materiálu vznikají shluky nazývané “shell globule clusters“ a jsou typické pro vitelocyty všech monozoických řádů tasemnic (Amphilinidea, Gyrocotylidea a Caryophyllidea) a pro polyzoické řády Spathebothriidea, Bothriocephalidea a Trypanorhyncha.

Postupným spojováním kapének vitelinního materiálu vznikají buď heterogenní nebo homogenní vitelinní granule. Heterogenní granule se nachází ve vitelocytech u tasemnic řádu Proteocephalidea – *Proteocephalus longicollis*, *Proteocephalus percae* a *Proteocephalus torulosus* (Bruňanská 1997, Stránská 2005). Ve vitelocytech cyklofylidních tasemnic se tvoří homogenní elektron-densní vitelinní granule, např. u *Hymenolepis diminuta* (Świderski a kol. 1970), velké vitelinní váčky u *Catenotaenia pusilla* (Świderski a kol. 2000), nebo jeden velký vitelinní váček u *Inermicapsifer madagascariensis* a *Mosgovoyia ctenoides* (Świderski 1973, Świderski a kol. 2005).

U všech studovaných tasemnic se nejdříve vytváří obalový nebo vitelinní protein a potom následuje syntéza a ukládání glykogenu a tukových kapének (Świderski a Xylander 2000).

### 1.4.3 Zralé vitelocyty

Zralé vitelocyty jsou plně diferencované buňky, které představují holokrinní typ sekrece, kdy celá buňka je vyloučena se všemi svými sekrečními produkty vytvořenými a uloženými ve své cytoplazmě.

Jádra zralých vitelocytů mají většinou rozptýlený heterochromatin a velké jadérko. Pokud je přítomno GER, je tato organela redukována ve velikosti a omezena na perinukleární oblast nebo buněčnou periférii. Cytoplazma je vyplněna různým množstvím a typem buněčných inkluzí – tukových kapének, glykogenu a vitelinního materiálu. Vitelinní materiál může být ukládán ve formě homogenních nebo heterogenních vitelinních granulí, velkých vitelinních váčků nebo kapének obalového materiálu (shell globules).

Zralé vitelinní buňky se uvolňují z folikulů do viteloduktů a putují směrem k ootypu, kde se podílí na formování vajíčka a jeho vaječného obalu.

## 1.5 Srovnání zralých vitelocytů – cytoplazmatické inkluze

V této fázi vitelogeneze se vitelocyty zástupců jednotlivých taxonomických skupin tasemnic od sebe nejvíce odlišují. Rozdíly jsou především v typu, množství a chemické povaze cytoplazmatických inkluzí, tedy vitelinního materiálu, glykogenu a tukových kapének.

### 1.5.1 Vitelinní materiál

Vitelinní materiál se u tasemnic vyskytuje v několika formách a může vytvářet:

- shluky kapének obalového materiálu ("shell globule clusters"): Gyrocotyliidea – *Gyrocotyle urna* (Xylander 1987), Amphilinidea – *Amphilina foliacea* (Xylander, 1988), Bothriocephalidea (Świderski a Mokhtar-Maamouri 1974, Korneva 2001, Levron a kol. 2007), Caryophyllidea (Świderski a Mackiewicz 1976, Świderski a kol. a,b, Bruňanská a kol. 2009, Świderski a kol. 2009), Spathebothriidea (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006),
- velké množství granulí heterogenního typu, které mají elektron-densní matrix s malými kulovitými oblastmi nízké hustoty – Proteocephalidea (Bruňanská 1997, Stránská 2005)
- několik velkých vitelinních granulí homogenního typu u Cyclophyllidea *Hymenolepis diminuta* (Świderski a Xylander 2000)

- tři velké vitelinní váčky u Cyclophyllidea – *Catenotaenia pusilla* (Świderski a kol. 2000)
- jeden velký vitelinní váček u Cyclophyllidea *Inermicapsifer madagascariensis*, *Moniezia expansa* a *Mosgovoyia ctenoides* (Świderski 1973, Hai-Yun a kol. 2003, Świderski a kol. 2005)

#### “Shell globule clusters“

Membránou obklopené shluky kapének obalového materiálu, typické pro vitelocyty u zástupců řádů Gyrocotylidea, Amphilinidea, Caryophyllidea, Bothriocephalidea, Spathebothriidea a Trypanorhyncha jsou složeny z různého počtu jednotlivých kapének obalového materiálu (Świderski a Xylander 2000). Uspořádání kapének obalového materiálu (shell globules) je dvojího typu: buď jsou tyto komponenty těsně vedle sebe a tvoří kompaktní struktury, např. u Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus*, *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006), nebo jsou shell globule volně uložené ve světlé (elektron-lucent) matrix jako u Gyrocotylidea – *Gyrocotyle urna* (Xylander 1987), Amphilinidea – *Amphilina foliacea* (Xylander 1988), Spathebothriidea - *Diplocotyle olrikii* (Bruňanská a kol. 2005), Bothriocephalidea – *Bothriocephalus clavibothrium*, *Paraechinophallus japonicus*, *Triaenophorus nodulosus* (Świderski a Mokhtar-Maamouri 1974, Levron a kol. 2007, Korneva 2001)

#### Granule heterogenního typu

Jsou typické pro zralé vitelocyty Proteocephalidea (Bruňanská 1997, Stránská 2005). Byly pozorovány tři stádia formování těchto granulí. První stádium je charakterizováno drobnými sekrečními granuly ve váčcích GA. Ty se postupně zvětšují ve více densní obalové kapénky, které představují druhé vývojové stádium. Třetí stádium je tvořeno kapénkami obalového materiálu definitivního tvaru a velikosti. Je tvořeno elektron-densní matrix, drobnými elektron-světlými vesikuly různé velikosti a jedním či více densními jádry.

#### Vitelinní váčky

Tyto váčky se nachází ve zralých vitelocytech tasemnic řádu Tetraphyllidea a Cyclophyllidea. Stejně jako u “shell globule” začíná jejich tvorba ve formě sekrečních zrn v Golgihho aparátu. Zvětšováním a postupným spojováním vznikají densní vitelinní

granule. V pokročilém stádiu zrání se jednotlivé vitelinní granule spojují do různého počtu vitelinních váčků (Świderski a kol. 2005).

### 1.5.2 Glykogen ( $\alpha$ a $\beta$ forma)

Glykogen se ve zrajících vitelocytech vytváří nejdříve ve formě  $\beta$  částic o průměru 20-30nm. Tmavě zbarvené glykogenové částice jsou snadno rozlišitelné od menších, méně zbarvených ribosomů, zejména při použití Thiéryho metody, specifického testu pro důkaz glykogenu.

Velmi malé množství glykogenu v cytoplazmě bylo pozorováno u Gyrocotyliidea a Amphilinidea (Xylander 1987, 1988), ale také Tetrphyllidea (Mokhtar-Maamouri a Świderski 1976).

Velké množství glykogenu bylo zaznamenáno v cytoplazmě zralých vitelocytů tasemnic z řádu Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus*, *Diplocotyle olrikii* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006).

U Bothriocephalidea *Bothriocephalus clavibothrium* (Świderski a Mokhtar-Maamouri 1974) je množství glykogenu přibližně stejné jako množství lipidů. U Proteocephalidea *Proteocephalus longicollis* (Świderski a kol. 1978) se nachází střední množství glykogenu, který se vyskytuje pouze ve formě  $\beta$  částic.

U Cyclophyllidea *Mosgovoiya ctenoides* a *Catenotaenia pusilla* (Świderski a kol. 2005, Świderski a kol. 1982) nebyl nalezen žádný glykogen.

### 1.5.3 Lipidy (nenasycené a nasycené mastné kyseliny)

Malé tukové kapénky jsou obecně vysoce elektron-densní a osmiofilní (nenasycené) a na elektronogramech jsou černé. Velké tukové kapénky, časté ve zralých vitelocytech, jsou velmi málo osmiofilní a obsahují tedy vysoký podíl nasycených mastných kyselin. Na elektronogramech jsou světlé barvy (Świderski a Xylander 2000). K syntéze lipidů dochází v endoplazmatickém retikulu (Poddubnaya a kol. 2006).

Množství a složení lipidů ve zralých vitelocytech se mezi skupinami tasemnic velmi liší. Největší množství lipidů bylo popsáno u Tetrphyllidea – *Echeneibothrium beauchampi* (Mokhtar-Maamouri a Świderski 1976), kde k ukládání lipidů docházelo nejen v cytoplazmě, ale také v jádře zralých vitelocytů. Ukládání lipidů v jádře je velmi vzácné a dále bylo pozorováno u spathebothriidních zástupců druhů *Cyathocephalus truncatus* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005,



Poddubnaya a kol. 2006). Zralé vitelocyty Gyrocotylidea a Amphilinidea (Xylander 1987, 1988) obsahují v cytoplazmě velké množství lipidů, ale téměř žádný glykogen. Velké množství tukových kapének bylo také pozorováno ve vitelocytech Trypanorhyncha (Świderski a kol. 2006a,b, Świderski a kol. 2007). U Cyclophyllidea (Świderski a kol. 2005) se tukové kapénky nevytvářejí.

Světlé (elektron-lucentní) tukové kapénky se nacházejí v cytoplazmě Amphilinidea a Gyrocotylidea (Xylander 1987, 1988), Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006), Bothriocephalidea – *Bothriocephalus clavibothrium* (Świderski a Mokhtar-Maamouri 1974), Tetraphyllidea – *Echeneibothrium beauchampi* (Mokhtar-Maamouri a Świderski 1976), Trypanorhyncha – *Parachristianella trygonis* a *Progrillotia pastinacae* (Świderski a kol. 2007, Świderski a kol. 2006b), Proteocephalidea – *Proteocephalus longicollis*, *P. percae* a *P. torulosus* (Bruňanská 1997, Stránská 2005).

Tmavé (elektron-densní) tukové kapénky jsou typické pro Trypanorhyncha – *Dolfusiella spinulifera* (Świderski a kol. 2006), Spathebothriidea – *Diplocotyle olrikii* (Bruňanská a kol. 2005), Bothriocephalidea – *Paraechinophallus japonicus* (Levron a kol. 2007). Z tohoto seznamu vyplývá, že složení lipidů, tedy to zda se skládají z vyššího podílu nasycených nebo nenasycených mastných kyselin, se může odlišovat i mezi jednotlivými čeleděmi jednoho řádu. Otázkou zůstává, jaké faktory ovlivňují, který typ lipidů se bude syntetizovat, jaký to má funkční význam a jakou roli by to mohlo hrát v posuzování evolučních vztahů (Świderski a kol. 2006b).

Lipidy slouží především jako energetická rezerva pro vyvíjející se embryo.

## 1.6 Vitelogeneze u Caryophyllidea

Vitelogeneze byla dosud studována u pěti druhů řádu Caryophyllidea:

Čeď: **Caryophyllaeidae** – *Caryophyllaeus laticeps*, *Glaridacris catostomi* a *Wenyonia virilis* (Świderski a kol. 2004a, Świderski a Mackiewicz 1976, Świderski a kol. 2009)

Čeď: **Lytocestidae** – *Atractolytocestus huronensis* a *Khawia armeniaca* (Bruňanská a kol. 2009, Świderski a kol. 2004b),

Vývoj vitelinních buněk probíhá u Caryophyllidea v zásadě způsobem jak bylo popsáno v předchozí kapitole. Rozdíly jsou především v množství a typu cytoplazmatických inkluzí.

### Glykogen a „jaderná vakuola“

Pro tento řád je charakteristická tvorba velkého množství glykogenu, který se syntetizuje a ukládá nejen v cytoplazmě, ale také v jádře zrajících a zralých vitelocytů. U Caryophyllidea se glykogen také objevuje nejdříve ve formě  $\beta$  částic. Jejich množství rychle stoupá zráním buněk. V cytoplazmě a nukleoplazmě se tyto částice nacházejí buď jednotlivě roztroušené nebo tvoří větší shluky označované jako  $\alpha$ -částice nebo rozety glykogenu, které tvoří jakési „ostrůvky“ (Świderski a Mackiewicz 1976, Świderski a kol. 2004, Bruňanská a kol. 2009). Velikost a počet „glykogenových ostrůvků“ se v průběhu vitelogeneze postupně zvětšuje. Pro Caryophyllidea je typické, že k ukládání glykogenu dochází nejen v cytoplazmě, ale také v jádře (Świderski a Macliewicz 1976, Świderski a kol. 2004a,b, Bruňanská a kol. 2009).

V jádře se nukleoplazma uvnitř „glykogenových ostrůvků“ rozpadá a dochází ke splývání jednotlivých glykogenových oblastí dohromady a ke vzniku tzv. jaderné vakuoly (Świderski a Mackiewicz 1976). Tato vakuola vyplňuje většinu vnitřního prostoru jádra a vytlačuje jádérko a chromatin do periférních oblastí přiléhajících k jaderné membráně. Je typická pouze pro vitelocyty karyofylidních tasemnic a u jiných řádů nebyla nalezena (Mackiewicz 1981).

