

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Václav Pech

Perorální infekce ptáků a savců neuropatogenní motolicí *Trichobilharzia regenti*
Peroral infections of birds and mammals with the neuropathogenic fluke *Trichobilharzia regenti*

Diplomová práce

školitel: prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

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

V Praze dne 14. 8. 2013

.....

Poděkování:

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

Děkuji Aleně Černíkové ze pomoc se statistikou.

Děkuji Honzovi, Vláďovi, Lucce, Janě, Hance, Kašovi a ostatním členům helmintologického týmu za jejich připomínky a za příjemnění práce v laboratoři.

Děkuji svým rodičům a bratrovi Markovi za podporu a pochopení během celé doby studia.

Děkuji Emilie.

ABSTRAKT

Migrace tělem nakaženého hostitele je důležitou částí životních cyklů motolic, vč. schistosom. Migrace ptačích i savčích druhů viscerálních schistosom je poměrně studované téma (Haas a Haerberlein, 2009), které se stalo ještě atraktivnějším po objevu *T. regenti*, schistosomy migrující nervovou soustavou nejen ptáků, ale i savců (Horák a kol., 1999).

Diplomová práce se zabývá migrací schistosomul *T. regenti* a *T. szidati* v alimentárně infikovaných definitivních (kachny) a náhodných (myši) hostitelích. Tato práce navazuje na předchozí výzkum K. Blažové (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze), která se zabývala migrací *T. regenti* v definitivních hostitelích nakažených alimentárně cercáriemi nebo hepatopankreaty infikovaných mezihostitelských plžů *Radix lagotis*. Na rozdíl od K. Blažové (nepublikováno), která prokázala migraci schistosomul *T. regenti* míchou a mozkiem do nazální sliznice nakažených ptáků, se tato práce zaměřuje zejména na časnou fázi migrace v alimentárně nakažených kachnách a myších.

Invaze jícnu cercáriemi *T. regenti in vitro* není podmíněna sekrecí žláзовých produktů vč. katepsinu B2 (TrCB2) do okolí. Aktivita TrCB2 proti hlavním složkám slizničního hlenu, mucinům, byla v této práci studována na substrátových gelech: katepsin B2 nebyl schopen muciny typu I a III degradovat. V jícnovém epitelu si až polovina cercárií ponechává neodhozené ocásky minimálně 3 hodiny od penetrace. K migraci z jícnu do míchy alimentárně nakažených kachen i myší využívá *T. regenti* míšní nervy (červi se v míše u obou zvířat objevují 2 dny po infekci) a v ojedinělých případech pravděpodobně také cévní systém. *Trichobilharzia szidati* se z jícnu do plic alimentárně nakažených kachen a myší dostává krevním řečištěm. Plíce jsou v kachnách (také při nákaze hepatopankreaty infikovaných mezihostitelských plžů *Lymnaea stagnalis*) i myších invadovány 2. den po infekci.

Kolem migrujících schistosomul *T. regenti* i *T. szidati* se v kachnách a myších shromažďuje buněčný infiltrát tvořený především granulocyty, které do 24 hodin nejsou schopné parazita eliminovat.

Klíčová slova: *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia szidati*, helmint, Trematoda, alimentární infekce, definitivní hostitel, náhodný hostitel, migrace, penetrace, acetabulární žlázy, katepsin B2, mucin

ABSTRACT

Migration within the body of an infected host is one of the most important parts in the life cycle of flukes, including schistosomes. Migration of avian and mammalian visceral schistosomes has been a quite well studied topic (Haas a Haeberlein, 2009), which became more attractive after the discovery of *T. regenti*, an avian schistosome which is able to migrate through the nervous tissues of infected birds and mammals as well.

Migration of *T. regenti* and *T. szidati* schistosomula within the definitive (duck) and the accidental (mouse) hosts is the main topic of the diploma thesis. This work continues with the research of K. Blažová (Faculty of Science, Charles University in Prague) who studied migration of *T. regenti* within the definitive hosts infected perorally with cercariae or hepatopancreases of the infected intermediate snail, *Radix lagotis* (unpublished). She proved that *T. regenti* schistosomula are able to use the central nervous system for migration to the nasal mucosa of infected birds. In our work, we focused on the early phase of migration within the perorally infected birds and mice.

Invasion of esophagus by *T. regenti* cercariae *in vitro* is not conditioned by secretion of glandular products, including cathepsin B2 of *T. regenti* (TrCB2). Activity of TrCB2 against mucins, the main components of esophageal mucus, was studied in this work by incubating TrCB2 with substrate gels: TrCB2 was not able of proteolytically cleave mucins of the type I or III. Inside of esophageal epithelium, about 50% of cercariae still keep the tails attached to the bodies at least for 3 hours after penetration. *Trichobilharzia regenti* schistosomula use peripheral nervous system to migrate from esophagus to the spinal cord (schistosomula reach the spinal cord 2 days post infection) of ducks and mice infected perorally. At least in some cases, *T. regenti* schistosomula may probably migrate to the spinal cord via blood veins. Lungs of ducks (also infected perorally with hepatopancreases of the snail *Lymnaea stagnalis*) and mice were invaded by 2 days post infection. *Trichobilharzia regenti* and *T. szidati* schistosomula migrating within the ducks and mice were surrounded by granulocyte infiltration, but were not eliminated before 24 hours post infection.

Key words: *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia szidati*, helminth, Trematoda, alimentary infection, definitive host, accidental host, migration, penetration, acetabular glands, cathepsin B2, mucin

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 Modelové organismy	2
2.1.1 Penetrace kůže	2
2.1.1.1 Cerkáriová dermatitida	3
2.1.2 Migrace definitivním hostitelem	4
2.1.2.1 Migrace <i>T. ocellata sensu lato</i> a <i>T. szidati</i>	4
2.1.2.2 Migrace <i>T. regenti</i>	5
2.2 Alimentární nákazy hostitelů cercáriemi schistosom	6
2.2.1 Jícnový hlen	7
2.2.1.1 Muciny	7
2.2.1.1.1 Degradace mucinů	7
2.2.2 Mukózní lymfatický systém	8
2.2.2.1 Střevní lymfatický systém	9
2.2.2.2 Nazofaryngeální lymfatický systém	9
3. CÍLE PRÁCE	11
4. MATERIÁLY A METODY	12
4.1 Modelové organismy	12
4.1.1 Sběr cercárií	12
4.2 Nákazy hostitelů	12
4.2.1 Jednorázové nákazy	12
4.2.1.1 Alimentární nákazy kachen cercáriemi <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	12
4.2.1.2 Alimentární nákazy kachen hepatopankreaty plžů <i>L. stagnalis</i>	13
4.2.1.3 Alimentární nákaza myší cercáriemi <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	14
4.2.1.4 Alimentární nákazy cercáriemi <i>T. regenti</i> značenými CFSE	14
4.2.1.4.1 Inkubace cercárií/schistosomul <i>T. regenti</i> s CFSE	14
4.2.1.4.2 Nákazy myší	16
4.2.1.5 Subkutánní nákazy myší schistosomulami <i>T. regenti</i> značenými CFSE	16

4.2.1.6	Perkutánní nákazy myší cercáriemi <i>T. regenti</i> značenými CFSE	16
4.2.2	Opakované nákazy	17
4.2.2.1	Opakované nákazy kachen cercáriemi <i>T. regenti</i>	17
4.2.2.2	Opakované nákazy myší cercáriemi <i>T. szidati</i>	18
4.3	Penetrace cercárií <i>in vitro</i>	19
4.3.1	Penetrace kachní kůže a jícnu <i>in vitro</i>	19
4.3.2	Statistické vyhodnocení.....	19
4.4	Histologické zpracování larválních stadií <i>T. regenti</i> a vzorků tkání	21
4.4.1	Fixace vzorků	21
4.4.2	Zalévání vzorků.....	21
4.4.2.1	Zalévání vzorků do parafínu.....	21
4.4.2.2	Zalévání vzorků do JB-4 Plus	21
4.4.3	Použité barvicí metody.....	22
4.4.3.1	Barvení acetabulárních žláz cercárií a schistosomul.....	22
4.4.3.1.1	Alizarín.....	22
4.4.3.1.2	Lithium-karmín	23
4.4.3.1.3	Apomorfin	24
4.4.3.1.4	Fluorescenčně značené lektiny (FITC-lektiny)	24
4.4.3.2	Barvení řezů	25
4.4.3.2.1	Hematoxylin-eozin	25
4.4.3.2.2	Giemsa.....	26
4.4.3.2.3	FITC-lektiny	26
4.4.3.2.4	Značení protilátkami.....	27
4.4.3.2.4.1	Značení parafínových řezů	28
4.4.3.2.4.2	Značení řezů zalitých v JB-4.....	29
4.5	Proteolytické štěpení mucinů	29
4.5.1	Měření koncentrace TrCB2.....	29
4.5.2	Měření proteolytické aktivity TrCB2.....	30
4.5.3	Separace frakcí myelinu	30