Objev a význam „jaderné vakuoly“ jako zásobárny glykogenu byl poprvé popsán Ortner-Schönbach (1913). „Jaderná vakuola“ byla nalezena u 50 druhů Caryophyllidea, a proto se předpokládá, že je to charakteristický znak pro celou skupinu (Mackiewicz 2003). U karyofylidních tasemnic nedochází k ukládání lipidů v cytoplazmě ani v jádře a glykogenová vakuola tak nahrazuje jejich funkci jako zásobní rezerva pro vyvíjející se vajíčko (Mackiewicz 1981). „Jaderná vakuola“ se nenachází u *Wenyonia virilis* (Świderski a kol. 2009). V nukleoplazmě zralých vitelocytů této tasemnice jsou glykogenové  $\alpha$  a  $\beta$  částice náhodně roztroušené a na některých místech vytváří velmi malé „glykogenové ostrůvky“. Také celkové množství glykogenu v jádře, ale také v cytoplazmě je menší než u ostatních studovaných druhů Caryophyllidea (Świderski a kol. 2009). Podle současných kladistických analýz tvoří tato tasemnice sesterskou skupinu s primitivními tasemnicemi

řádu Gyrocotylidea spíše než s monofyletickou skupinou Caryophyllidea (Oros a kol. 2008).

Ukládání glykogenu v jádře je vysvětlováno tím, že je to adaptace na nedostatek kyslíku v prostředí (bláto, písek), kde se vyskytují jejich mezihostitelé (vodní kroužkovci). Tyto podmínky vyžadují glykogen jako zdroj energie, neboť lipidy zřejmě nemohou být v těchto podmínkách využity (Świderski a kol. 2000).

Přítomnost glykogenu v jádře buněk obratlovců a bezobratlých je vzácná a objevuje se pouze v patologických buňkách, např. v lidských jaterních buňkách při cukrovce a v Ehrlichově tumoru (Świderski a kol. 2004a).

### Lipidy

U Caryophyllidea nebyly dosud tukové kapénky pozorovány, a to ani v cytoplazmě ani v jádře (Mackiewicz 1968, Świderski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2003, Świderski a kol. 2004, Bruňanská a kol. 2009, Świderski a kol. 2009).

### Vitelinní materiál

Vitelinní materiál se tvoří ve formě kapének obalového materiálu (shell globules). Jejich postupným zvětšováním a spojováním vznikají tzv. "shell globule clusters" (shluky kapének obalového materiálu) a u Caryophyllidea se vyskytují oba typy těchto struktur. Kapénky obalového materiálu tvořící kompaktní struktury byly pozorovány u *Wenyonia virilis* (Świderski a kol. 2009), kapénky uložené volně ve světlé matrix byly nalezeny u *Archigetes sieboldi*, *Glaridacris catostomi* a *Khawia armeniaca* (Poddubnaya a kol. 2003, Świderski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2003, Świderski a kol. 2004b). U *Atractolytocesius huronensis* (Bruňanská a kol. 2009) se vyskytují oba typy.

Předkládána magisterská práce navazuje na moji bakalářskou práci s názvem Vitelocyty karyofylidních tasemnic (2007), kde byla studována vitelogeneze *Atractolytocestus huronensis* (čeleď Lytocestidae). Výsledky bakalářské práce byly publikované v mezinárodním časopisu Parasitology Research (Bruňanská a kol. 2009). V rámci Caryophyllidea byly poprvé zjištěny lamelární granule ve vitelocytech *A. huronensis*. Tyto struktury byly popsány pouze u tasemnic řádu Spathebothriidea, a u některých Monogenea (Halton a kol. 1974) a Digenea (Irwin a Threadgold 1970, Colhoun a kol. 1998). Předpokládá se jejich účast v embryogenezi. Jenom další detailní studie vitelogeneze dalších karyofylidů a příbuzných druhů by mohly poskytnout další potřebné údaje pro analýzu vztahů nižších tasemnic, které zůstávají neosvětlené.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo prozkoumat, popsat a porovnat průběh vitelogeneze u zástupců dvou čeledí řádu Caryophyllidea: *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea: Caryophyllaeidae) a *Khawia sinensis* (Caryophyllidea: Lytocestidae)

Dílčí cíle:

- I. Aktualizovat přehled dostupné literatury o vitelocytech tasemnic.
- II. Pomocí světelné mikroskopie zjistit lokalizaci a morfologii vitelinních buněk vybraných karyofylidních tasemnic.
- III. Elektronmikroskopicky prostudovat vitelocyty a jejich vývoj.
- IV. Cytochemicky zjistit přítomnost glykogenu ve vitelocytech.
- V. Zjištěné poznatky porovnat s dostupnými údaji u jiných druhů tasemnic s cílem zjistit specifika vitelogeneze u Caryophyllidea.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

*Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781)

Dospělí jedinci *C. laticeps* byli izolováni pitvou ze střeva hostitele *Abramis brama* z vodní nádrže Rybinsk (Rusko, Yaroslavská provincie). Materiál poskytl L.G. Poddubnaya v r. 2001.

*Khawia sinensis* Hsü, 1935

Dospělí jedinci *K. sinensis* byli získáni pitvou ze střeva hostitele *Cyprinus carpio* z rybníku Bošilec (Česká Republika, Třeboň) v r. 2003. Tasemnice nasbírali dr. Bruňanská a prof. Świderski s technickou pomocí Ing. B. Škoríkové.

### 3.2 Metody

#### 3.2.1 Zpracování materiálu pro světelný a transmisní elektronový mikroskop

Tasemnice *K. sinensis* byly fixovány 2,5% roztokem glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru (pH 7,2) a dospělí jedinci *C. laticeps* byli fixováni 3% roztokem glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru (pH 7,4) po dobu 3 hodin při 4°C. Poté byli jedinci rozděleni příčnými řezy na malé části. Další postupy byly u obou druhů tasemnic stejné. Materiál byl dofixován po dobu 12h při 4°C a poté byly vzorky propláchnuty ve vypíracím roztoku (0,1M kakodylátový pufr, třikrát po 15 minutách). Pro postfixaci byl použit 1% roztok oxidu osmičelého v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Opět následovalo propláchnutí ve vypíracím roztoku (0,1M kakodylátový pufr, třikrát po 15 minutách). Poté byly vzorky odvodněny vzestupnou acetonovou řadou (vzorek prochází řadou roztoků o stoupající koncentraci – 30, 50, 70, 90, 95 a 100%). Následovala infiltrace, při které byly vzorky prosyceny směsí pryskyřice Spurr a acetonu v případě *K. sinensis* a směsí pryskyřice Araldite a acetonu u *C. laticeps* (pryskyřice + aceton v poměru 1:2, 1:1, 2:1 vždy po jedné hodině) a umístěny do exsikátoru (24 hodin). Nakonec byly vzorky zality čistou pryskyřicí Spurr/Araldite do silikonových forem s otvory ve tvaru bločku. Materiál byl polymerován při 60°C po dobu 48 hodin.

Takto připravené bločky byly nejprve krájeny na polotenské řezy pro světelnou mikroskopii a poté na ultratenké pro elektronovou mikroskopii.

### **3.2.2 Příprava a barvení polotenských řezů**

Polotenské řezy byly krájeny pomocí skleněného nože na ultramikrotomu LKB Bromma 8800. Řezy byly barveny toluidinovou modří (1% roztok tetraboritanu sodného a 1% roztok toluidinové modří v poměru 1:1) po dobu 30 s na podložních sklíčkách ohřátých na histologické plotýnce na teplotu 70–90°C. Poté byly nabarvené řezy opláchnuty destilovanou vodou.

### **3.2.3 Příprava a kontrastování ultratenkých řezů**

Ultratenké řezy (tloušťka 60–90 nm) byly krájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu LKB Bromma 8800 a sbírány na měděné nebo zlaté síťky (Thiéryho metoda).

Řezy na síťkách byly nejprve kontrastovány octanem uranylu a následně citrátem olova podle Reynoldse (1963). Na kontrastování se použily Petriho misky s kouskem parafilmu, na který se injekční stříkačkou s jednorázovým filtrem (0,45 µm) nanesly kapky kontrastovacího činidla, roztoku uranyl acetátu. Na kapky se pomocí pinzety přenesly síťky, orientované řezy dolů, a po 15 minutách se síťky opláchly 30% etanolem a osušily se přiložením filtračního papíru.

Poté následovalo kontrastování citrátem olova. Toto kontrastovací činidlo reaguje se vzdušným CO<sub>2</sub>, proto je nutné v Petriho misce minimalizovat kontakt roztoku olova s vzduchem, čehož se docílí přidáním peciček NaOH zalitých vodou. Na kapky roztoku olova byly opět položeny síťky a po 20 minutách byly opláchnuty destilovanou vodou a osušeny filtračním papírem.

### **3.2.4 Thiéryho metoda pro důkaz glykogenu**

Ultratenké řezy na zlatých síťkách byly 20 minut oxidovány 1% roztokem kyseliny perjodové (HClO<sub>4</sub>) v destilované vodě. Poté byly síťky dvakrát opláchnuty destilovanou vodou a ponechány postupně, vždy po 10 minutách, ve třech lázních destilované vody. Následně byly síťky položeny řezy dolů na kapky 1% thiosemicarbazidu (CH<sub>6</sub>N<sub>3</sub>S) rozpuštěného v 10% kyselině octové (CH<sub>3</sub>COOH) (po dobu 24 hodin). Následovalo opláchnutí v několika lázních 10% kyseliny octové a několika lázních destilované vody. Síťky potom byly na 30 minut položeny na kapky

1% roztoku protargolu v destilované vodě a umístěně na dně tmavé krabičky. Nakonec byly sítky opláchnuty destilovanou vodou a usušeny na filtračním papíře.

Polotenské řezy byly prohlíženy světelným mikroskopem Olympus CX 41 a snímky pořízeny digitálním fotoaparátem s použitím programu QuickPHOTO Pro 1.2.

Ultratenké řezy byly prohlíženy pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80 kV. Snímky byly pořízeny pomocí kamery Mega View (Soft Imaging System) a poté upraveny v programech Adobe Photoshop CS3 a CoreIDRAW 12.



## 4 Výsledky

### 4.1 *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781)(Caryophyllaeidae)

Vitelária *C. laticeps* se skládají z velkého počtu vitelinních folikulů kulatého nebo oválného tvaru a různé velikosti (obr. 1). Nachází se v laterálních pásech v medulárním parenchymu. Každý vitelinní folikul (obr. 2, 3) je obalen cytoplasmatickým pouzdem. Obsahuje vitelinní buňky a intersticiální tkáň (obr. 3), která svými výběžky obklopuje jednotlivé vitelinní buňky. Vitelinní buňky se ve folikulech vyskytují v různých stádiích vývoje – nezralé, zrající a zralé vitelocyty (obr. 3). Nezralé vitelocyty se objevují především na okraji folikulu, zatímco pokročilejší stádia zrání jsou blíže středu (obr. 3).

#### 4.1.1 Nezralé vitelocyty

Nezralé vitelocyty (obr. 4) jsou nediferencované buňky goniálního typu, které představují prekurzory zralých vitelocytů. Vykazují vysoký nukleo-cytoplasmatický poměr. Většinou jsou nepravidelného tvaru a v průměru dosahují velikosti 8–9  $\mu\text{m}$ . Velké jádro kulovitého nebo oválného tvaru (5 -7  $\mu\text{m}$ ) je umístěno ve středu buňky a obsahuje zřetelné kulovité elektron-densní jádérko a nepravidelné shluky kondenzovaného chromatinu v nukleoplazmě. Buněčné organely jsou v cytoplazmě zastoupeny několika mitochondriemi a velkým množstvím volných ribosomů.

#### 4.1.2 Zrající vitelocyty

V této fázi dochází jak ke zvětšování jádra, tak ke zvětšování objemu celé buňky (obr. 5). V celé cytoplazmě se nachází velké množství kanálků endoplazmatického retikula, na jehož přítomnosti je závislá tvorba kapének obalového materiálu. V blízkosti Golgiho aparátu se objevují světlé vesikuly, v nichž se nacházejí malá sekreční zrna, která představují počáteční formu elektron-densních kapének obalového materiálu (obr. 6). Tato sekreční zrna se zvětšují a vznikají tak tzv. "shell globules" (kapénky obalového materiálu). Postupným spojováním shell globules vznikají tzv. "shell globules cluster" typické zejména pro zralé vitelocyty (obr. 7). Převážně po obvodu vitelocytu se nacházejí mitochondrie. V blízkosti GER byly nalezeny tukové kapénky světlé barvy (obr. 8).