4.5.3.1	SDS-PAGE elektroforéza.....	31
4.5.4	Dot bloty.....	31
5.	VÝSLEDKY	33
5.1	Fluorescenční značení cercárií a schistosomul <i>T. regenti</i>	33
5.1.1	Značení <i>in vitro</i> transformovaných schistosomul pomocí CFSE	33
5.1.2	Značení cercárií pomocí CFSE s následnou transformací <i>in vitro</i> a inkubací	33
5.2	Migrace schistosomul nakaženými hostiteli.....	34
5.2.1	Alimentární nákazy kachen cercáriemi <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	34
5.2.2	Alimentární nákazy kachen hepatopankreaty infikovaných plžů <i>L. stagnalis</i>	38
5.2.3	Alimentární nákazy myši cercáriemi <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	38
5.2.4	Alimentární nákazy myši cercáriemi <i>T. regenti</i> značenými CFSE	40
5.2.5	Subkutánní nákazy myši schistosomulami <i>T. regenti</i> značenými CFSE.....	41
5.2.6	Perkutánní nákazy myši cercáriemi <i>T. regenti</i> značenými CFSE	42
5.3	Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži opakovaně nakažených hostitelů.....	42
5.3.1	Výskyt buněčného infiltrátu v kachnách opakovaně nakažených motolicí <i>T. regenti</i> ..	42
5.3.2	Výskyt buněčného infiltrátu v myších opakovaně nakažených motolicí <i>T. szidati</i>	45
5.4	Penetrace cercárií <i>in vitro</i>	47
5.4.1	Časná fáze migrace <i>T. regenti</i> kachní kůží a jícnem	47
5.4.2	Vyprazdňování penetračních žláz během časné fáze migrace <i>T. regenti</i>	52
5.4.2.1	Značení parafinových řezů lektiny	52
5.4.2.2	Imunohistochemické značení řezů	60
5.4.2.3	Barvení schistosomul alizarínem.....	63
5.4.2.4	Barvení schistosomul lithium-karmínem	67
5.4.2.5	Barvení schistosomul apomorfínem.....	68
5.4.3	Statistické vyhodnocení.....	71
5.5	Proteolytické štěpení mucinů	74
5.5.1	Stanovení proteolytické aktivity TrCB2.....	74
5.5.2	Dot bloty.....	76
6.	DISKUZE.....	77

6.1	Alimentární nákazy kachen motolicí <i>T. regenti</i>	77
6.2	Alimentární infekce kachen motolicí <i>T. szidati</i>	78
6.3	Alimentární infekce myší cercáriemi <i>T. szidati</i>	78
6.4	Alimentární infekce myší cercáriemi <i>T. regenti</i>	79
6.5	Subkutánní nákazy myší schistosomulami <i>T. regenti</i>	80
6.6	Perkutánní nákazy myší cercáriemi <i>T. regenti</i>	80
6.7	Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži kachen opakovaně nakažených <i>T. regenti</i>	80
6.8	Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži myší opakovaně nakažených <i>T. szidati</i>	82
6.9	Penetrace kachní kůže cercáriemi <i>T. regenti in vitro</i>	82
6.10	Penetrace kachního jícnu cercáriemi <i>T. regenti in vitro</i>	84
6.11	Proteolytická degradace mucinů katepsinem B2 motolice <i>T. regenti</i>	85
7.	ZÁVĚR	87
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	89

Seznam použitých zkratk:

AMC – „7-amino-4-methylcoumarin“

Arg – arginin

BSA – hovězí sérový albumin

CA – cirkumacetabulární

CD – „cluster of differentiation“

CFSE – „carboxyfluorescein succinimidil ester“

ConA – lektin z *Canavalia ensiformis*

COOH – karboxylová skupina

CPB – citrát-posfátový pufr

DAB – 3, 3'-diaminobenzidin

DH – definitivní hostitel

DTT – dithiotreitol

E-64 – *L-trans*-epoxysuccinyl-leucyl-amido[4-guanidino]butan

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – „enzyme-linked immuno sorbent assay“

ESP – exkrečně-sekreční produkty

FITC – fluorescein-5-izothiokyanát

GALT – střevní mukózní lymfatický systém

H-E – hematoxylin-eozin

HEPES – kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová

HRP – křenová peroxidáza

IgA – imunoglobulin třídy A

IgE – imunoglobulin třídy E

IgG – imunoglobulin třídy G

IgY – imunoglobulin třídy Y

IL – interleukin

L-K – lithium-karmín

LTA – lektin z *Lotus tetragonolobus*

MALT – slizniční lymfatický systém

MBP – „myelin basic protein“

MHC – „major histocompatibility complex“

NALT – nazální lymfatický systém

NH₂ – aminoskupina

p.i. – po infekci

p.p.– po penetraci

PA – postacetabulární
PAS – „periodic acid Schiff“
PBS – fosfátový pufr
PBST – fosfátový pufr s Triton X-100
PFA – paraformaldehyd
Phe – fenyl
PNA – lektin z *Arachis hypogaea*
PP – Peyerovy plaky
PSA – lektin z *Pisum sativum*
RCA-I – lektin z *Ricinus communis*
rfu – „relative fluorescent unit“
SCM – „schistosoma culture medium“
SDS-PAGE – „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel“
S-IgA – sekretorický imunoglobulin třídy A
SSS – „sterile snail saline“
STA – lektin ze *Solanum tuberosum*
TrCB2 – katepsin B2 motolice *Trichobilharzia regenti*
UEA-I – lektin z *Ulex europaeus*
WGA – lektin z *Tritium vulgare*

1. ÚVOD

Motolice rodu *Schistosoma* (Schistosomatidae) jsou významnými parazity lidí i zvířat. Je odhadováno, že více než 200 milionů lidí trpí lidskou schistosomózou a že dalších 800 milionů lidí žije v oblastech, kde se tyto paraziti vyskytují (Steinmann a kol., 2006). Schistosomóza je chronické onemocnění doprovázené anémií, chronickou bolestí, průjmami, podvýživou a poškozením vnitřních orgánů, vč. jater, ledvin míchy a mozku (Barsoum a kol., 2013). Nákazy zvířat schistosomami jsou významné z hospodářského hlediska. Například na některých lokalitách v západní Africe může být *S. bovis* infikováno až 80% skotu (Rollinson a kol., 1990).

Savci vč. člověka mohou být náhodně infikováni také ptačími druhy schistosom (např. *Trichobilharzia* spp.), které jsou ale schopné dospět pouze v definitivních hostitelích (DH) – vodních ptácích. Opakovaný kontakt savčích hostitelů a cercárií (larvy infekční pro DH) ve vodním prostředí může nicméně vést ke vzniku kožní vyrážky označované jako cercáriová dermatitida (Kolářová a kol., 2013).

U savců i ptáků nakažených perkutánně závisí rozvoj patologických příznaků na způsobu migrace schistosomul tělem hostitele. *Trichobilharzia regenti* se od viscerálních schistosom (např. *T. szidati*) liší unikátní migrací periferní i centrální nervovou soustavou definitivního i náhodného hostitele (Hrádková a Horák, 2002). U nakažených zvířat byly popsány problémy s koordinací pohybů a rovnováhou, dočasná paralýza (Horák a Kolářová, 2011, Hrádková a Horák, 2002, Lichtenbergová a kol., 2011, Kolářová a kol., 2001) či dokonce úhyn (Lichtenbergová, nepublikováno).

Mimo obvyklého perkutánního způsobu nákazy se hostitelé schistosom mohou nakazit i vypitím cercárií (Boulanger a kol., 1999). Alimentární cesta nákazy byla u motolice *T. regenti* recentně prokázána nejen po vypití cercárií, ale také po pozření infikovaných vodních plžů *R. lagotis* (Blažová, nepublikováno). Úspěšnost alimentárních nálezů DH byla doložena migrací schistosomul *T. regenti* do nazální sliznice (Blažová, nepublikováno). Způsobem, jakým *T. regenti* migruje z trávicí do centrální nervové soustavy definitivních a náhodných hostitelů, se poprvé zabývá až tato práce. Poznatky o alimentárním způsobu nákazy definitivních a náhodných hostitelů motolicemi *T. regenti* a *T. szidati* nashromážděné v rámci této práce jsou rovněž porovnány s daty o perkutánních nálezích. Díky výsledkům této práce je možné lépe pochopit epidemiologický a epizootologický význam ptačích motolic, a jejich koloběh v přírodě.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Modelové organismy

Trichobilharzia regenti Horák, Kolářová *et* Dvořák, 1998 i *T. szidati* Neuhaus, 1952 (jako *T. szidati* jsou dnes označovány i některé izoláty dříve považované za *T. ocellata* La Valette, 1855 – Rudolfová a kol., 2005) jsou ptačí schistosomy s dvouhostitelským životním cyklem; vodní plži rodu *Radix*, resp. *Lymnaea*, slouží jako mezihostitelé, definitivními hostiteli (DH) jsou vodní ptáci čeledi Anatidae. Náhodnými hostiteli mohou být i savci.

Po uvolnění z vajíček miracidia napadají mezihostitele ve vodním prostředí. V nich se mění na primární sporocysty, z jejichž totipotentních buněk vznikají sekundární sporocysty. Uvnitř těchto sporocyst dochází k produkci cercárií, které se cyklicky uvolňují z infikovaných plžů a ve vodním prostředí vyhledávají DH, aktivně penetrují kůži jejich končetin a přeměňují se na tělem migrující schistosomuly (Horák a kol., 2002).

2.1.1 Penetrace kůže

Po přichycení se na kůži definitivního nebo náhodného hostitele vyhledávají cercárie vhodné místo, které naruší pohyby hlavového orgánu, zatímco ostny zajišťují mechanickou podporu. Penetrace kůže je podnícena mastnými kyselinami (Haas a van de Roemer, 1998) a doprovázena vyprázdněním obsahu penetračních žláz cercárií stimulovaným především ceramidy, cholesterolem a mastnými kyselinami (Haas a Haeberlein, 2009).

Penetrační žlázy larválních stadií schistosom jsou tvořeny pěti páry velkých sekrečních buněk, které jsou vzhledem k pozici vůči acetabulu označovány jako preacetabulární (syn. cirkumacetabulární; dál jen CA) – tři páry buněk, a postacetabulární – dva páry buněk (dál jen PA; Horák a kol., 2002, Stirewalt a Kruidenier, 1961). Podobně jako u *S. mansoni* bylo i v CA žlázách *T. regenti* objeveno značné množství Ca^{2+} iontů (Dorsey a kol., 1977, Mikeš a kol., 2005). V PA žlázách *T. regenti* i *T. szidati* byl prokázán výskyt proteinu s lektinovou aktivitou (Horák a kol., 1997, Mikeš a kol., 2005) a v PA žlázách *T. regenti* také katepsin B2 (Dolečková a kol., 2009). Tato cysteinová peptidáza dokáže proteolyticky degradovat myelin, fibrinogen a proteiny obsažené v kůži (keratin, kolagen a elastin), a usnadňovat tak cercáriím průnik do DH (Dolečková a kol., 2009).

Cercárie mohou penetrovat povrch kůže osamoceně nebo hromadně, jak to bylo popsáno např. u cercárií *T. szidati*, z nichž většina dokončila proces penetrace během 4 minut od začátku penetrace (Haas a van de Roemer, 1998). Cercárie během penetrace odvrhují povrchový glykokalyx (Horák a kol., 1998) a se zahájením penetračních pohybů (a během následujících 105 vteřin) také odhazují ocásek (Haas a Haeberlein, 2009). U motolic *S. mansoni* a *S. japonicum* byly ovšem pozorovány případy, kdy se v tunelu vytvořeném v epidermis (*stratum corneum*) penetrujícími cercáriemi nacházelo najednou několik cercárií s neodhozenými ocásky (Gordon a Griffiths, 1951, Wang a kol.,

2012) – až 60% cercárií *S. mansoni* (ale 0% cercárií *T. szidati*) při vstupu do kůže ocásky neodhazuje (Haas a van de Roemer, 1998, Haas a Haeberlein, 2009).

Po invazi kůže a před další migrací hlouběji touto tkání zůstávají schistosomuly *T. szidati* s povrchem v horizontální pozici těsně pod vrstvou *stratum corneum* (Haas a van de Roemer, 1998). Následně schistosomuly *T. szidati* migrují skrz *corium* a 19 hodin po penetraci (p.p.) šikmo invadují hypodermální cévy (Bourns a kol., 1973). Touto dobou již mají téměř vyprázdňené penetrační žlázy, zatímco obsah hlavové žlázy zůstává nevyprázdňený (Haas a Haeberlein, 2009). Po 3 dnech po infekci se schistosomuly *T. szidati* v kůži již nenachází (Ellis a kol., 1975). U reinfikovaných ptáků je opuštění kůže schistosomulami pomalejší a může trvat až 7 dní (Ellis a kol., 1975).

Schistosomuly *T. regenti* pronikají do *corium* náhodných hostitelů (myši) nejdříve 4 hodiny po penetraci, ale většina červů se zde nachází mezi 12 a 24 hodinami p.p. (Kouřilová a kol., 2004a). Nejrychlejší schistosomuly mohou do hypodermis proniknout již 4 – 6 hodin p.p. (Kouřilová a kol., 2004a). U myši byly neurotropní schistosomuly *T. regenti* překvapivě nalezeny v podkožních kapilárách (Kouřilová a kol., 2004a). Je pozoruhodné, že schistosomuly *T. regenti* nebyly pozorovány v periferních nervech inervujících *corium* a hypodermis, přestože byly v periferních nervech končetin nakažených myši nalezeny 12 a 24 hodin po infekci (Kouřilová a kol., 2004a).

Cerkárie ptačích schistosom (díky většímu obsahu stimulačních mastných kyselin v savčí kůži v porovnání s kůží ptáků, Haas a Haeberlein, 2009) paradoxně ochotněji penetrují savčí kůži (Haas a van de Roemer, 1998).

2.1.1.1 Cerkáriová dermatitida

U savců (vč. lidí), náhodných hostitelů, začíná kožní reakce na penetraci cercárií ptačích schistosom pocí píchání v kůži asi 1 hodinu po infekci (Chamot a kol., 1998). Další projevy této reakce závisí mj. na stavu imunitního systému hostitele, tedy na tom, zda s cercáriemi přišel savčí hostitel do styku již dříve v minulosti. U primoinfekcí je reakce proti červům mírná; v kůži se v místech penetrace cercárií objevují otoky, dochází k vazodilataci a k akutní zánětlivé reakci (1 – 6 hodin po infekci, Kouřilová a kol., 2004b) s infiltrací neutrofilů, CD⁴⁺ lymfocytů, MHC II antigen prezentujících buněk, mastocytů a makrofágů podpořenou přítomností cytokinů IL-12, IL-6, IL-1 β a IFN- γ (Kouřilová a kol., 2004b). Humorální odpověď proti schistosomulám, kterou doprovází zvýšení IgG2 v krvi (Kouřilová a kol., 2004b), je u primoinfekcí tedy T_H17-polarizovaná (Lichtenbergová a Horák, 2012). Mezi 5. a 14. dnem p.i. se na kůži může v místě penetrace objevit krátce trvající vyrážka (Chamot a kol., 1998).

U opakovaných infekcí má cercáriová dermatitida charakter nejprve hypersenzitivní reakce typu I a později kožního zánětu s masivnější infiltrací buněk zmíněných výše (Kouřilová a kol., 2004a, Kouřilová a kol., 2004b). Přítomnost IL-10, IL-6 a IL-4 (Kouřilová a kol., 2004b) ale navozuje T_H2-polarizovanou odpověď (Lichtenbergová a Horák, 2012), která je navíc doprovázena zvýšenou

produkcí histaminu (Kouřilová a kol., 2004b). U opakovaných infekcí se zvyšují také hladiny sérových IgG1 a IgE (Kouřilová a kol., 2004b). V kůži reinfikovaných myší dochází k eliminaci většiny schistosomul (Kouřilová a kol., 2004b). Cerkáriová dermatitida může být při opakovaném styku s cercáriemi doprovázena např. svěděním, erytémem, horečkou, lokálním otokem lymfatických uzlin. U silných infekcí se může objevovat pocit nevolnosti, svědění končetin, průjem a nespavost (Horák a kol., 2002, Chamot a kol., 1998, Kolářová a kol., 2013).

2.1.2 Migrace definitivním hostitelem

Po penetraci kůže DH směřují schistosomuly k místu finální lokalizace, kde později dospívají, rozmnožují se a kladou vajíčka. K migraci do střevní stěny a přilehlých cév využívají viscerální druhy *Trichobilharzia* spp. (vč. *T. szidati* a *T. ocellata sensu lato*) krevní řečiště (Bourns a kol., 1973). *Trichobilharzia regenti* se do nazální sliznice dostává po průchodu nervovou soustavou (Hrádková a Horák, 2002).

2.1.2.1 Migrace *T. ocellata sensu lato* a *T. szidati*

Schistosomuly *T. szidati* se v kůži kachen mohou vyskytovat až 3 dny po infekci (p.i., Ellis a kol., 1975), odkud dále migrují vaskulárně do plic (Bourns a kol., 1973). Plíce kachen a myší jsou prvním místem, kde se schistosomuly *T. szidati* hromadí – vyskytují se zde 2. – 10. den p.i. (Chanová a kol., 2007). V plicích DH pozorovali Bourns a kol. (1973) a Ellis a kol. (1975) dva vrcholy výskytu schistosomul *T. ocellata* (1. – 3. den p.i. a kolem 8. dne p.i.). Druhý vrchol byl přisuzován sekundární invazi plic červy migrujícími z jater bez dalšího průchodu plícemi (Bourns a kol., 1973) nebo opakované invazi krevního řečiště schistosomulami po několikadenní extravaskulární periodě strávené v lumenu parabronchů (Chanová a kol., 2007). Pasáž schistosomul *T. ocellata* plícemi nakažených ptáků byla původně popisována jako invaze vzdušných prostor parabronchů a následně sekundárních bronchů s pozdějším průnikem epitelem bronchů a cévních stěn do žilního oběhu (Bourns a kol., 1973). Recentnější výzkum se přiklání k opačnému postupu, tedy migraci nejprve do sekundárních bronchů a pak do parabronchů, ze kterých červi (*T. szidati*) vstupují zpět do cévního systému. Tato migrační cesta je podpořena i vývojem plicních lézí (Chanová a kol., 2007). V myších plicích jsou schistosomuly *T. szidati* nacházené 2. – 6. den p.i. (Chanová a kol., 2007), ale mohou se zde vyskytovat i 10 dní p.i. (Horák a Kolářová, 2000), po kterých červi vymizí. Schistosomuly z kachních plic pokračují v migraci krevním řečištěm (Haas a Pietsch, 1991, Horák a Kolářová, 2000). Schistosomuly *T. ocellata* se v kachních hromadí také v játrech (Bourns a kol., 1973, Ellis a kol., 1975), ze kterých se do plicních arterií 8. a 9. den p.i. vrací již dospělí červi (Bourns a kol., 1973). O těchto dospělících se Chanová a kol. (2007) však domnívají, že se jedná o červy z plic invadující cévní systém, protože v plicních arteriích tyto autoři žádné červy nenalezli. Kachní játra jsou také jediným orgánem, ve kterém se schistosomuly *T. ocellata* vyskytují mezi 89. – 370. den p.i. (Bourns a kol.,