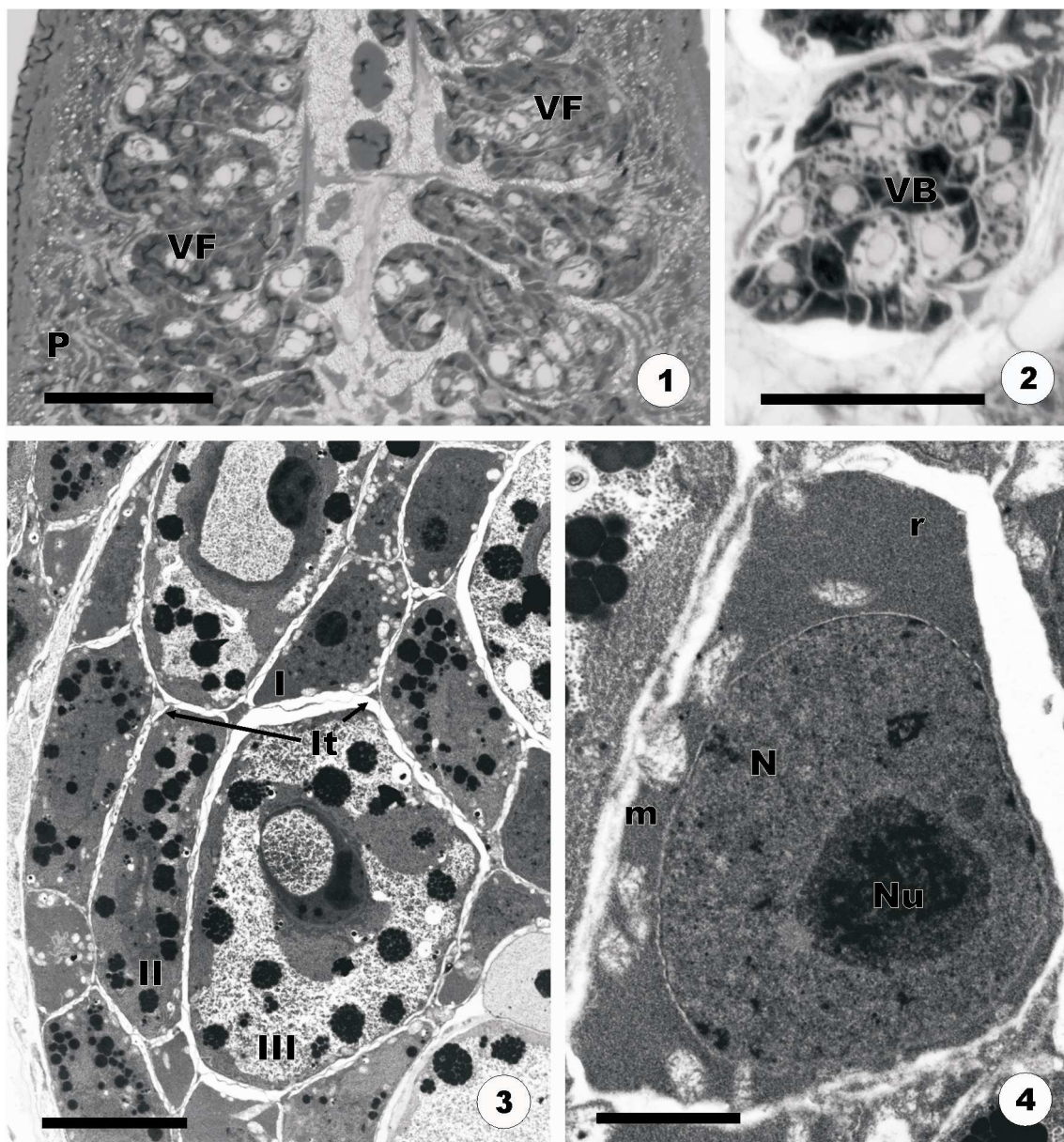
V tomto stádiu také dochází k ukládání glykogenu v cytoplazmě a jádře v podobě  $\alpha$ -rozet glykogenu, což bylo prokázáno Thiéryho metodou (obr. 9). Glykogen je tmavě zbarven a odlišuje se tím od světle zbarvených ribosomů. Glykogenové částice nejdříve vytváří malé shluky, které se postupně zvětšují a spojují do větších glykogenových oblastí. Ve zralém vitelocyty potom zabírají většinu prostoru cytoplazmy a jádra.

#### **4.1.3 Zralé vitelocyty**

Zralé vitelocyty (obr. 10) jsou velké plně diferencované buňky, jejichž jádro je zcela vyplněno glykogenem. Zvětšováním množství glykogenu v jádře dochází k vytlačování jádérka do okrajové části jádra (obr. 11). Glykogen se také ve velkém množství ukládá v cytoplazmě. V cytoplazmě jsou buněčné organely zastoupeny endoplazmatickým retikulem, které je koncentrováno v blízkosti perinukleární oblasti a na okrajích vitelinní buňky. V okrajových částech cytoplazmy se také nachází především "shell globule clusters", které jsou tvořeny velkým množstvím (10-39) shell globules, ale můžeme zde vidět i nově vznikající a jednotlivé "shell globules" v blízkosti GA a GER. "Shell globules" k sobě těsně přiléhají, proto ve shluku nejsou mezi jednotlivými kapénkami světlé prostory a "shell globule cluster" vytváří kompaktní strukturu. V některých zralých vitelocytech bylo pozorováno malé množství tukových kapének (obr. 12). Tukové kapénky byly světlé barvy, obsahují tedy nenasycené mastné kyseliny. U některých zralých vitelocytů ve folikulech dochází k rozpadu jádra (obr. 13).

#### **4.1.4 Vitelodukt**

V epiteliální stěně viteloduktu jsou svým bazálním tělískem zakotveny četné cilie, které vybíhají do lumen viteloduktu (obr. 14). Na příčném řezu bazální částí cilie je 9 párů pravidelně uspořádaných mikrotubul, ve středové části chybí centrální pár mikrotubulů. V cytoplazmě stěny jsou četné kulaté měchýřky (obr. 14). Zralý vitelocyt ve viteloduktu nemá jádro a cytoplazma je bohatá na cytoplazmatické inkluze – glykogen a "shell globule clusters" (obr. 15).

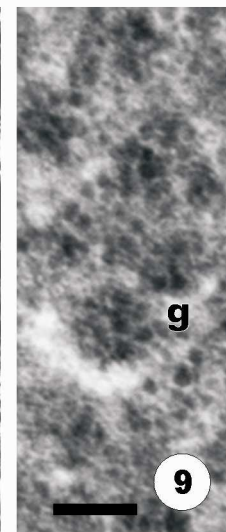
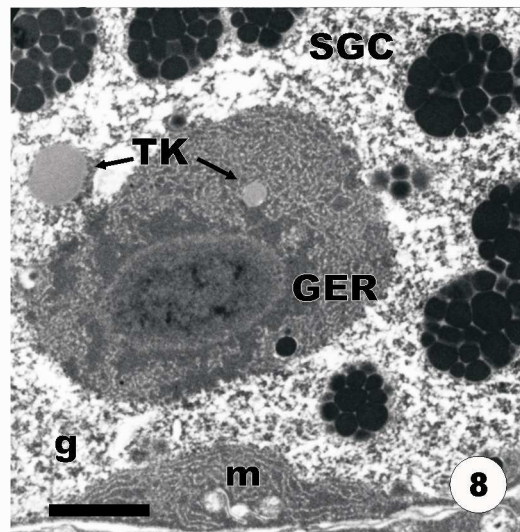
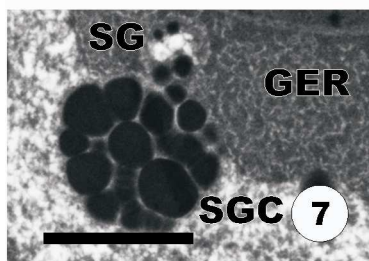
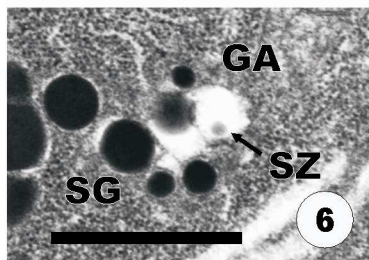
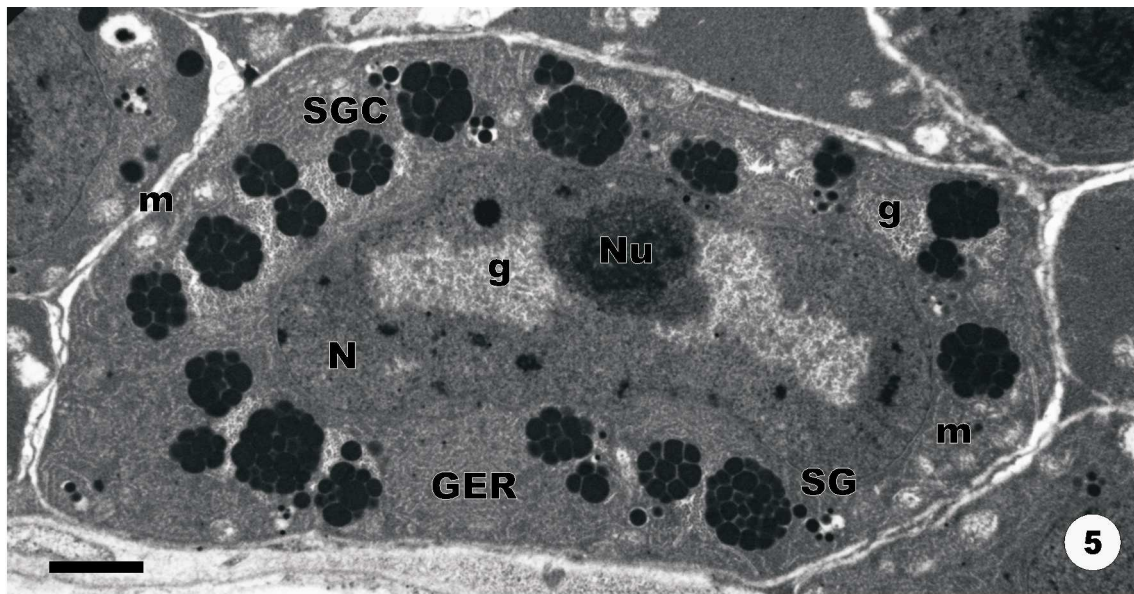


**Obr. 1:** Příčný řez *C. laticeps*. Snímek zachycuje vitelinní folikuly (VF) lokalizované v medulárním parenchymu (P). (měřítko: 100  $\mu$ m)

**Obr. 2:** Vitelinní folikul s vitelinními buňkami (VB). (měřítko: 100  $\mu$ m)

**Obr. 3:** Část vitelinního folikulu s vitelocyty v různém stádiu vývoje. I nezralá, II zrající, III zralá buňka. Mezi vitelocyty se nachází výběžky intersticiální tkáně (It). (měřítko: 10  $\mu$ m)

**Obr. 4:** Nezralá buňka s velkým jádrem (N) a kulovitým densním jadérkem (Nu). Buněčné organely jsou v cytoplasmě zastoupeny mitochondriemi (m) a ribosomy (r) (měřítko: 2  $\mu$ m)



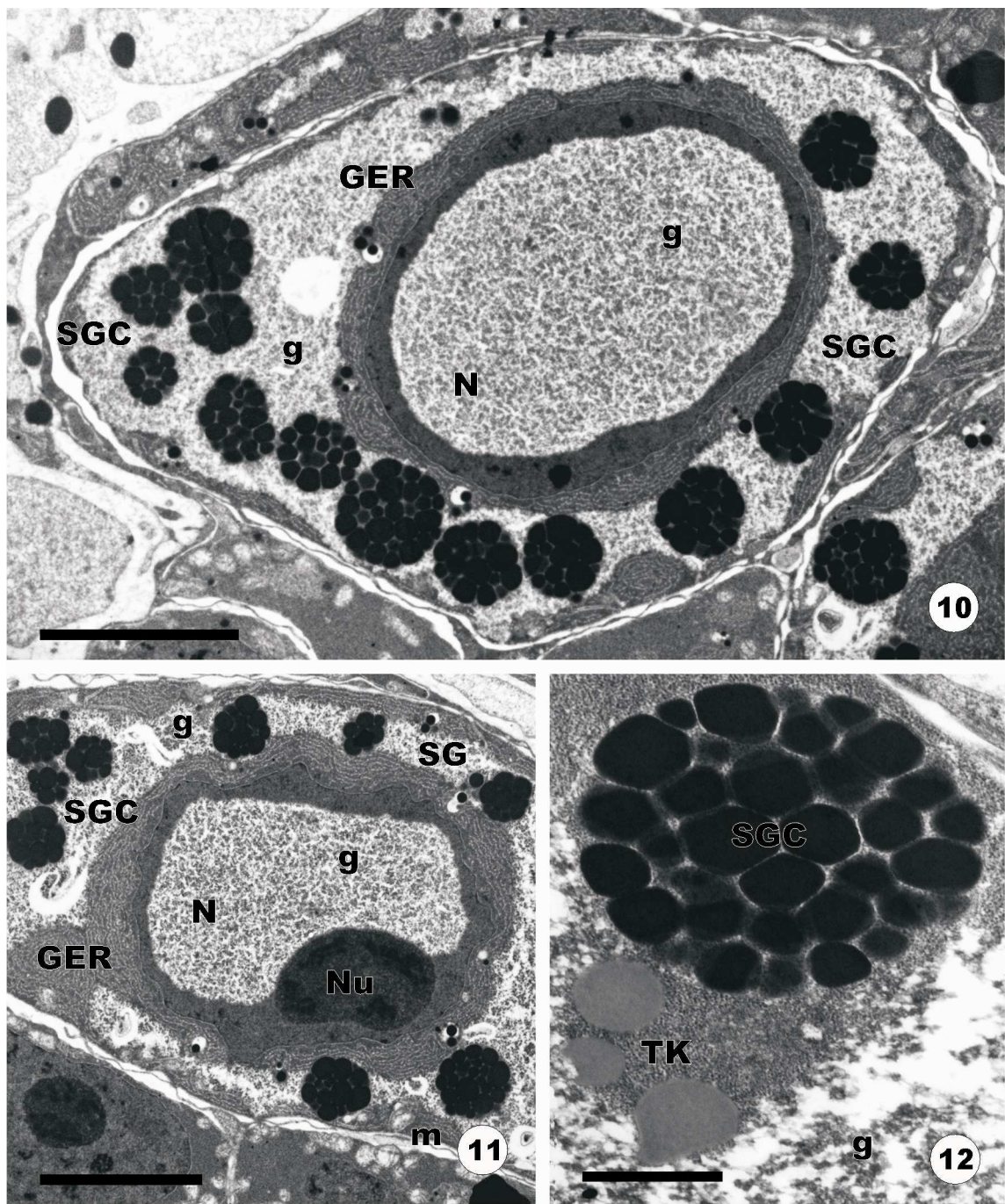
**Obr. 5:** Zrající vitelinní buňka *C. laticeps*. Cytoplazma obsahuje endoplazmatické retikulum (GER), mitochondrie (m) a kapénky obalového materiálu (SG a SGC). V jádře a cytoplazmě se začíná syntetizovat a ukládat glykogen (g). Nu – jádérko (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 6:** Tvorba kapének obalového materiálu (SG) začíná ve formě světlých sekrečních zrn (SZ) v Golgiho aparátu (GA). (měřítko: 1  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 7:** Postupným zvětšováním a spojováním kapének obalového materiálu (SG) vznikají „shell globule clusters“ (SGC). GER – endoplazmatické retikulum (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 8:** V blízkosti endoplazmatického retikula (GER) byly nalezeny tukové kapénky (TK). g – glykogen, m – mitochondrie, SGC – shluky kapének obalového materiálu (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