1973). Mezi 1. a 21. dnem p.i. jsou schistosomuly *T. ocellata* v kachnách nacházeny v nízkých počtech také v ledvinách (Bourns a kol., 1973). Ve střevní stěně a přidružených cévách je *T. ocellata* přítomna od 8. do 21. dne p.i. a poté vymizí (Bourns a kol., 1973).

Do plic a jater reinfikovaných ptáků schistosomuly *T. ocellata* migrují se zpožděním a v nízkých počtech, a do ledvin se dostanou jen výjimečně. Cévy střevní stěny schistosomuly nedosáhnou vůbec (Ellis a kol., 1975).

Současné názory na výskyt schistosomul v játrech nakažených savců jsou rozporuplné. Schistosomuly *T. ocellata* v játrech nakažených savců (myši, křečci, morčata, králíci a opice) nacházeny nejsou (Olivier, 1953). Radioaktivní ložiska v játrech myši, které byly nakaženy radioaktivně značenými cercáriemi *T. szidati*, však dokládají přítomnost schistosomul 2. – 5. den p.i. (Haas a Pietsch, 1991).

2.1.2.2 Migrace *T. regenti*

Nazální druh *T. regenti* je mezi schistosomami unikátní tím, že z kůže migruje nervovou soustavou; v DH nejrychlejší schistosomuly invadují *corium* již během 4 hodin po penetraci (Kouřilová a kol., 2004a) a následně využívají periferní nervy k migraci do míchy (Hrádková a Horák, 2002), do které vstupují míšními kořeny (Lichtenbergová a kol., 2011). V míše migrují šedou a bílou hmotou a subarachnoidálním prostorem (Kolářová a kol., 2001). V synsokrální a hrudní míše kachen jsou schistosomuly přítomné 2. – 15. den p.i., v krční míše se vyskytují mezi 6. a 15. dnem p.i. (Hrádková a Horák, 2002, Kouřilová a kol., 2004a). Z míchy pokračuje většina schistosomul v migraci do mozku, ale některé v míše zůstávají a dál již nemigrují (Horák a kol., 1999). Schistosomuly se do mozku dostávají 10. den p.i. (Horák a kol., 1999), resp. 12. den p.i. (Hrádková a Horák, 2002). Z prodloužené míchy schistosomuly pokračují do mozečku, mozkových hemisfér, optických a čichových laloků (Horák a kol., 1999, Kolářová a kol., 2001). *Bulbus olfactorius* je invadován 18. den p.i. (Hrádková a Horák, 2002). V mozečku a čichových lalocích byly schistosomuly pozorovány i 23. den p.i. (Horák a kol., 1999). Hlavové nervy schistosomuly k migraci z mozku do nazální sliznice nevyužívají (Chanová a Horák, 2007). V mozkových plenách červi přecházejí na jiný zdroj potravy (pravděpodobně červené krvinky); k invazi nazální sliznice tak pravděpodobně dochází krevním řečištěm (Chanová a Horák, 2007). V nazální sliznici schistosomuly dospívají, kopulují a kladou vajíčka. Dospělí červi jsou zde přítomní pouze 13. – 24. den p.i. (Horák a kol., 1999, Chanová a Horák, 2007). Z nakladených vajíček se mohou miracidia líhnout ještě v nazální sliznici (Horák a kol., 1999).

Kromě nervové soustavy a nazální sliznice se mohou schistosomuly *T. regenti* v nakažených ptácích vyskytovat i v plicích (2. – 3. den p.i., Horák a kol., 1999). Menší počet schistosomul tak pravděpodobně vstupuje do míchy i míšními arteriemi (Hrádková a Horák, 2002).

V savčích hostitelích nejsou schistosomuly *T. regenti* schopné migrovat do nazální sliznice (a tedy dokončit svůj životní cyklus), ale mohou invadovat CNS (Hrádková a Horák, 2002); v myši míše se schistosomuly vyskytují 2. – 24. den p.i. a v mozku 3. – 24. den p.i. (Hrádková a Horák, 2002). Neuropatologické změny v míše doprovázené poškozením axonů mohou u myši vyústit v částečnou paralýzu zadních končetin (Lichtenbergová a kol., 2011) a v případě imunodeficientních kmenů myši (SCID) i jejich úhyn (Lichtenbergová, nepublikováno).

Recentním výzkumem uskutečněným v naší laboratoři bylo dokázáno, že *T. regenti* je schopná nakazit DH nejen perkutánní cestou, ale že k nákaze vodních ptáků může dojít i po vypití cercárií nebo pozření infikovaných plžů (K. Blažová, nepublikováno).

2.2 Alimentární nákazy hostitelů cercáriemi schistosom

Definitivní hostitelé motolic parazitujících v savcích se mohou alimentárně nakazit pozřením metacercárií na vegetaci (např. Fasciolidae, rod *Fasciola*) nebo uvnitř mezihostitelů (např. Dicrocoeliidae, rod *Dicrocoelium*). Dospělé motolice jsou poté často lokalizovány v trávicí soustavě (např. v játrech a/nebo žlučových cestách) savců. Méně často se DH nakazí po spolknutí cercárií, jako je tomu např. u motolic čeledi Bivesiculidae (rod *Bivesicula*) nebo Azygiidae (rod *Azygia*), u kterých další vývoj probíhá ve střevě ryb.

Schistosomy mohou své hostitele mimo obvyklého perkutánního způsobu nákazy infikovat také alimentárně. Úspěšnost alimentární infekce byla prokázána nálezem vajíček např. v křečcích, kozách a ovčích nakažených cercáriemi *S. bovis* (Boulanger a kol., 1999, Kassuku a kol., 1985, Oleaga a Ramajo, 2004) nebo v prasatech nakažených cercáriemi *S. japonica* (Giver a kol., 1999). Migraci schistosomul *T. regenti* v alimentárně nakažených kachnách studovala K. Blažová (nepublikováno). V kachnách nakažených cercáriemi nacházela schistosomuly ve stěně hltanu a jícnu a od 3. dne p.i. také v centrální nervové soustavě. Úspěšnost infekce dokládají nálezy červů v nazální sliznici od 14. dne p.i. V kachnách nakažených hepatopankreaty infikovaných plžů *R. lagotis* sice nacházela méně schistosomul, přesto se relativně hodně červů 20. den p.i. vyskytovalo v nazální sliznici.

Alimentární způsob nákazy je od perkutánního způsobu značně odlišný; cercárie se v alimentárně nakaženém hostiteli ocitají na površích tkání (např. jazyk, stěna ústní dutiny, stěna trávicí trubice), které jsou na rozdíl od kůže vlhké a měkké. Pohyb cercárií je na těchto površích v porovnání s vodním prostředím značně omezen a cercárie jsou proto nuceny zahájit penetraci v místě/poblíž místa přisednutí. Uvnitř trávicí soustavy hostitele však cercárie mohou postrádat některé orientační signály, např. světlo, které se uplatňuje při penetraci (Grabe a Haas, 2004). Mezi ústním otvorem a žaludkem představuje jícen orgán s největší plochou. Dá se tedy očekávat, že na sliznici jícnu se budou vypité cercárie ocitát nejčastěji.

2.2.1 Jícnový hlen

Povrch sliznice trávicí soustavy (vč. jícnu) ptáků i savců, pokrývá gelovitý hlen, který ho chrání před mechanickým poškozením a chemickými iritanty (Tytgat a kol., 1993). Nejdůležitější složkou tohoto hlenu tvoří muciny (Van Klinken a kol., 1997, cit. dle Forstner a Forstner, 1994).

2.2.1.1 Muciny

Muciny jsou $5 \times 10^2 - 4 \times 10^3$ kDa velké glykoproteiny (Carlstedt a Sheenan, 1989) produkované slizničními epitelovými buňkami (DeBuyscher a kol., 1984). Exprese jednotlivých typů mucinů je tkáňově specifická (Chang a kol., 1994). Muciny se rozlišují na sekreční nebo membránově vázané a jsou tvořeny polypeptidovou kostrou opakujících se aminokyselinových sekvencí s bohatým výskytem serinových a threoninových zbytků. NH_2 a COOH konce mucinového polypeptidu mohou být oproti centrální O-glykosylované části N-glykosylované (Strous a kol., 1992).