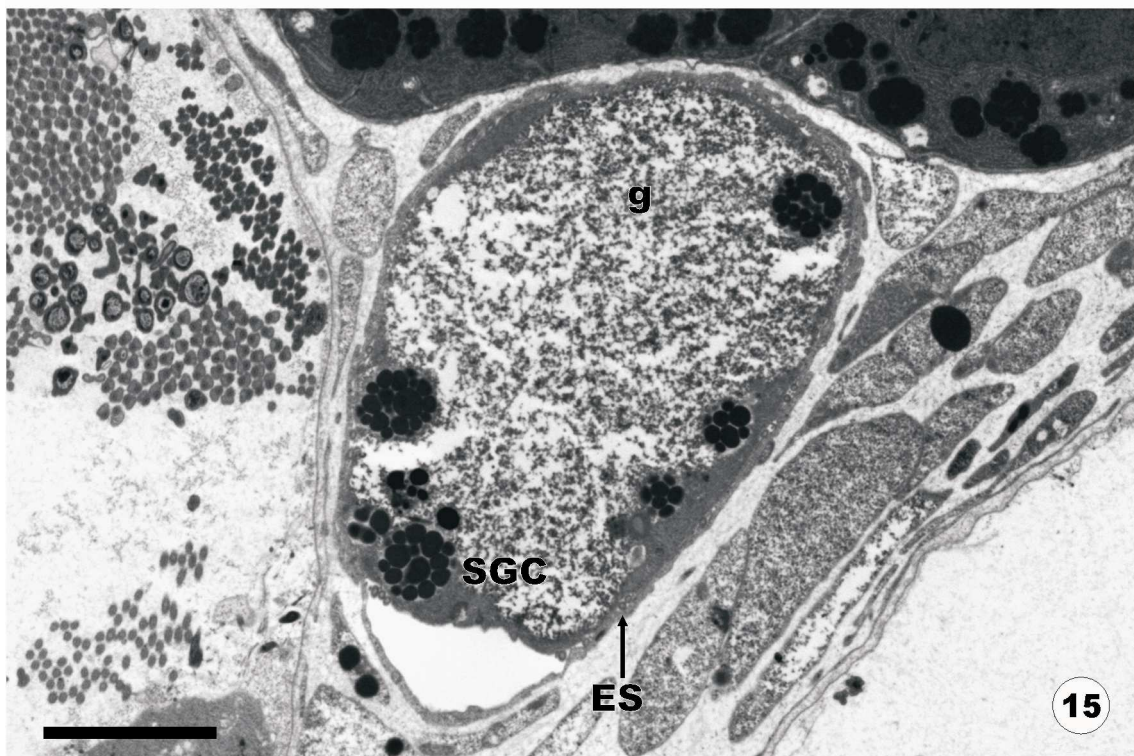
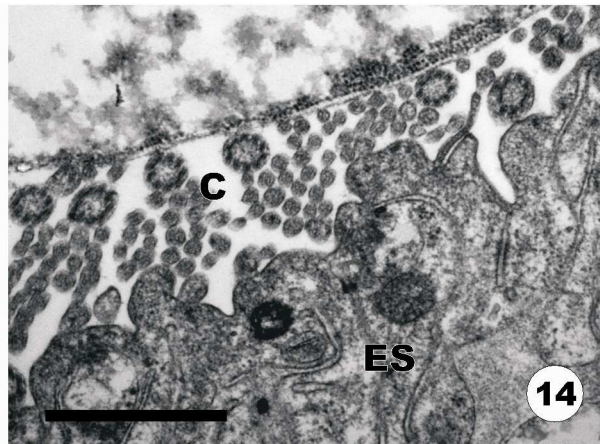
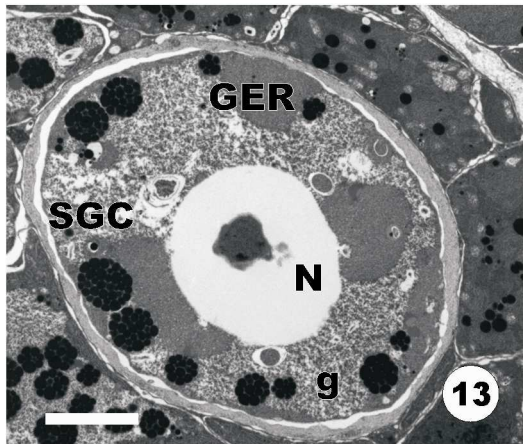
**Obr. 9:** Přítomnost glykogenu (g) potvrzena Thiéryho metodou. (měřítko: 200 nm)



**Obr. 10:** Zralý vitelocyt *C. laticeps*. Jádro a cytoplazma vyplněna glykogenem (g). V cytoplazmě se nachází především "shell globule clusters" (SGC), ale stále dochází i ke tvorbě jednotlivých kapének obalového materiálu (SG). Endoplazmatické retikulum (GER) je omezeno na perinukleární oblast a buněčnou periferii. N – jádro (měřítko: 5  $\mu$ m)

**Obr. 11:** Část zralého vitelocytu. Zvětšováním množství glykogenu (g) v jádře vzniká „jaderná vakuola“. Jadérko (Nu) je vytlačováno k jaderné membráně. GER – endoplazmatické retikulum, m – mitochondrie, N – jádro, SG – kapénky obalového materiálu, SGC – shluky kapének obalového materiálu (měřítko: 5  $\mu$ m)

**Obr. 12:** V cytoplazmě zralého vitelocytu se vyskytují tukové kapénky (TK). g – glykogen, SGC – shluky kapének obalového materiálu (měřítko: 1  $\mu$ m)



**Obr. 13:** Zralý vitelocyt *C. laticeps* z viteloduktu, zde dochází k rozrušování jádra (N) vitelinní buňky. GER – endoplazmatické retikulum, g – glykogen, SGC – shluky kapének obalového materiálu (měřítko: 5  $\mu$ m)

**Obr. 14:** Epiteliální stěna (ES) viteloduktu je pokryta cíliemi (C). Na příčném řezu apikální částí cílie (C) se po obvodu nachází 9 párů mikrotubulů. (měřítko: 1  $\mu$ m)

**Obr. 15:** Zralý vitelocyt ve viteloduktu. Cytoplazma vyplněna glykogenem (g) a “shell globule clusters” (SGC). ES – epitheliální stěna viteloduktu (měřítko: 5  $\mu$ m)

## 4.2 *Khawia sinensis* Hsü, 1935 (Lytocestidae)

Vitelárium *K. sinensis* je tvořeno folikuly umístěnými v podélných laterálních pásech v kortikálním parenchymu (obr. 16). Vitelinní folikuly (obr. 17) jsou oválného, kulovitého nebo nepravidelného tvaru. Každý vitelinní folikul je obklopen cytoplazmatickým pouzdrém (obr. 18) a je složen z vitelinních buněk různého stádia vývoje od nezralých, zrajících až po zralé (obr. 19). Nezralé buňky se nacházejí především na okraji folikuly, zatímco zralé jsou blíže jeho středu.

Kromě vitelinních buněk se ve vitelinním folikulu nachází intersticiální tkáň (obr. 20). Svými výběžky obklopuje jednotlivé vitelinní buňky (obr. 20) a obsahuje velká jádra (obr. 21).

### 4.2.1 Nezralé vitelocyty

Nezralé vitelocyty (obr. 22) dosahují v průměru velikosti 7–9  $\mu\text{m}$ , jsou nepravidelného tvaru a představují nediferencované buňky, které jsou prekurzory zralých vitelocytů. Velké, centrálně umístěné jádro o velikosti 5–7  $\mu\text{m}$  obsahuje zřetelné kulovité jádérko a densní shluky heterochromatinu. Cytoplazma obsahuje několik mitochondrií a četné volné ribosomy. Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát nebyly v tomto stádiu pozorovány.

### 4.2.2 Zrající vitelocyty

V počátečním stádiu zrání (obr. 23) dochází ke zvětšování jaderného povrchu tvorbou četných vchlípenin jaderné membrány. V jádře jsou nepravidelné shluky kondenzovaného chromatinu, roztroušené zejména v periférní oblasti jádra a často přiléhají k jaderné membráně. V cytoplazmě se začínají objevovat podlouhlé kanálky granulárního endoplazmatického retikula (obr. 24) a malé váčky Golgiho aparátu (obr. 24). Golgiho aparát produkuje malé světlé vesikuly (obr. 24), ve kterých se nachází sekreční zrna. Tato zrna jsou prekurzory kapének obalového materiálu. V této fázi vývoje již můžeme vidět jak jednotlivé kapénky obalového materiálu (shell globules – obr. 25) tak pár shluků kapének obalového materiálu (“shell globule clusters” – obr. 25), které vznikají zvětšováním a postupným spojováním kapének obalového materiálu.

V pokročilejším stádiu vývoje (obr. 26) dochází k dalšímu zvětšování jaderného povrchu a také ke zvětšování velikosti celé vitelinní buňky. Uvnitř cytoplazmy narůstá počet buněčných organel (GER a GA) potřebných k tvorbě kapének obalového materiálu. Jednotlivé kapénky obalového materiálu se zvětšují a shlukují a vytváří útvary nazývané “shell globule clusters“, které představují poslední stádium tvorby obalového materiálu. “Shell globule clusters“ jsou tvořeny jednotlivými, těsně na sobě přiléhajícími shell globules a skládají se z 5–13 globulí.

Během zrání dochází také ke tvorbě a ukládání glykogenu v cytoplazmě a jádře (obr. 27). Přítomnost glykogenu byla ověřena Thiéryho metodou (obr. 28). Glykogen se od ribosomů snadno odliší podle tmavého zbarvení. Tukové kapénky nebyly pozorovány.

### **4.2.3 Zralé vitelocyty**

Zralé vitelocyty (obr. 29, 30, 31) jsou oválného nebo kulovitěho tvaru a představují plně diferencované buňky. Zralá žlutková buňka v průměru dosahuje velikosti 17  $\mu\text{m}$  a její jádro měří až 10  $\mu\text{m}$ . Jádro zralého vitelocytu je zcela vyplněno jaderným glykogenem, který vytlačuje jádérko do periférní oblasti přiléhající k jaderné membráně (obr. 29). Také cytoplazma obsahuje velké množství syntetizovaného glykogenu.

Endoplazmatické retikulum je redukováno ve velikosti a je koncentrováno na perinukleární oblast nebo buněčnou periférii. Pro cytoplazmu zralých vitelocytů jsou typické “shell globule clusters“, ale můžeme zde nalézt i jednotlivé kapénky obalového materiálu různých velikostí (obr. 30). U některých zralých vitelocytů docházelo postupně k rozrušování jádra těchto buněk (obr. 31).

### **4.2.4 Vitelodukt**

Vitelodukt je kanálek spojující vitelinní folikuly. Epiteliální stěna (obr. 32) viteloduktu je pokryta ciliemi, které jsou ke stěně ukotveny bazálním tělískem (obr. 32). Na příčném řezu bazální částí má cilie 9 párů pravidelně uspořádaných mikotubul, zatímco v apikální části není přítomen centrální pár mikrotubulů (obr. 33). Cilie vybíhají do lumen viteloduktu.