Silná glykosylace (až 85% mucinů tvoří sacharidy) chrání molekuly mucinů před proteolýzou (Elstein, 1978). U sekrečních proteinů obsahují NH_2 a COOH konce mnoho cysteinových reziduí, které mohou být disulfidickými můstky pospojovány v rámci jedné či více molekul, a tvořit tak hustý gel (Strous a kol., 1992). Membránové muciny jsou ukotveny k plazmatické membráně epitelii pomocí hydrofóbního úseku (Shekels a kol., 1998). Sializace konců postranních sacharidových řetězců mucinů chrání muciny před bakteriální adhezí (Zopf a Roth, 1996).

O-glykosilované polypeptidy, mezi které jsou řazeny i muciny, se mohou uplatňovat v interakci helminti – hostitel (Theodoropoulos a kol., 2001). O-glykosilované glykokonjugáty (>300 kDa) mohou být např. využity miracidii schistosom *S. mansoni* a *S. haematobium* při hledání mezihostitelských plžů (Haberl a kol., 1995). K vyhledání mezihostitelů využívají O-glykosylované proteiny (>30 kDa) také miracidia *T. ocellata* (Kalbe a kol., 1997).

Úspěšnost některých patogenních mikroorganismů závisí na schopnosti degradovat slizniční hlen, resp. muciny (Wiggins a kol., 2001). Schopnost degradovat muciny si osvojili také někteří parazitičtí helminti, jak je uvedeno v následující kapitole.

2.2.1.1.1 Degradace mucinů

Degradace mucinů komenzálními mikroorganismy (např. *Lactobacillus*) je v obratu těchto molekul považována za přirozenou (Wiggins a kol., 2001). Některé patogenní mikroorganismy ovšem narušením integrity hlenu, resp. částečnou nebo úplnou degradací jeho mucinů, mají možnost invadovat slizniční epitel (Wiggins a kol., 2001).

Enzymy schopné proteolyticky štěpit muciny jsou souhrnně označovány jako mucinázy. Různé mucinázy degradují muciny různými způsoby: sulfatázy odštěpují z mucinů terminální sulfátové zbytky (Robertson a Wright, 1997), glykosidázy odstraňují oligosacharidy postranních řetězců (Howe a kol., 1999), proteázy degradují neglykosylované úseky mucinů (Dwarakanath a kol.,

1995) a sialidázy (syn. neuraminázy) z mucinů odstraňují terminální kyselinu sialovou chránící sacharidy postranních řetězců před hydrolyzou (Wiggins a kol., 2001). Absence kyseliny sialové může vést společně se ztrátou negativního náboje k bakteriální adhezi na muciny (Zopf a Roth, 1996). Pro kompletní degradaci mucinů jsou patogenní mikroorganismy (např. *Vibrio cholerae*, *Trichomonas vaginalis*) často vybaveny komplexem i několika mucináz (Lehker a Sweeney, 1999, Stewart-Tull a kol., 1986).

Schopnost degradovat muciny byla prokázána i u enzymů parazitických helmintů; narušením N-terminální polymerizační domény mucinu typu II poškozují nematod *Trichuris muris* integritu hleny střevní sliznice (Hasnain a kol., 2012). U hlístice *Ostertagia ostertagi* byl objeven L-like katepsin a aspartylová proteáza, tedy enzymy schopné degradovat mucin bovinních slinných žláz (Geldhof a kol., 2000). Také *in vitro* uvolněné sekreční produkty hlístice *Passalurus ambiguus* obsahují aspartylovou a cysteinovou proteázu, které jsou v prostředí kyselého pH schopné štěpit bovinní muciny sloužící tomuto parazitovi pravděpodobně jako zdroj potravy. Podobně je tomu i u nematoda *Syphacia muris*, jenž je vybaven zatím blíže nespecifikovanými peptidázami schopnými degradovat střevní muciny v alkalickém prostředí (Vadlejch a kol., 2010). Po úspěšné invazi sliznice DH mohou patogenní organismy vč. helmintů narazit na humorální či buněčnou imunitní odpověď.

2.2.2 Mukózní lymfatický systém

Imunitní odpověď na sliznicích (plic, trávicí trubice, nosní a ústní dutiny, urogenitálního systému, oka a vnitřního ucha) je zprostředkována mukózním lymfatickým systémem („mucosa-associated lymphoid tissues“, MALT) nezávislým na systémovém imunitním systému (Cesta, 2006, Kuper a kol., 2002) a obsahujícím až polovinu veškerých lymfocytů (Cesta 2006, cit. dle Croitoru a Bienenstock, 1994). Hlavní funkcí MALTu je tvorba sekretorického IgA (S-IgA) na povrchu sliznic, nastolení imunotolerance vůči antigenům potravy (cytotoxickými T-lymfocyty) a zprostředkování nejen T_H1 -dependentní, ale především T_H2 -dependentní imunitní reakce (Gormley a kol., 1998, Kiyono a Fukuyama, 2004, Lillehoj a Trout, 1996). Někteří autoři v rámci MALTu rozlišují organizovanou (indukční) a difúzní (efektorovou) složku. Organizovaný MALT zahrnuje především BALT („bronchus-associated lymphoid tissues“), GALT („gut-associated lymphoid tissues“) a NALT („nasopharynx-associated lymphoid tissues“, Cesta, 2006), a po aktivaci T-buňkami v něm dochází k izotypovému přesmyku IgA a proliferaci B-buněk. Aktivované B- a T-buňky poté migrují do efektorových míst – *lamina propria* a *substantia propria* (Lillehoj a Trout, 1996, Yan a kol., 2003). V přilehlém slizničním epitelu je pak produkován S-IgA (Pabst, 1987). Buněčná složka difúzního MALTu mimo roztroušené T-buňky (hlavně $CD4^+$ ale i intraepiteliální $CD8^+$) zahrnuje také NK buňky, plazmatické buňky, B-buňky, dendritické buňky, membránové epitelové buňky (tzv. M-buňky), granulocyty a makrofágy (Bockman a Cooper, 1973, Chai a kol., 1988, Lillehoj a Trout, 1994, MacDonald, 2003, Pabst, 1987, Trout a Lillehoj, 1995, Cesta 2006, cit. dle Kelsall a Strober, 1999).

2.2.2.1 Střevní lymfatický systém

Práce zabývající se imunitní odpovědí MALTu v gastrointestinálním traktu jsou zaměřené na lymfatický systém střeva (GALT). Funkce GALTu spočívá v indukci humorální i buněčné imunitní odpovědi proti alimentárně získaným virovým, bakteriálním i parazitárním infekcím (Bockman a Cooper, 1973, Carman a kol., 1986, Rothwell a kol., 1995, Simmons a kol., 2001). U savců je GALT mimo střevní epitel a *lamina propria* (Tagliabue a kol., 1982) tvořen Peyeroými plaky (PP) a apendixem (Bhide a kol., 2001). U ptáků (kura) se dále jedná o Fabriciovu burzu (Bockman a Cooper, 1973), Meckelovo divertikulum (Befus a kol., 1980) a lymfatické agregáty (*lymphonoduli aggregati canalis alimentarii*) ve sliznici hltanu a cék (Černý, 2005) napojených na lymfatické cévy (Ohshima a Hiramatsu, 2000, cit. dle King a McLelland, 1975). Počet těchto lymfatických agregátů se úměrně zvyšuje s věkem ptáků (Černý, 2005). Kachny jsou na rozdíl od ostatních ptáků, kterým GALT slouží také jako hlavní sekundární lymfatický orgán (Arnouts, 2009), vybaveny lymfatickými uzlinami (Flajnik a kol., 2003, cit. dle Lundqvist a kol., 2006). U kura bylo ale na rozhraní jícnu a proventrikulu (svalnatého žaludku) popsáno 6 – 8 jednotek tzv. jícnové mandle. Tato mandle má pravděpodobně podobnou funkci jako střevní PP – navození tolerance či systémové imunitní reakce transportem lumenálních antigenů a bakterií M-buňkami imunitním buňkám (Jung a kol., 2010, Oláh a kol., 2003).

Peyerovy plaky mohou patogenům (např. *Salmonella*) sloužit jako vstupní brána ze střeva do vnitřních tělesných orgánů (Cerutti a Rescigno, 2008). Také dospělci *S. mansoni* preferovaně kladou vajíčka nejčastěji uvnitř dobře vaskularizovaných PP ilea (Cheever, 1968, Tumer a kol., 2012). Cévní síť PP je navíc vlivem vajíček remodelována a dále expanduje (Tumer a kol., 2012). Pro pasáž vajíček schistosom do lumen střeva je nutná kooperace imunitního systému hostitele (Doenhoff a kol., 1978). Ve vajíčkách produkují nevyhlášená miracidia (5. – 6. den po naklazení, tedy v době pasážování vajíček do lumenu střeva) antigenní a lytické faktory (Andrade a kol., 2009, Doenhoff a kol., 1986) a kolem vajíček se shlukují regulační $CD4^+CD25^+$ T-lymfocyty (Yang a kol., 2007) a následně (i alternativně) střevní makrofágy (Herbert a kol., 2004). Vajíčka jsou u nálezů schistosomami hlavním patologickým agens (Modha a kol., 1998). Díky nim dochází ve střevní stěně k histopatologickým změnám (např. lokální snížení integrity pojiva) a ačkoli je reakce na přítomnost vajíček schistosom častěji difúzního charakteru, mohou se zde vytvářet i granulomatózní léze (Cheever, 1987, Tumer a kol., 2012).

Příčinou patologických změn střevní sliznice jsou i dospělí červi (*S. japonicum*), kteří přilehlými krevními cévami příliš nemigrují a raději se dlouhodobě vyskytují ve skupinách na jednom místě (Cheever a kol., 1978), ve kterém vznikají fokální léze (Cheever, 1987).

2.2.2.2 Nazofaryngeální lymfatický systém

Během dýchání se dostává NALT jako první do kontaktu s vdechnutým aerosolem a mikroorganismy. Zatímco anorganické mikročástice mohou být odstraněny mechanicky, proti patogenům invadujícím nazální sliznici musí zasáhnout imunitní systém (Chanová a Horák, 2007). U

ptáků je NALT tvořen nazální mukózou, laterálními nazálními žlázami a jejich sekrečními ducty. V nazální dutině se T-lymfocyty ($CD4^+$ a $CD8^+$) nacházejí nejvíce v respiračním epitelu nebo pod ním a dále v *lamina propria* (Ohshima a Hiramatsu, 2000). U kura se v laterálních nazálních žlázách a jejich ductech vyskytují lymfoidní folikuly B-lymfocytů obklopené $CD4^+$ lymfocyty a ohraničené epitelem (Bang a Bang, 1968, Ohshima a Hiramatsu, 2000). Efektorovými buňkami zasahujícími proti vajíčkům, prázdným vaječným obalům a miracidii *T. regenti* (volná miracidia byla prokázána od 19. dne p.i., Chanová a Horák, 2007) jsou v nazální mukóze nakažených ptáků 15. – 19. den p.i. lymfocyty, eosinofily a heterofily (Chanová a Horák, 2007, Kolářová a kol., 2001). Tyto leukocyty také tvoří granulomatózní léze obklopující vajíčka (od 22. dne p.i.). 17. den p.i. mohou být v nazální sliznici přítomné také hemorhagie (Chanová a Horák, 2007).

Mimo imunitní odpověď proti *T. regenti* v nazální dutině nakažených kachen (Chanová a Horák, 2007) byl výzkum interakce *T. regenti* a definitivních nebo náhodných hostitelů doposud zaměřen zejména na charakterizaci imunitní odpovědi proti larválním stádiím migrujícím kůží nebo centrální nervovou soustavou (Kouřilová a kol., 2004b, Lichtenbergová a kol., 2011). Práce o imunitní odpovědi nejen proti *T. regenti*, ale také proti jiným druhům schistosom, ve sliznici trávicí trubice hostitelů infikovaných alimentárně chybí.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo určit způsob migrace schistosomul *T. regenti* z trávicí soustavy do míchy alimentárně nakažených definitivních a náhodných hostitelů. Pro realizaci cíle byly stanoveny tyto dílčí úkoly:

- popsání migrace schistosomul *T. regenti* a *T. szidati* v alimentárně nakažených kachnách a myších během prvních 4, resp. 3, dnů od infekce,
- popsání migrace a vyprazdňování sekrečních produktů (vč. katepsinu B2) acetabulárních žláz cercárií *T. regenti* kachní kůží a jícnem *in vitro* během prvních 3 hodin po penetraci,
- sledování výskytu buněčných infiltrátů zasahující proti motolicím *T. regenti* a *T. szidati* v kůži a jícnu kachen, resp. myší, 1 den po infekci,
- objasnění proteolytické aktivity katepsinu B2 *T. regenti* proti mucinům, hlavní složce jícnového hlenu.

Výše uvedené úkoly byly realizovány pomocí histologických, imunohistochemických a částečně i biochemických metod. Migrace motolic nakaženými hostiteli byla dále zkoumána prohlížením vybraných vnitřních orgánů, které byly z kachen a myší pitvány ve stanovených časových intervalech.

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 Modelové organismy

Životní cyklus motolic *T. regenti* a *T. szidati* je v naší laboratoři udržován již mnoho let; mezhospitelé těchto motolic jsou vodní plži *Radix lagotis*, resp. *Lymnaea stagnalis*, definitivním hostitelem pak kachna domácí *Anas platyrhynchos* f. *domestica*.

4.1.1 Sběr cercárií

Mezhospitelští plži vylučují cercárie v kádinkách s odstátou vodou pod zdrojem světla. Pomocí světla lze také cercárie v kádince koncentrovat a následně odebrat přebytečnou vodu. Tímto způsobem byly cercárie získány pro veškeré pokusy. Cercárie byly vždy použity okamžitě po sběru.

4.2 Nákazy hostitelů

4.2.1 Jednorázové nákazy

4.2.1.1 Alimentární nákazy kachen cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati*

Nakažované kachny domácí *Anas platyrhynchos* f. *domestica* staré 10 – 14 dní (platí pro všechny typy pokusů s kachnami) byly před nákazou na 3 hodiny odstaveny od pití a potravy. Nákaza byla provedena pomocí Pasteurovy pipety a 2500 cercáriemi v cca 2 ml odstáté vody.

Nakažení ptáci byli dekapitací zabiti odpovědnou osobou 0,5, 1, 2, 3 a 4 dny po infekci (p.i.). Vypitvané orgány uvedené v tabulce 1 byly sbírány do PBS pufru (složení viz níže) a prohlíženy mikroskopem Olympus BX51 jako seškrabové nebo roztlakové preparáty. Co nejmenší části orgánů (o rozměrech v řádech několika milimetrů) byly v PBS pufru vždy také prohlíženy binokulární lupou (Nikon). Počet a lokalizace nalezených živých schistosomul byl zaznamenán. Stejným způsobem byly tělesné orgány infikovaných hostitelů prohlíženy ve všech dále zmiňovaných pokusech (platí i pro nákazy myší).

Tabulka 1. Přehled prohlížených orgánů kachen nakažených alimentárně cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati*.

	Druh motolice použité k nákaze kachen	
	<i>T. regenti</i>	<i>T. szidati</i>
Pitvané kachní orgány	jícen	jícen
	plíce	plíce
	játra	játra
	krční, hrudní, symsakrální míšň nervy	
	krční, hrudní, symsakrální mícha	

	prodloužená mícha	
	mozeček	
	optické laloky	
	mozkové hemisféry	

Složení PBS pufru (pH = 7,2):

- roztok A – 0,2 M Na₂HPO₄
- roztok B – 0,2 M NaH₂PO₄
- NaCl – 7 g

Pro požadované pH smícháme 360 ml roztoku A a 140 ml roztoku B, přidáme 7 g NaCl a doplníme na objem 1000 ml destilovanou vodou.

4.2.1.2 Alimentární nákazy kachen hepatopankreatů plžů *L. stagnalis*

Dva dny před vypitváním hepatopankreatů plžů *L. stagnalis* obsahujících cercárie *T. szidati* (nákazy cercáriemi *T. regenti* nevyloženými z hepatopankreatů plžů *R. peregra* námi nebyly provedeny, protože se jimi již zabývala K. Blažová, nepublikováno) byli plži kontrolně vyšetřeni na vylučování cercárií (viz kapitola 4.1.2). V pozitivním případě byl hepatopankreat izolován do SSS+ pufru (složení viz níže, podle Adema a kol., 1994), nabrán Pasteurovou pipetou s ustřiženým koncem (pro menší poškození celistvosti hepatopankreatu) a jedním hepatopankreatem byla nakažena kachna 3 hodiny odstavená od pití a potravy. Nakažené kachny byly pitvány 0,5, 1, 2 a 3 dny p.i. a byly u nich prohlíženy jícen, plíce a játra.

Složení SSS+ pufru (pH = 7,8, 110 – 120 mOsm):

- HEPES (Sigma) – 0,1192 g
- NaOH – 0,014 g
- NaCl – 0,2103 g
- KCl – 0,01491 g
- MgCl₂ – 0,019 g
- CaCl₂ – 0,0443 g
- destilovaná voda – 100 ml

4.2.1.3 Alimentární nákaza myši cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati*

Outbrední laboratorní myši byly před nákazou odstaveny od pití a potravy po dobu alespoň 2 hodin. K naze byla použita 15ml injekční stříkačka s gumovou hadičkou (Ø 1,5 mm) zasunutou do počáteční části jícnu myši. Infekční dávka byla 800 cercárií/myš v 0,2 – 0,3 ml odstáté vody.

Před pitvou (6, 12, 24 a 48 hodin, a dále 3 nebo 5 dní p.i.) byly myši opět odstaveny od pití a potravy po dobu 2 – 3 hodin a usmrceny cervikální dislokací odpovědnou osobou. Prohlížené orgány jsou uvedeny v tabulce 2. Jicny 4 myši nakažených cercáriemi *T. regenti* vypitvané 24 a 48 hodin p.i. byly histologicky zpracovány (viz kapitola 4).