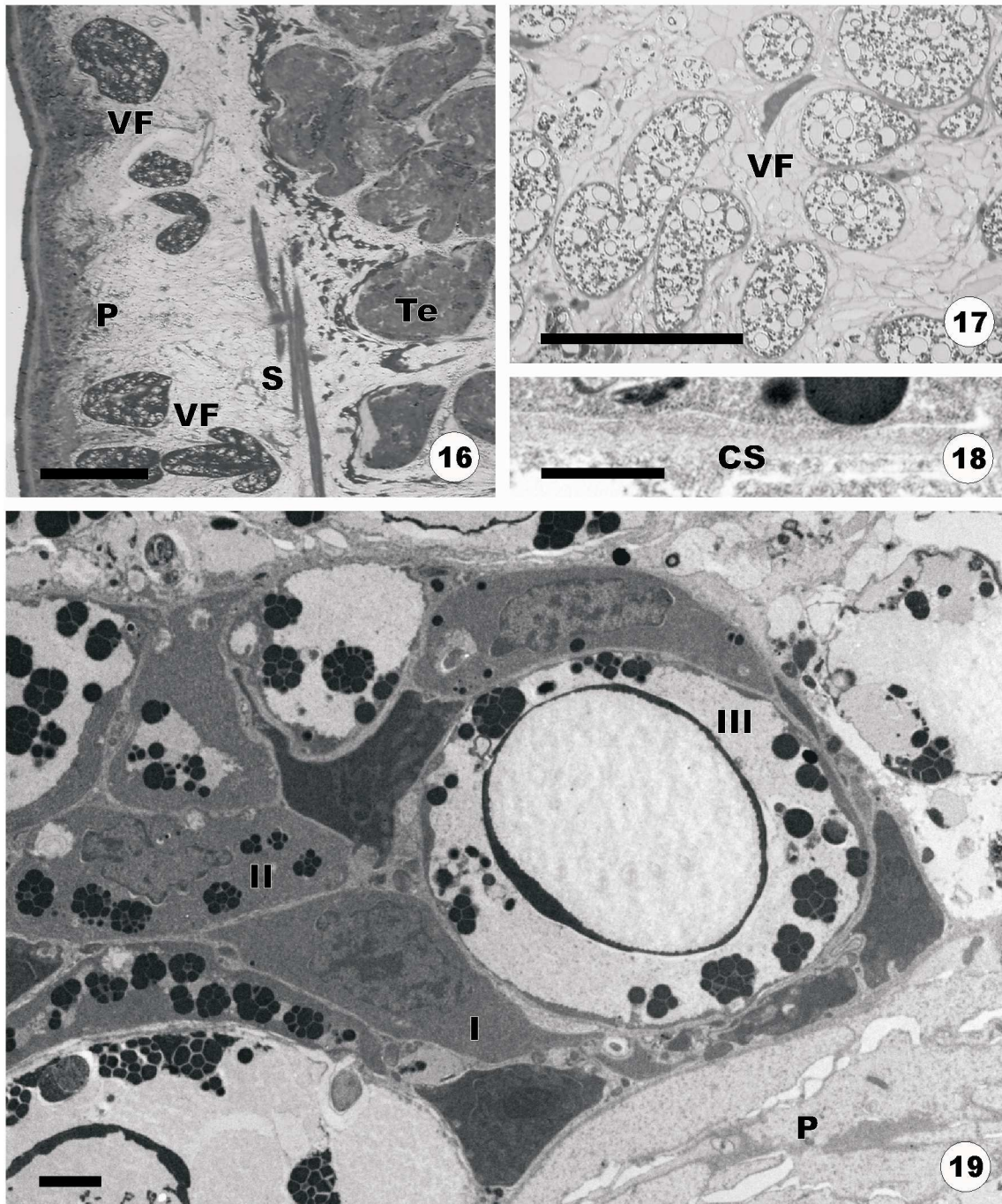
Ve viteloduktu byl pozorován zralý vitelocyt (obr. 34). Tento vitelocyt neměl jádro. Jeho cytoplazma obsahuje glykogen a kapénky obalového materiálu. Nacházejí se zde také lamelární granule (obr. 35). Tyto struktury mají spirálovité uspořádání.

#### **4.2.5 Vitelinní rezervoár**

Vitelinní rezervoár (obr. 36) je ohraničen epiteliální stěnou (obr. 37) a nachází se v něm velké množství zralých vitelocytů. Jeho syncytiální stěna není pokryta řasinkami, jak je patrné z obr. 37. U některých vitelocytů se nachází jádra, zatímco u jiných už došlo k jejich rozpadu. Některé vitelocyty obsahují v cytoplazmě početné densní globule velikosti od 0,9x0,8 do 2x1,8  $\mu\text{m}$  (obr. 38) a také lamelární granule (obr. 36).

#### **4.2.6 Vajíčka**

V lumenu dělohy byla nalezena oválná vajíčka. Vajíčko má rozměry 41x24  $\mu\text{m}$ . Vajíčka jsou obklopena vaječným obalem, na pólech ztlustělým ("adopercular knob") a vyplněným četnými póry. Uvnitř vajíčka se nachází oocyt a zbytky vitelocytů (obr. 39).

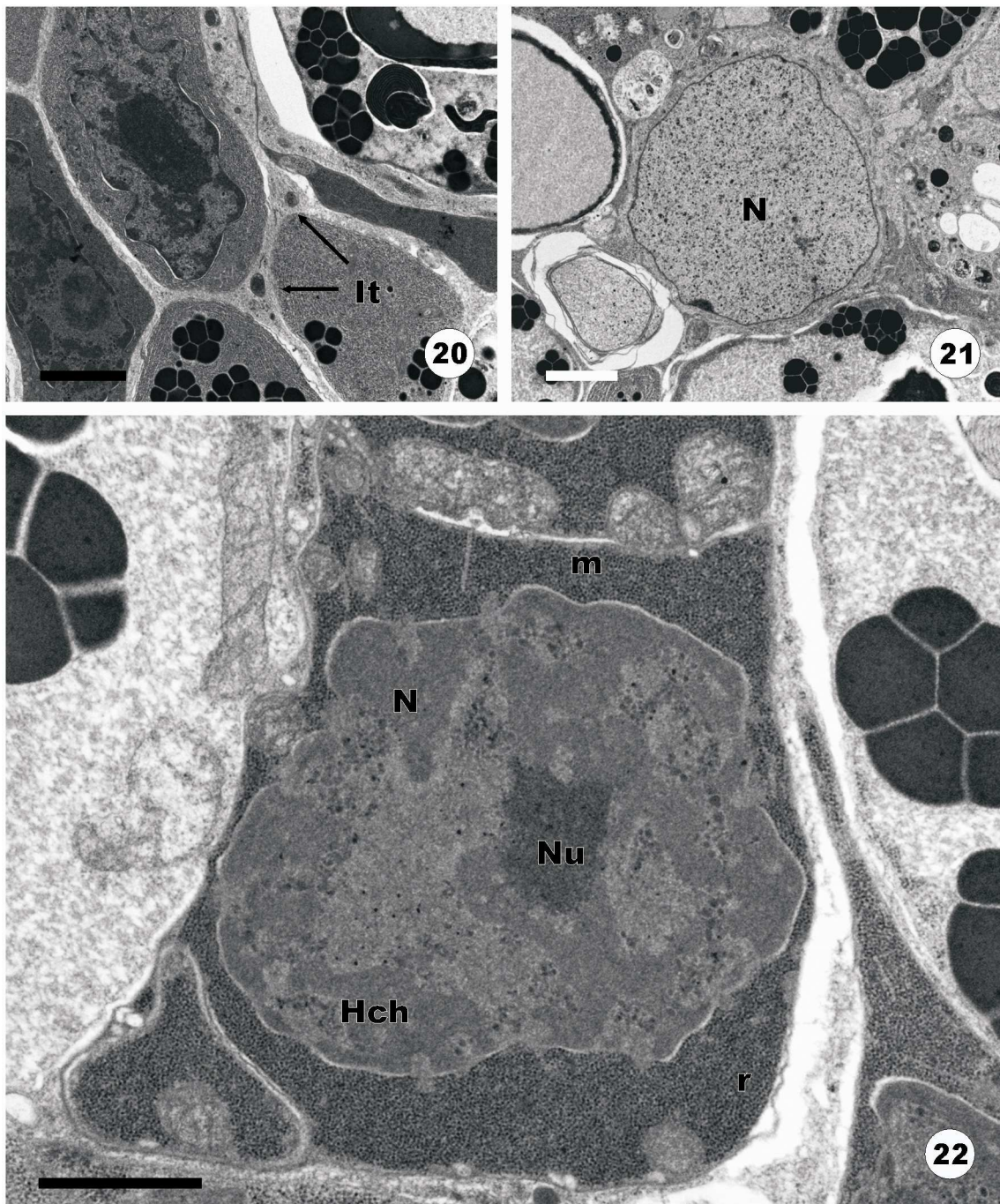


**Obr. 16:** Podélný řez *K. sinensis* zobrazuje jeden ze dvou laterálních pásů tvořený vitelinními folikuly (VF). Vitelinní folikuly jsou umístěny v kortikálním parenchymu (P). Te – varlata, S – podélná svalová vlákna (měřítko: 200  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 17:** Různé tvary vitelinních folikulů (VF). (měřítko: 100  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 18:** Cytoplazmatický obal (CS) vitelinního folikulu. (měřítko 1  $\mu\text{m}$ )

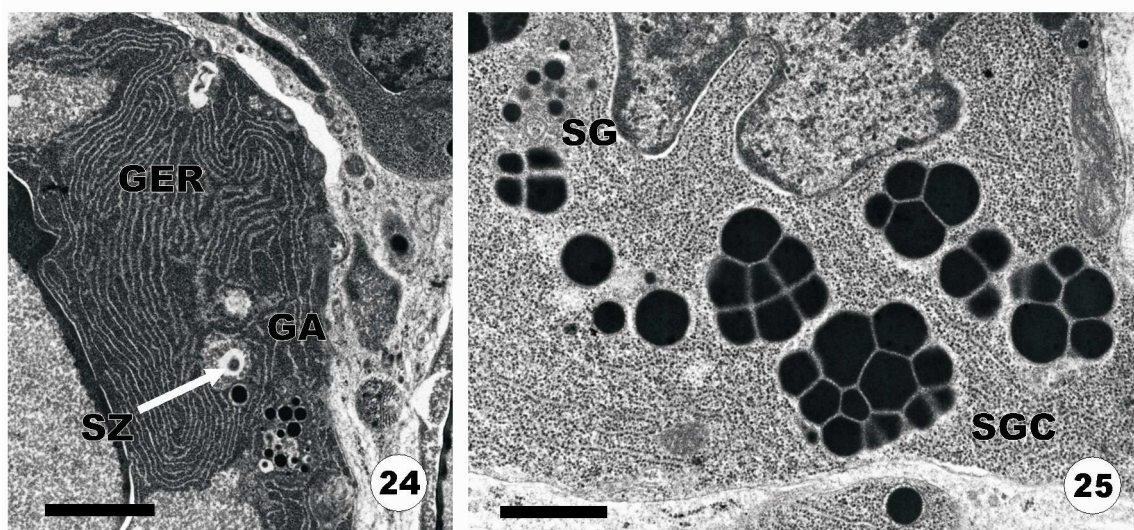
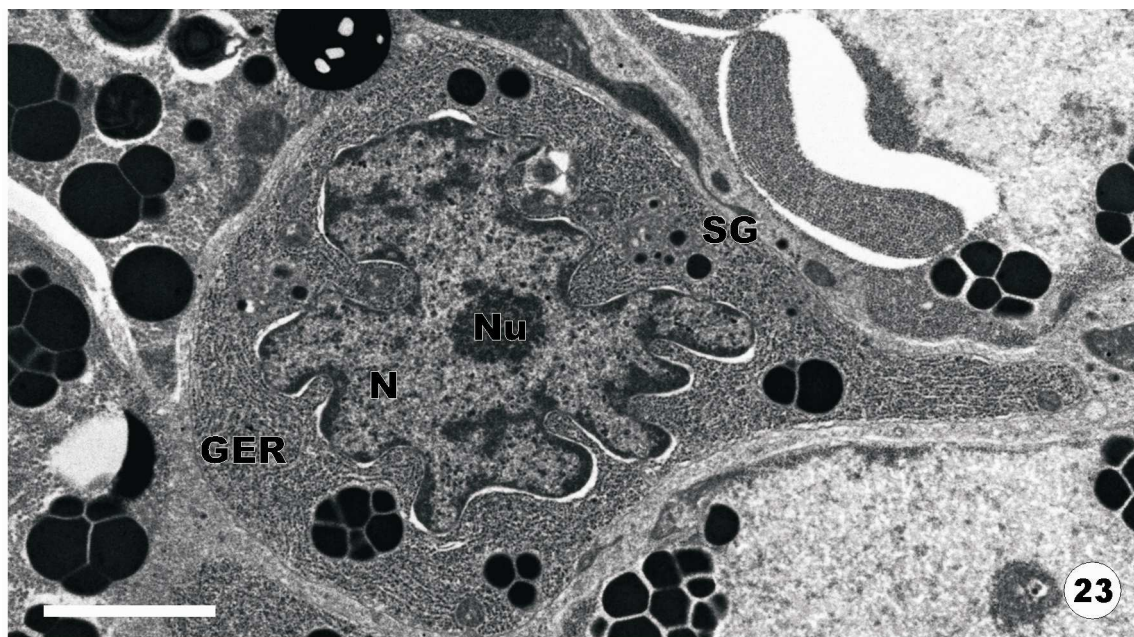
**Obr. 19:** Detail vitelinního folikulu s vitelinními buňkami v různých stádiích vývoje – I nezralé, II zrající a III zralé. P – parenchym (měřítko 2  $\mu\text{m}$ )



**Obr. 20:** Intersticiální tkáň (It) obklopuje jednotlivé vitelinní buňky ve folikulu. (měřítko: 2  $\mu$ m)

**Obr. 21:** Kulovité jádro (N) intersticiální tkáně (It). (měřítko: 2  $\mu$ m)

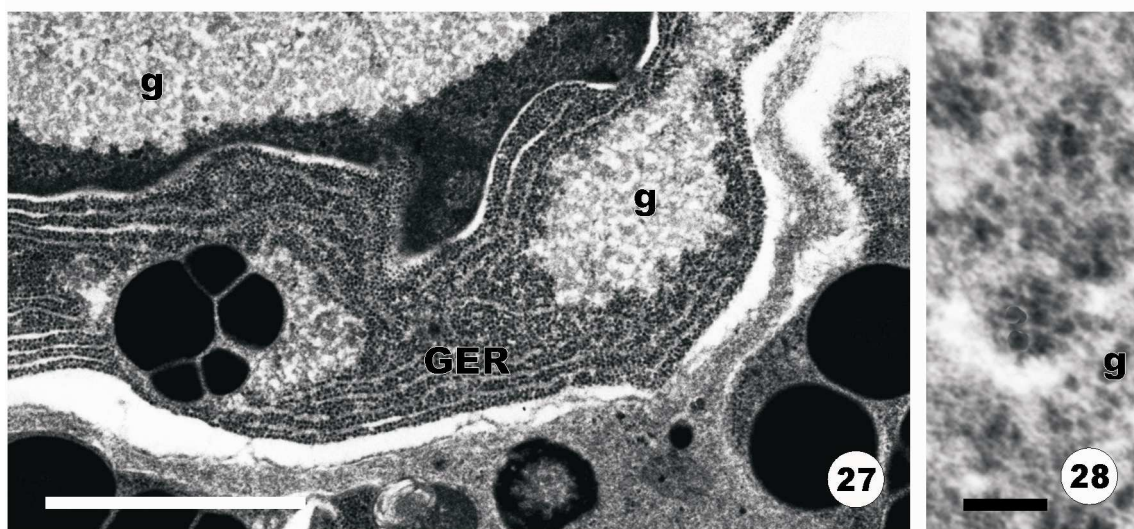
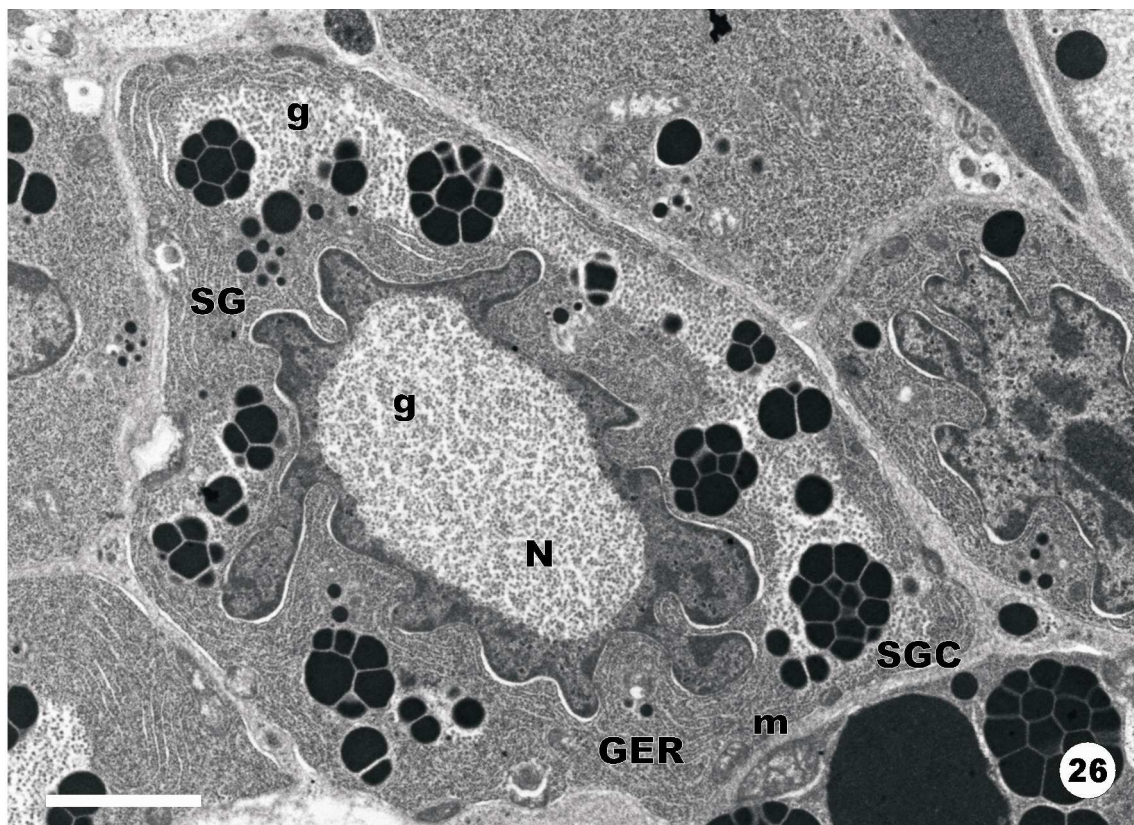
**Obr. 22:** Nezralá buňka s velkým jádrem (N), kulovitým jadérkem (Nu) a shluky heterochromatinu (Hch). V cytoplazmě se nachází mitochondrie (m) a volné ribosomy (r). (měřítko 1  $\mu$ m)



**Obr. 23:** Počáteční stádium zrání vitelinní buňky *K. sinensis*. Zvětšení jaderného povrchu četnými vchlípeninami jaderné membrány. Cytoplazma zcela vyplněna podélnými kanálky granulárního endoplazmatického retikula (GER). Dochází k tvorbě kapének obalového materiálu (SG). N – jádro, Nu – jadérko (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 24:** Světla sekreční zrna (SZ), prekurzory kapének obalového materiálu, vznikají nejdříve v Golgiho aparátu (GA). Další vývoj těchto kapének je vázán na přítomnost endoplazmatického retikula (GER). (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 25:** Postupným zvětšováním a spojováním kapének (SG) vznikají "shell globule clusters" (SGC). (měřítko: 1  $\mu\text{m}$ )

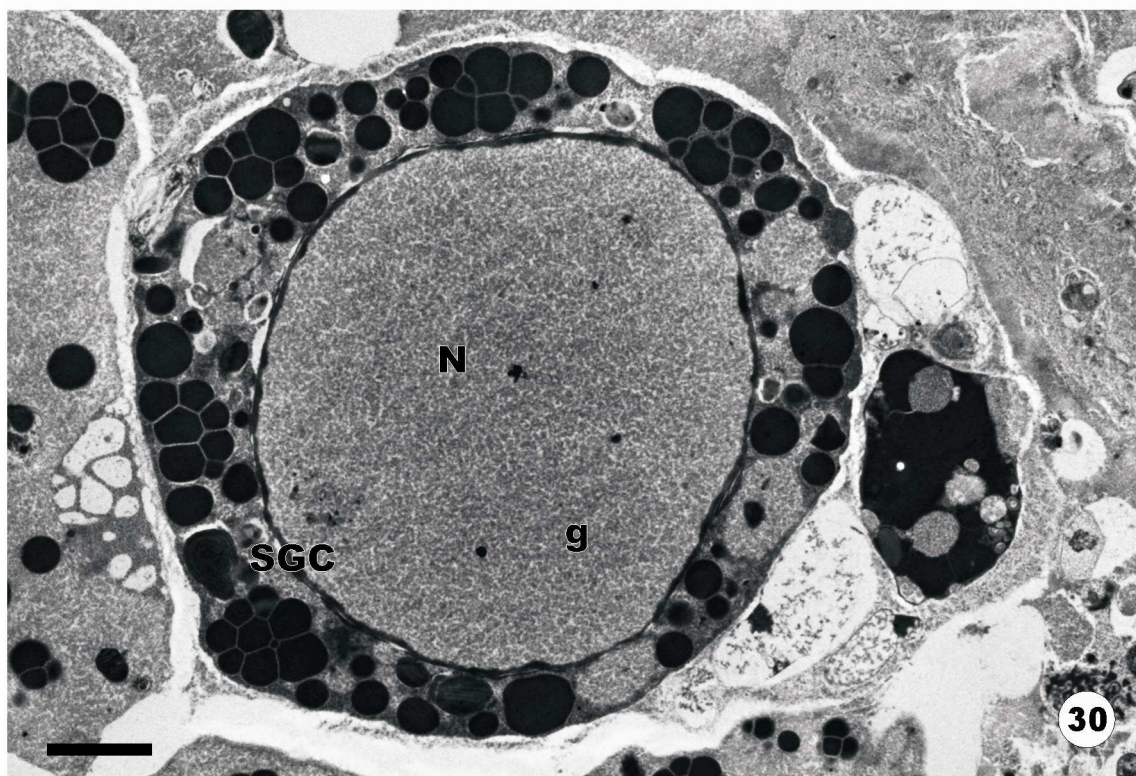


**Obr. 26:** Pokročilé stádium zrající buňky *K. sinensis*. V cytoplasmě pokračuje tvorba kapének obalového materiálu (SG) a "shell globule clusters" (SGC). V cytoplasmě a jádře (N) se syntetizuje a ukládá glykogen (g). Cytoplazma zcela vyplněna endoplazmatickým retikulem (GER).

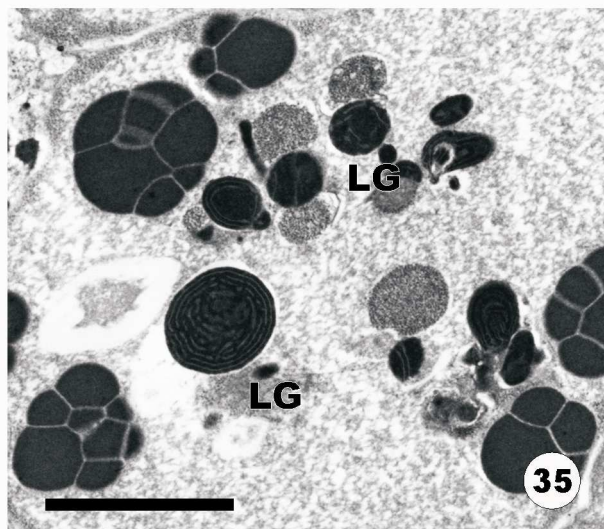
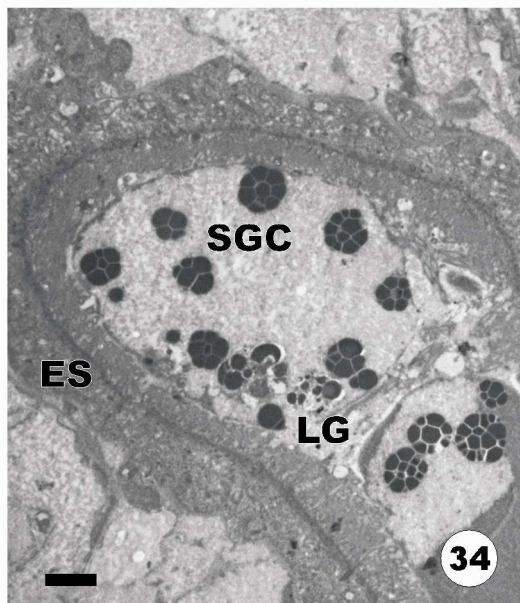
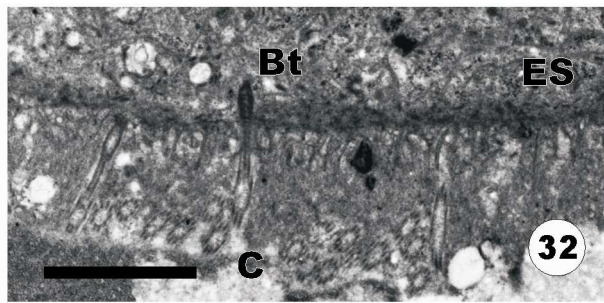
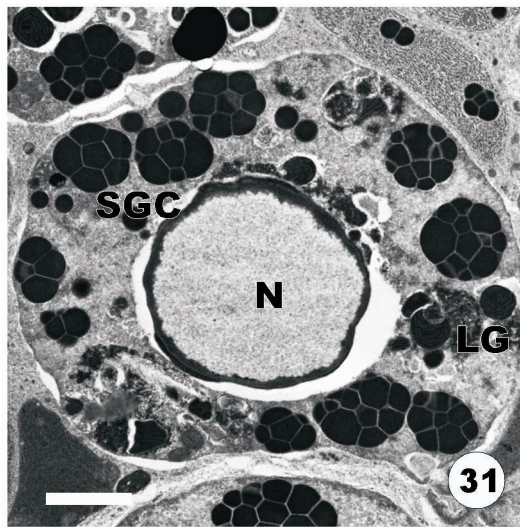
m – mitochondrie (měřítko: 2  $\mu$ m)

**Obr. 27:** Detail jaderného a cytoplazmatického glykogenu (g). GER – endoplazmatické retikulum (měřítko: 2  $\mu$ m)

**Obr. 28:** Přítomnost glykogenu (g) byla prokázána cytochemickou metodou (Thiéryho metoda). Tmavě zbarvený glykogen se liší od světlých nezbarvených ribosomů. (měřítko: 200 nm)



**Obr. 29+30:** Ultrastruktura zralého vitelocytu *K. sinensis*. Ukládáním glykogenu v jádře (N) vzniká tzv. „jaderná vakuola“. Dochází k vytlačování jádérka (Nu) do periférních oblastí přiléhajících k jaderné membráně. Endoplazmatické retikulum (GER) se nachází v perinukleární oblasti a buněčné periférii. Cytoplazma je zcela vyplněna glykogenem (g) a kapénkami obalového materiálu (SGC). (měřítko: 2  $\mu$ m)