Tabulka 2. Přehled prohlížených orgánů myši alimentárně nakažených cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati*.

	Druh motolice použité k naze myši	
	<i>T. regenti</i>	<i>T. szidati</i>
Pitvané myši orgány	jícen	jícen
	plíce	plíce
	játra	játra
	krční, hrudní, bederní míšň nervy	
	krční, hrudní, bederní mícha	
	prodloužená mícha	
	mozeček	
	optické laloky	
	mozkové hemisféry	

4.2.1.4 Alimentární nákazy cercáriemi *T. regenti* značenými CFSE

Při studiu migrace motolice *T. regenti* v alimentárně nakažených myších bylo celkem 9 myši BALB/c (stáří 4 – 6 měsíců) nakaženo cercáriemi fluorescenčně značenými CFSE („carboxyfluorescein succinimidyl ester“; Molecular Probes, Invitrogen). Tento ester je vhodný k dlouhodobému sledování značených buněk (např. lymfocytů) *in vivo* (Weston a Parish, 1990). U cercárií *T. regenti* se CFSE váže na povrch a především acetabulární žlázy (viz kapitola 4.2.1.4.1).

4.2.1.4.1 Inkubace cercárií/schistosomul *T. regenti* s CFSE

Inkubacemi cercárií nebo *in vitro* transformovaných schistosomul s roztoky CFSE (viz níže) byla hledána vhodná netoxická koncentrace CFSE pro značení cercárií, resp. schistosomul. Cercárie a schistosomuly transformované *in vivo*, nikoli *in vitro*, značené pomocí CFSE byly používány

v některých infekčních pokusech (viz kapitoly 4.2.1.4.2, 4.2.1.5 a 4.2.1.6). Inkubace také sloužily ke zjištění, jestli CFSE vydrží v těle červů po několik dní od značení. Samotné inkubace cercárií/schistosomul probíhaly podle následujících dvou postupů:

I. Postup inkubace *in vitro* transformovaných schistosomul v médiu s CFSE

- transformace cercárií na schistosomuly *in vitro* (podle Chanové a kol., 2009):
 - ponechání cercárií ve 45ml falkoně na ledu po dobu 1 hodiny
 - opatrné odebrání horních cca 40 ml vody
 - nasátí a opětovné vypuštění vody s cercáriemi (alespoň 20x) 10ml sterilní stříkačkou s jehlou (\varnothing 0,6 mm) – dojde k oddělení ocásků cercárií
 - přenesení cercárií do sterilní Petriho misky (\varnothing 3 cm)
 - přidání 3 ml SCM („schistosoma culture medium“) média 169 (složení viz, podle Basch, 1981)
 - koncentrování cercárií do středu Petriho misky jejím kroužením
 - výměna média (alespoň 3x)
- inkubace schistosomul ve 3 ml SCM média 169 s 15 μ l antibiotika Amfotericinu B (Lonza, výsledná koncentrace antibiotika v médiu byla 1,25 μ g/ml) a 0,5, 1 nebo 2 μ M CFSE (Molecular Probes, Invitrogen, příprava dle protokolu výrobce) v termostatu (37 °C, 5% CO₂ atmosféra) po dobu 7 a 11 dní (výměna antibiotika a média 1x za 24 hodin).

Složení SCM média 169 (275 mOsm):

- Basal medium Eagle (Gibco, Invitrogen , tekuté) – 1 l
- laktalbumin hydrolyzát (Sigma) – 1 g (1 g/l)
- D-glukóza (Sigma) – 1g (11,1 mM)
- hypoxantin (Sigma) – 0,5 ml (5×10^{-7} M)
- serotonin (Sigma) – 1 ml (10^{-6} M)
- inzulin (Sigma, práškový) – 1 ml (roztok o koncentraci 8 μ g/ml)
- hydrokortizon (Sigma) – 1 ml (10^{-6} M)
- trijodotyronin (Sigma) – 1 ml (2×10^{-7} M)
- MEM vitamíny (Sigma) – 5 ml (0,5x)
- Schneiderovo médium (Gibco, Invitrogen) – 50 ml (5% – v/v)
- HEPES (Sigma) – 2,4 g (10mM)
- fetální bovinní sérum (Sigma) – 100 ml (10% – v/v)
- NaOH – dle potřeby k úpravě pH na hodnotu 7,4

II. Postup značení cercárií pomocí CFSE a následná inkubace

- značení cercárií pomocí CFSE:
 - koncentrování cercárií v odstáté vodě v 15 ml falkoně svícením na její dno po dobu cca 10 vteřin
 - ponechání cercárií ve 2 ml odstáté vody odsáním přebytečné povrchové vody
 - smíchání CFSE (Molecular Probes, Invitrogen, příprava dle protokolu výrobce) o dvakrát větší koncentraci než je výsledná koncentrace použitá pro značení cercárií (0,5, 1, 2, 4, 8, 10 a 20 μ M CFSE) s odstátou vodou v jiné 15ml falkoně (objem finálního roztoku byl 2 ml)
 - smíchání obsahů obou falkon (z každé falkony 2 ml)
 - ponechání cercárií zakrytých hliníkovou fólií na ledu po dobu 3 hodin
 - promytí cercárií odstátou vodou (3x)
- transformace a inkubace po 4 dny jako v případě „Inkubace *in vitro* transformovaných schistosomul v médiu s CFSE“

4.2.1.4.2 Nákazy myší

Infekce myší cercáriemi fluorescenčně značenými CFSE (viz kapitola 4.2.1.4.1) probíhaly způsobem popsaným v kapitole 2.1.3, ale s odlišnou infekční dávkou – 1200 cercárií/myš. Infikované myši byly pitvány 18, 20, 24, 30 a 48 hodin po infekci a byly jim prohlíženy vnitřní orgány popsané v tabulce 2 a mezižeberní svalstvo. U 3 z 8 nakažených myší byl na roztlakových preparátech prohlížen hrudní koš po částech obsahujících 3 – 5 žeber.

4.2.1.5 Subkutánní nákazy myší schistosomulami *T. regenti* značenými CFSE

Z míchy perkutánně nakažené kachny (podle Kolářové a kol., 2010) byly schistosomuly vypitvané 4. den p.i. přendány do 8 μ M CFSE v PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1) ve sterilní Petriho misce (\varnothing 3 cm) a ponechány 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byl PBS pufr s CFSE nahrazen čistým PBS a schistosomuly byly krouživým pohybem koncentrovány, nasáty 1ml sterilní injekční stříkačkou s jehlou (\varnothing 0,6 mm) a dvěma myším injikovány subkutánně do blízkosti hrudní páteře (cca 30 schistosomul/myš). Myši byly pitvány 5. den p.i.

4.2.1.6 Perkutánní nákazy myší cercáriemi *T. regenti* značenými CFSE

Nákaza dvou myší v odstáté vodě (hloubka cca 7 mm) s cercáriemi značenými 20 μ M CFSE (viz kapitola 4.2.1.4.1) probíhala bez přítomnosti světla po dobu 45 minut. Infekční dávka byla 1500 cercárií/myš. Myši byly pitvané 5. a 11. den p.i. a byly prohlíženy mícha a *nervi ischiadici* (tyto nervy byly u dvou myší zpracovány histologicky viz kapitola 4).

Aby se zvýšila úspěšnost nákazy, byl tento způsob nákazy modifikován: nakažovány byly myši v anestezii (složení roztoku pro anestezii viz níže) a cercáriím bylo umožněno penetrovat kůži pouze jedné zadní končetiny ponořené v mikrozkumavce obsahující 1800 cercárií/myš a cca 2 ml odstáté vody.

Složení roztoku pro anestezii (1 ml):

- Rometar (Bioveta) – 0,1 ml
- Narketan 10 (Vétoquinol) – 0,2 ml
- sterilní fyziologický roztok (Mayrhafer Pharmazeutika) – 0,7 ml

Pro účely infikování byly myši intraperitoneálně uspané pomocí 1ml sterilní injekční stříkačky s jehlou (Ø 0,6 mm) a 100 µl roztoku pro anestezii. Po 7, 10 a 21 dnech p.i. byla prohlížena centrální nervová soustava a *nervus ischiadicus* penetrované končetiny myši. Tyto myšibylly nejprve hluboce uspané (200 µl roztoku pro anestezii), a poté byla provedena perfuze: po nastřížení pravé srdeční předsně byl do cévního systému levou komorou vpraven nejprve fyziologický roztok temperovaný na teplotu 40 °C s 0,2% (w/v) heparinem (Sigma), a následně vychlazený 4% paraformaldehyd (Fluka) v PBS (složení viz kapitola 4.2.1.1).

4.2.2 Opakované nákazy

4.2.2.1 Opakované nákazy kachen cercáriemi *T. regenti*

Byly provedeny dvě série opakovaných nákaz kachen cercáriemi *T. regenti*. V první sérii pokusů pokusu byli nakaženi ptáci staří 7 dní, v sérii druhé kachny staré 14 dní. Kachny byly infikovány vždy po 10 dnech 2000 cercárií (dávka pro poslední infekci je specifikována v tabulce 3). Počet a způsob nákaz kachen udává tabulka 3. Před každou nákazou byl kachnám odebrán vzorek krve, které pak L. Turjanicová (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra parazitologie) použila ke sledování změn hladin IgY metodou ELISA (viz diskuze).