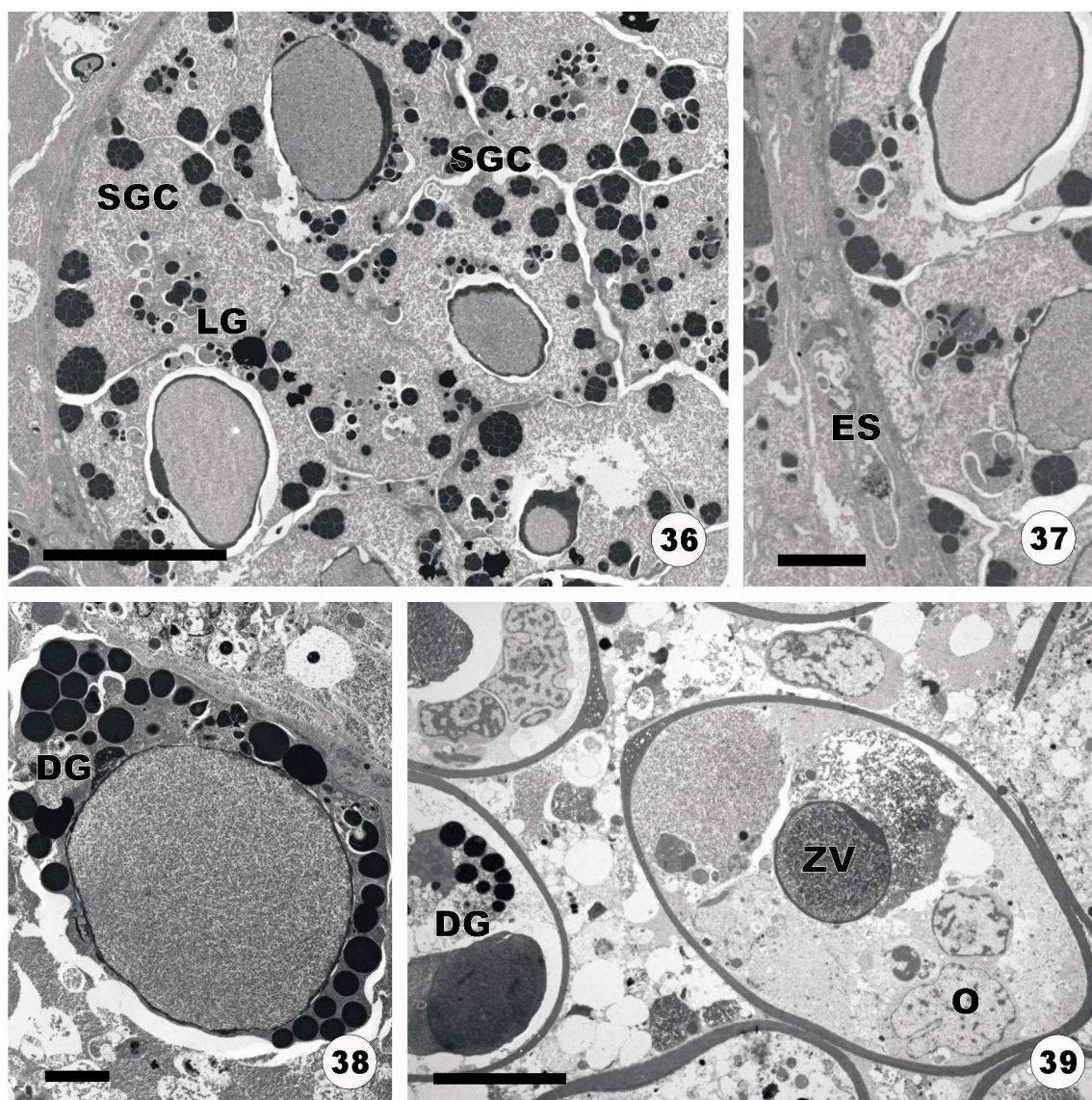
**Obr. 31:** Zralý vitelocyt. Dochází k rozrušování jádra a cytoplazmy V cytoplazmě se objevují lamelární granule (LG). SGC – shluky kapének obalového materiálu (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 32:** Ve stěně viteloduktu jsou bazálním tělískem (Bt) zakotveny četné cílie (C). (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 33:** Průřez apikální částí částí cílie (C). Cílie je tvořena 9ti páry mikrotubulů po obvodu. (měřítko: 500 nm)

**Obr. 34:** Zralý vitelocyt ve viteloduktu. Vitelodukt je tvořen epiteliální stěnou (ES) pokrytou řasinkami. V cytoplazmě zralého vitelocytu se nachází "shell globule clusters" (SGC), glykogen (g) a lamelární granule (LG). (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )

**Obr. 35:** Detail lamelárních granulí (LG) v cytoplazmě vitelinní buňky *K. sinensis*. (měřítko: 2  $\mu\text{m}$ )



**Obr. 36:** Část vitelinního rezervoáru *K. sinensis*. Uvnitř se nachází velké množství zralých vitelocytů. Některé vitelocyty mají jádra, zatímco u jiných už došlo k jejich rozpadu. V cytoplazmě zralých vitelocytů se nachází shluky kapének obalového materiálu (SGC) a lamelární granule (LG). (měřítko: 10  $\mu$ m)

**Obr. 37:** Epiteliální stěna (ES) vitelinního rezervoáru. (měřítko: 10  $\mu$ m)

**Obr. 38:** Zralý vitelocyt s densními globulemi v cytoplazmě (DG). (měřítko: 2  $\mu$ m)

**Obr. 39:** Vajíčko obklopené vaječným obalem, na pólu s operculem. Uvnitř se nachází jeden oocyt (O) a zbytky vitelinních buněk (ZV). DG – densní globule (měřítko: 10  $\mu$ m)



## 5 Diskuze

### 5.1 Porovnání vitelinního systému tasemnic (Cestoda)

Vitelinní systém studovaných druhů tasemnic se skládá z mnoha jednotlivých folikulů, které jsou uspořádány ve dvou laterálních pásech v kortikálním (*K. sinensis*) a v medulárním (*C. laticeps*) parenchymu, což potvrzuje zařazení těchto druhů do příslušných čeledí Lytocestidae a Caryophyllaeidae.

#### Intersticiální tkáň

Ve vitelinních folikulech *K. sinensis* a *C. laticeps* se nachází syncytiální intersticiální tkáň, která svými výběžky obklopuje jednotlivé vitelinní buňky. U *K. sinensis* bylo nalezeno i jádro těchto buněk. Intersticiální tkáň byla dále popsána u většiny řádů tasemnic Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006), Bothriocephalidea – *Triaenophorus nodulosus* a *Paraechinophallus japonicus* (Korneva 2001, Levron a kol. 2007), Trypanorhyncha – *Dolfusiella spinulifera*, *Progrillotia pastinacae* a *Parachristianella trygonis* (Świderski a kol. 2006a, b, Świderski a kol. 2007), Proteocephalidea – *Gangesia parasiluri*, *Proteocephalus percae* a *Proteocephalus torulosus* (Korneva 2001, Stránská 2005), Nippotaeniidea – *Nippotaenia mogurndae* (Korneva 2002). Z tohoto výčtu vyplývá, že intersticiální tkáň se bude s největší pravděpodobností vyskytovat i u dalších druhů různých řádů a tento znak by v kladistických analýzách systematiky tasemnic neměl význam.

#### Vitelodukt

Zralé vitelocyty nalezené ve viteloduktu *K. sinensis* a *C. laticeps* neobsahovaly jádra těchto buněk stejně jako u *Amphilina foliacea* (Xylander 1988). Naopak u Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus* a *Diplocotyle olrikii* (Bruňanská a kol. 2005), Bothriocephalidea – *Bothriocephalus clavibothrium* a *Paraechinophallus japonicus* (Mokhtar-Maamouri a Świderski 1976, Levron a kol. 2007), Proteocephalidea – *Proteocephalus percae* a *Proteocephalus torulosus* (Stránská 2005) bylo jádro pozorováno.

## 5.2 Porovnání průběhu vitelogeneze tasemnic (Cestoda)

Vitelogeneze u *K. sinensis* a *C. laticeps* probíhá stejným způsobem jak bylo popsáno pro ostatní dosud studované zástupce řádu Caryophyllidea (Mackiewicz 1968, Świderski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2003, Świderski a kol. 2004a, b, Bruňanská a kol. 2009, Świderski a kol. 2009) a podobá se tomuto procesu dříve popsanému u dvou primitivních řádů Amphilinidea a Gyrocotylidea (Xylander 1987, 1988) a řádů nižších eucestod – Spathebothriidea (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006), Bothriocephalidea (Świderski a Mokhtar 1974, Korneva 2001, Levron a kol. 2007) a Trypanorhyncha (Świderski a kol. 2006a, 2006b, Świderski a kol. 2007). Rozdíly jsou především v množství a typu cytoplazmatických inkluzí, a v místě, kde se u dané tasemnice ukládají.

Průběh vitelogeneze se odlišuje od vitelogeneze tasemnic odvozených řádů Cyclophyllidea, Proteocephalidea a Tetraphyllidea. U těchto řádů se nenachází vitelinní materiál ve formě "shell globule clusters", které jsou typické pro vitelocyty bazálních řádů tasemnic.

## 5.3 Porovnání ultrastruktury zralých vitelocytů - cytoplazmatické inkluze

### Glykogen

U *K. sinensis* a *C. laticeps* se v cytoplazmě a jádře zrajících a zralých vitelocytů ukládá velké množství glykogenu, což je odlišuje od monozoických tasemnic řádu Gyrocotylidea a Amphilinidea (Xylander 1987, 1988), u kterých se v cytoplazmě nachází velmi málo glykogenu. U obou studovaných karyofylidních druhů se v jádře nachází charakteristický znak Caryophyllidea, tzv. „jaderná vakuola“. Tato vakuola nebyla nalezena u karyofylidní tasemnice *Wenyonia virilis* (Świderski a kol. 2009). Nepřítomnost této struktury by mohla podpořit zjištění, že *W. virilis* tvoří sesterskou skupinu s Gyrocotylidea a je tedy velmi bazální (Oros a kol. 2008). Jiným vysvětlením by mohlo být, že *Wenyonia* je jedna z mála karyofylidních tasemnic, u které vajíčko dokočuje svůj vývoj v děloze (Świderski a Xylander 2000), a z toho důvodu tedy nepotřebuje tak velké množství zásobních látek.

### Lamelární granule

U *K. sinensis* byly v cytoplazmě zralých buněk ve vitelinních folikulech, ve vitelinním rezervoáru i ve viteloduktu nalezeny lamelární granule, zatímco u *C. laticeps* pozorovány nebyly. Tyto struktury byly u tasemnic poprvé objeveny v cytoplazmě zralých vitelocytů *Cyathocephalus truncatus* (Bruňanská a kol. 2005). Dále byly popsány u dalších druhů Spathebothriidea – *Diplocotyle olrikii* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006) a karyofylidní tasemnice – *Atractolytocestus huronensis*, která patří také do čeledi Lytocestidae (Bruňanská a kol. 2009).

Výskyt těchto typů granulí ve vitelinních buňkách různých skupin Platyhelminthů je vysvětlován buď jako dodatečný zdroj výživy nebo jako reziduální tělíska (Irwin a Threadgold 1970, Erasmus 1973). Nález těchto struktur může také souviset s rozpadem GER a začátkem glykogeneze (Halton a kol. 1974). U jiných druhů tasemnic tato struktura zatím pozorována nebyla. Přítomnost tohoto znaku naznačuje blízkou příbuznost řádů Caryophyllidea a Spathebothriidea.

### Lipidy

U *C. laticeps* bylo v cytoplazmě zrajících a zralých vitelocytů pozorováno malé množství tukových kapének. Tukové kapénky byly elektron-lucentní, což znamená, že obsahují vysoký podíl nasycených mastných kyselin (Świdorski a Xylander 2000). U *K. sinensis* tukové kapénky nalezeny nebyly. U řádu Caryophyllidea nebyly dosud lipidy nalezeny ani v cytoplazmě ani v jádře (Mackiewicz 1968, Świdorski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2003, Świdorski a kol. 2004, Bruňanská a kol. 2009, Świdorski a kol. 2009). Světlé tukové kapénky byly nalezeny v cytoplazmě Amphilinidea a Gyrocotylidea (Xylander 1987, 1988), Spathebothriidea (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006), Bothriocephalidea (Świdorski a Mokhtar-Maamouri 1974), Tetraphyllidea (Mokhtar-Maamouri a Świdorski 1976), Trypanorhyncha (Świdorski a kol. 2007), (Świdorski a kol. 2006b), Proteocephalidea (Bruňanská 1997, Stránská 2005).

### “Shell globule clusters“

“Shell globule clusters“ obou studovaných druhů jsou složeny z jednotlivých shell globules různého počtu a různé velikosti. U obou druhů tvoří jednotlivé shell globules kompaktní struktury jako u dalšího zástupce řádu Caryophyllidea – *Wenyonia virilis*

(Świderski a kol. 2009) a u Spathebothriidea – *Cyathocephalus truncatus* a *Didymobothrium rudolphii* (Bruňanská a kol. 2005, Poddubnaya a kol. 2006).

U *C. laticeps* jsou složeny z většího počtu (10-39), stejně jako u Spathebothriidea – *Didymobothrium rudolphii* (8-45) (Poddubnaya a kol. 2005), než u *K. sinensis* (5-13).

Dalším typem jsou shell globules volně uložené ve světlé matrix, které jsou typické pro Gyrocotylidea a Amphilinidea (Xylander 1987, 1988), Caryophyllidea – *Archigetes sieboldi*, *Glaridacris catostomi* a *Khawia armeniaca* (Świderski a Mackiewicz 1976, Poddubnaya a kol. 2003, Świderski a kol. 2004), Spathebothriidea – *Diplocotyle olrikii* (Bruňanská a kol. 2005), Bothriocephalidea – *Paraechinophallus japonicus* (Levron a kol. 2007). U *Atractolytocestus huronensis* se nachází oba typy (Świderski a kol. 2009).

Přítomnost struktur, které byly nalezené u studovaných druhů řádu Caryophyllidea a zároveň byly popsány u jiných řádů a vykazovaly nejvíce podobností jsem shrnula v tabulce č. 1 (Charakteristiky cytoplazmatických inkluzí vitelocytů bazálních tasemnic).

Z tabulky č. 1 vyplývá, že nejvíce podobných znaků na ultrastrukturální úrovni mají vitelocyty Caryophyllidea a Spathebothriidea. Podle molekulárních analýz (Waeschenbach a kol. 2007) jsou ale Caryophyllidea nejvíce příbuzní se řádem Diphyllobothriidea. U tohoto řádu nebyla ultrastruktura vitelogeneze studována, a proto jsem tento řád nemohla porovnat se řádem Caryophyllidea.

Tabulka č.1 Charakteristiky cytoplazmatických inkluzí bazálních tasemnic						
Řád/Čeled'	Druh	Uspořádání SGC	Počet globulí v SGC	Lamelární granule	Lipidy	Autor
<b>Gyrocotylidea</b>	<i>G. urna</i>	volně	do 10	ne	světlé	Xylander 1987
<b>Caryophyllidea</b>						
Caryophyllaeidae	<i>A. sieboldi</i>	volně	do 10	ne	žádné	Poddubnaya a kol. 2003
Caryophyllaeidae	<i>C. laticeps</i>	kompaktní	10–39	ne	světlé	současná práce
Caryophyllaeidae	<i>G. catostomi</i>	volně	do 10	ne	žádné	Świderski a Mackiewicz 1976
Caryophyllaeidae	<i>W. vinitis</i>	kompaktní	10–25	ne	žádné	Świderski a kol. 2009
Lytocestidae	<i>A. huronensis</i>	oba typy	do 10	ano	žádné	Bruňanská a kol. 2009
Lytocestidae	<i>K. armeniaca</i>	volně	6–23	ne	žádné	Świderski a kol. 2004b
Lytocestidae	<i>K. sinensis</i>	kompaktní	5–13	ano	žádné	současná práce
<b>Spathebothriidea</b>						
	<i>C. truncatus</i>	kompaktní	4–20	ano	světlé	Bruňanská a kol. 2005
	<i>D. rudolphii</i>	kompaktní	8–45	ano	světlé i tmavé	Poddubnaya a kol. 2006
	<i>D. olrikii</i>	volně	3–20	ano	tmavé	Bruňanská a kol. 2005
SGC - "shell globule clusters" (kapénky obalového materiálu)						

## 6 Závěr

1. U dvou druhů tasemnic dvou odlišných čeledí (Lytocestidae a Caryophyllaeidae) řádu Caryophyllidea byla na světelně-mikroskopické úrovni popsána lokalizace vitelinních buněk a pomocí transmisního elektronového mikroskopu prostudována jejich ultrastruktura a průběh vitelogeneze.
2. Vývoj vitelinních buněk tasemnic *C. laticeps* a *K. sinensis* probíhá v základních rysech stejným způsobem jako u ostatních dosud studovaných zástupců řádu Caryophyllidea.
3. Studie potvrdila, že tyto dvě čeledi se odlišují přítomností lamelární granule, která byla nalezena u *Khawia sinensis* a *Atractolytocestus huronensis* (Lytocestidae), ale nebyla dosud nalezena u žádné studované tasemnice čeledi Caryophyllaeidae.
4. U *Caryophyllaeus laticeps* byly poprvé v rámci řádu Caryophyllidea pozorovány tukové kapénky, které jsou pro tento řád netypické.
5. Nejvíce podobných znaků vitelogeneze a ultrastruktury vitelinních buněk vykazuje řád Caryophyllidea s řádem Spathebothriidea.
6. U žádného zástupce dalších dvou čeledí Caryophyllidea – Balanotaeniidae a Capingentidae nebyla ultrastruktura vitelogeneze studována a je proto potřebné získat údaje o jejich ultrastruktuře vitelocytů se zaměřením na přítomnost lamelárních granulí a “shell globule clusters”.
7. Další studium ultrastruktury vitelogeneze by mělo být zaměřeno na řád Diphyllbothriidea, který podle molekulárních analýz tvoří sesterskou skupinu s Caryophyllidea, a mohl by tedy s nimi sdílet některé společné znaky.

## 7 Literatura

- Beveridge I. (2001):** The use of life-cycle characters in studies of the evolution of cestodes. In: D.T.J. Littlewood and R.A. Bray (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis, London, pp. 250-254
- Brooks D.R., Hoberg E.P., Weeks P.J. (1991):** Preliminary phylogenetic systematic analysis of the major lineages of the Eucestoda (Platyhelminthes: Cercomeria). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 104: 651-668
- Bruňanská M. (1997):** *Proteocephalus exiguus* La Rue, 1911 (Cestoda, Proteocephalidae): ultrastructure of the vitelline cells. *Helminthologia* 34: 9-13
- Bruňanská M., Poddubnaya L.G., Dezfuli B.S. (2005):** Vitellogenesis in two spathebothriidean cestodes. *Parasitology Research* 96: 390-397
- Bruňanská M., Drobníková P., Oros M. (2009):** Vitellogenesis in the cestode *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1985 (Caryophyllidea: Lytocestidae). *Parasitology Research* 105: 647-654
- Caira J.N., Littlewood D.T. (2001):** Worms, Platyhelminthes. In: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, vol 5. Academic, New York, pp. 863-899
- Colhoun L.M., Fairweather I., Brennan G.P. (1998):** Observations on the mechanism of eggshell formation in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 116: 555-567
- Chervy L. (2009):** Unified terminology for cestode microtriches: a proposal from the International Workshops on Cestode Systematics in 2002-2008. *Folia Parasitologica*. 56: 199-230
- Erasmus D.A. (1973):** A comparative study of the reproductive system of mature and „unisexual“ female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67: 165-183
- Halton D.W., Stranock S.D., Hardcastle A. (1974):** Vitelline cell development in monogenean parasites. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 45: 45-61
- Hai-Yun L., Brennan G.P., Halton D.W. (2003):** Ultrastructure of vitellogenesis in cestode *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Acta Zoologica Sinica* 49: 256-261
- 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. *Journal of Parasitology* 83: 1128-1147

- Irwin S.W.B, Threadgold L.T. (1970):** Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. VIII. The development of the vitelline cells. *Experimental Parasitology* 28: 399-411
- Justine J.L. (1998):** Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *The Journal of Parasitology* 84: 385-408
- Khalil L.F., Jones A., Bray R.A. (1994):** Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. Wallingford: CAB International, Wallingford, 751 pp.
- Korneva J.V. (2001):** Vitellogenesis and capsule formation during embryogenesis in *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda, Pseudophyllidea, Triaenophoridae). *Zoologicheskij Zhurnal* 80: 1422-1428
- Korneva J.V., Davydov V.G. (2001):** The female reproductive system in the proteocephalidean cestode *Gangesia parasiluri* (Cestoda, Proteocephalidea, Proteocephalidae). *Zoologicheskij Zhurnal* 80: 131-144
- Korneva J.V. (2002):** Fine structure of reproductive system in *Nippotaenia mogurndae* (Cestoda, Nippotaeniidea). *Zoologicheskij Zhurnal* 81: 266-275
- Levron C., Poddubnaya L.G., Kuchta R., Freeman M., Scholz T. (2007):** Vitellogenesis and vitelline system in the pseudophyllidean tapeworm *Paraechinophallus japonicus*: ultrastructural and cytochemical studies. *Folia Parasitologica* 54: 43-50
- Mackiewicz J.S. (1968):** Vitellogenesis and eggshell formation in *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas) and *Caryophyllaeides fennica* (Schneider) (Cestoidea : Caryophyllaeidea). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 30: 18-32
- Mackiewicz J.S. (1972):** Caryophyllidea (Cestoidea): A Review. *Experimental Parasitology* 31: 417-512
- Mackiewicz J.S. (1981):** Caryophyllidea (Cestoidea): evolution and classification. *Advances in Parasitology* 19: 140-206
- Mokhtar-Maamouri F., Świdorski Z. (1976):** Vitellogenese chez *Echeneibothrium beauchampi* Euzet 1959 (Cestoda: Tetrphyllidea, Phyllobothriidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 50: 293-302
- Olson P.D., Littlewood D.T.J., Bray R.A., Mariaux J. (2001):** Interrelationship and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 443-467



- Olson P.D., Poddubnaya L.G., Littlewood D.T.J., Scholz T. (2008):** On the position of *Archigetes* and its bearing on the early evolution of the tapeworms. *Journal of Parasitology* 94: 898-904
- Oros M., Hanzelová V., Scholz T., Mackiewicz J.S. (2008):** Phylogenetic relationships of the monozoic tapeworms (Eucestoda: Caryophyllidea) inferred from morphological characters. *Systematic Parasitology* 70: 1-14
- Oros M., Hanzelová V., Scholz T. (2009):** Tapeworm *Khawia sinensis*: Review of the introduction and subsequent decline of a pathogen of carp, *Cyprinus carpio*. *Veterinary Parasitology* 164: 217-222
- Ortner-Schönbach P. (1913):** Zur Morphologie des Glykogens bei Trematoden und Cestoden. *Archiv für Zellforschung* 11: 413-449
- Poddubnaya L.G. (2002):** Ultrastructure of genital system ducts of *Diphyllobothrium latum* (Cestoda: Pseudophyllidea): the ducts of the female reproductive system. *Parazitologiya* 36: 79-87
- Poddubnaya L.G., Mackiewicz J.S., Kuperman B.I. (2003):** Ultrastructure of *Archigetes sieboldi* (Cestoda: Caryophyllidea): relationship between progenesis, development and evolution. *Folia Parasitologica* 50: 275-293
- Poddubnaya L.G., Mackiewicz J.S., Bruňanská M., Scholz T. (2005):** Fine structure of the female reproductive ducts of *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda: Spathebothriidea), from salmonid fish. *Folia Parasitologica* 52: 323-338
- Poddubnaya L.G., Gibbon D.I., Swiderski Z., Olson P.D. (2006):** Vitelloocyte ultrastructure in the cestode *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890): possible evidence for the recognition of divergent taxa within the Spathebothriidea. *Acta Parasitologica* 51: 266-263
- Reynolds E.S. (1963):** The use of lead citrate at high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-218
- Stránská E. (2005):** Vitelogeneze a ultrastruktura vitelocytů u tasemnic. Magisterská práce, Jihočeská univerzita, str. 34
- Świderski Z. (1973):** Vitellogenesis in the cestode *Inermicapsifer madagascariensis* (Davaine, 1870) Baer, 1956. Proceedings of the 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American society of Parasitologists, Toronto, p. 40
- Świderski Z., Mokhtar F. (1974):** Étude de la vitellogénèse de *Bothriocephalus claviothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 43: 135-149

- Świdarski Z., Mackiewicz J.S. (1976):** Electron microscope study of vitellogenesis in *Glaridacris catostomi* (Cestoidea: Caryophyllidea). *International Journal for Parasitology* 6: 61-73
- Świdarski Z., Eklun-Natey R.D., Subilia L., Huggel H. (1978):** Fine structure of the vitelline cells in the cestode *Proteocephalus longicollis* (Proteocephalidea), *Proceedings, 9<sup>th</sup> International Congress on Electron Microscopy*, Toronto, 1978. pp 442-443
- Świdarski Z., Xylander W.E.R. (2000):** Vitellocytes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle. *International Journal for Parasitology* 30: 805-817
- Świdarski Z., Chomicz L., Grytner-Zięcina B., Tkach V.V. (2000):** Electron microscope study on vitellogenesis in *Catenotaenia pusilla* (Goeze, 1782) (Cyclophyllidea, Catenotaeniidae). *Acta Parasitologica* 45: 83-88
- Świdarski Z., Bruňanská M., Poddubnaya L.G. (2004a):** Ultrastructural and cytochemical studies on vitellogenesis in caryophyllidean cestode *Caryophyllaeus laticeps*. *Proceedings of the 9th European Multicolloquium of Parasitology*, Valencia, 18-23 July 2004, p.602
- Świdarski Z., Bruňanská M., Poddubnaya L.G., Mackiewicz J.S. (2004b):** Cytochemical and ultrastructural study on vitellogenesis in caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Acta Parasitologica* 49: 16-24
- Świdarski Z., Młocicki D., Eira C., Miquel J., Grytner-Zięcina B., Mackiewicz J.S. (2005):** Vitellogenesis in *Mosgovoyia ctenoides* (Railliet, 1890) Beveridge, 1978 (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). *Acta Parasitologica* 50: 305-311
- Świdarski Z., Miquel J., Młocicki D., Neifar L., Grytner-Zięcina B., Mackiewicz J.S. (2006a):** Ultrastructural and cytochemical studies on vitellogenesis in the trypanorhynch cestode *Dolfusiella spinulifera* Beveridge, Neifar et Euzet, 2004 (Eutetrarhynchidae). *Acta Parasitologica* 51: 182-193
- Świdarski Z., Miquel J., Młocicki D., Neifar L., Grytner-Zięcina B., Mackiewicz J.S. (2006b):** Ultrastructure of the vitellocytes in the cestode *Progrillotia pastinacae* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Progrillotiidae). *Acta Parasitologica* 52: 114-126
- Świdarski Z., Młocicki D., Mackiewicz J.S., Miquel J., Ibraheem M.H., Bruňanská M. (2009):** Ultrastructure and cytochemistry of vitellogenesis in *Wenyonia virilis* Woodland, 1923 (Cestoda, Caryophyllidea). *Acta Parasitologica* 54: 131-142

**Thiéry J.P. (1967):** Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de Microscopie* 6: 987-1018

**Waeschenbach A., Webster B.L., Bray R.A., Littlewood D.T.J. (2007):** Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small a and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 311-325

**Xylander W.E.R. (1987):** Ultrastructural studies on the reproductive system of Gyrocotylidea and Amphilinidea (Cestoda) II. Vitellaria, vitellocyte development and vitelloduct of *Gyrocotyle urna*. *Zoomorphology* 107: 293-297

**Xylander W.E.R. (1988):** Ultrastructural studies on the reproductive system of Gyrocotylidea and Amphilinidea (Cestoda). I. Vitellarium, vitellocyte development and vitelloduct in *Amphilina foliacea* (Rudolphii, 1819). *Parasitology Research* 74: 363-370