Tabulka 3. Počet a způsob opakovaných nákaz kachen infikovaných cercáriemi *T. regenti* pro sledování vývoje buněčné imunitní odpovědi na histologických řezech jícnu a kůže.

Počet kachen	Způsob a množství nákaz	Infekční dávka při průběžných nákazách	Infekční dávka při poslední nálezce
1	4x perkutánně	2000 cercárií	4000 cercárií

2	3x perkutánně a počtvrté alimentárně	2000 cercárií	10000 (kachny poprvé nakažené ve věku 7 dní) nebo 20000 (kachny poprvé nakažené ve věku 14 dní)
1	1x perkutánně a podruhé alimentárně	2000 cercárií	10000 (kachny poprvé nakažené ve věku 7 dní) nebo 20000 (kachny poprvé nakažené ve věku 14 dní)
1	bez nákaz		

Nakažení ptáci byli 2. (u prvního série pokusů) nebo 1. den po poslední nákaze (u druhé série pokusů) usmrčeni a byl u nich pitván jícen, popř. kůže z plovacích blán. U jícnu byly rozlišovány hrudní a krční oddíly, ze kterých byly vybrány 2 či 3 vzorky, které byly stejně jako kůže histologicky zpracovány (viz kapitola 4).

4.2.2.2 Opakované nákazy myši cercáriemi *T. szidati*

Uspořádání tohoto pokusu (intervaly mezi nákazami, počet a typ nákaz, množství infikovaných zvířat) vycházelo z opakovaného nakažování kachen (viz kapitola 4.2.4.1), jak ukazuje tabulka 4, ale myši (BALB/c staré 4 měsíce) byly nakaženy motolicí *T. szidati*. Opakované perkutánní nákazy byly provedeny cercáriemi v odstáté vodě, ve které myši volně stály (200 cercárií/myš) po dobu 45 minut. Poslední nákaza byla buď alimentární (postup viz kapitola 4.2.1.3) nebo perkutánní – ponořením ucha myši v anestezii (viz kapitola 4.2.3.1) do mikroskopavky obsahující odstátou vodu a cercárie (uši představují relativně velkou plochu kůže a díky nepřítomnosti kostní tkáně se snadno histologicky zpracovávají). Myši byly pitvané 1 den p.i. a jejich jícny či uši, do kterých penetrovaly cercárie, byly dále histologicky zpracovány (viz kapitola 4).

Tabulka 4. Počet a způsob opakovaných nákaz myši infikovaných cercáriemi *T. szidati* pro sledování vývoje buněčné imunitní odpovědi na histologických řezech jícnu a kůže.

Počet myši	Způsob a množství nákaz	Infekční dávka při poslední nákaze
1	4x perkutánně	3000 cercárií
2	3x perkutánně a počtvrté alimentárně	3000 cercárií
1	1x perkutánně a podruhé alimentárně	3000 cercárií
1	2x perkutánně	3000 cercárií
1	bez nákaz	

4.3 Penetrace cercárií *in vitro*

4.3.1 Penetrace kachní kůže a jícnu *in vitro*

Jícen či kůže (z plovacích blan) získané z usmrcených kachen (stáří obvykle 2 týdny) byly naplny přes 15ml falkonu obsahující 3000 cercárií *T. regenti* tak, že cercáriím byla vystavena sliznice jícnu a vnější strana kůže. 15ml falkony byly dnem vzhůru zasunuty do 45ml falkon s větším průměrem, ve kterých byly 3 ml PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1) temperovaného na teplotu 37 °C. Následovala inkubace v termostatu ve 37 °C s 5% CO₂ atmosférou po dobu 20 minut. Poté se voda s cercáriemi, které doposud nepenetrovaly, odstranila (tím bylo zaručeno relativně stejné stáří schistosomul ve tkáni), falkony se 3x propláchly PBS pufrem a s novým PBS pufrem se pokračovalo v inkubaci po celkovou dobu 30, 60 a 180 minut od začátku pokusu. Po skončení inkubace byly tkáně/schistosomuly sbírané do PBS pufru. Celé schistosomuly byly následně barveny, tkáně bylo nejprve nutné histologicky zpracovat (viz kapitola 4). Vzorky tkání byly barveny hematoxylinem-eozinem (viz kapitola 4.3.2.1) nebo značeny lektiny (viz kapitola 4.3.2.3) či protilátkami (viz kapitola 4.3.2.4). Celé schistosomuly se barvily alizarínem (viz kapitola 4.3.1.1), lithium-karmínem (viz kapitola 4.3.1.2) nebo apomorfinem (viz kapitola 4.3.1.3). Pokusy byly zopakovány 3x a v každém pokusu bylo vyfoceno (kamerou napojenou na mikroskop Olympus BX51) prvních 10 nalezených schistosomul, které byly analyzovány, kategorizovány (viz tabulka 5) a statisticky vyhodnoceny.

4.3.2 Statistické vyhodnocení

Na doporučení A. Černíkové (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Ústav aplikací matematiky a výpočetní techniky) byl pro statistické vyhodnocení použit Chí-kvadrát test (v programu Microsoft Excel). Tímto testem byly testovány schistosomuly, resp. u nich vybrané kategorie (viz tabulka 5). Testovány byly vybrané kategorie schistosomul pocházejících z jícnu nebo kůže kachen inkubovaných 30, 60 nebo 180 minut. V rámci jednoho testu byly vždy testovány všechny 3 časové intervaly pro jednu tkáň najednou (např. schistosomuly z jícnu inkubovaného 30, 60 a 180 minut) nebo obě odlišné tkáně po jednotlivých časových intervalech (např. schistosomuly z jícnu a kůže inkubované 30 minut). Výsledky jednotlivých testů měly odhalit rozdíly v chování cercárií během penetrace a migrace kůže a jícnem kachen první 3 hodiny od penetrace. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %, a pokud byla p-hodnota nižší než 0,05, jednalo se o významný rozdíl. Byla-li p-hodnota číslo s 5 desetinnými místy, byla zaokrouhlena na 0,0001. Pokud vyšla p-hodnota 1,0, byla následně uvedena jako 0,999.

Tabulka 5. Přehled použitých barvení schistosomul (celých či na řezech), u kterých byly vybrané kategorie testovány Chí-kvadrát testem (viz kapitola 4.3.1). CA cirkumacetabulární, PA postacetabulární, ESP exkrečně-sekreční produkty, malé množství ESP exkrečně-sekreční produkty jsou přítomny v blízkosti cercárie/schistosomuly a často v prostoru mezi okolní tkání a tegumentem, značné množství ESP sekreční produkty jsou přítomné i mimo bezprostřední okolí tegumentu cercárie/schistosomuly, žlázy jsou intenzivně vyprazdňovány

Schistosomuly	Způsob barvení objektu	Objekty testované Chí-kvadrát testem	Kategorie testovaných objektů (schistosomuly/PA či CA žlázy)
celé	alizarín	anteriorní a posteriorní části CA žláz	buňky jednotlivých částí jsou s obsahem/bez obsahu
	lithium-karmín	PA žlázy	žlázy jsou plné/vyprazdňující se/prázdné
	apomorfin	CA i PA žlázy	žlázy jsou plné/vyprazdňující se/prázdné
na histologických řezech	hematoxylin-eozin	schistosomuly na řezu jícnem	lokalizace v jednotlivých vrstvách tkáně, poloha těla schistosomuly (kolmá/rovnoběžná s povrchem/jiná či nešlo určit), počet nalezených červů s neodhozeným ocáskem, penetrace tkáně samostatně/ve skupině (2 a víc cercárií)
	hematoxylin-eozin	schistosomuly na řezu kůží	
	lektin RCA-I	ESP v okolí schistosomuly	žádné/malé/značné množství sekrečních ESP v okolí schistosomul
	lektin PNA	ESP v okolí schistosomuly	

4.4 Histologické zpracování larválních stadií *T. regenti* a vzorků tkání

4.4.1 Fixace vzorků

Všechny vzorky tkání (zejména jícen a kůže) byly pro účely pokusů této práce fixovány Bouinovou tekutinou (Sigma) 24 – 48 hodin. Tato fixační tekutina je vhodná k fixaci měkkých tkání (např. trávicí soustavy), ale kyselinu pikrovou, která je jednou ze součástí této fixáže, je před dalším zpracováním nutné odstranit. Odstranění kyseliny pikrové se provádí promýváním tkání 75% etanolem tak dlouho, dokud se etanol nepřestane žlutě zabarvovat. Fixace tkání pro imunohistochemii 4% paraformaldehydem (PFA, viz kapitola 4.4.3.2.4.1) se neosvědčila a bylo od ní upuštěno.

4.4.2 Zalévání vzorků

4.4.2.1 Zalévání vzorků do parafínu

Vzorky tkání (nejčastěji kůže nebo jícnu) byly standardně zalévány do parafínu. Montování do parafínu se nám osvědčilo pro barvení vzorků hematoxylinem-eozinem (viz 4.3.2.1) a Giemsou (viz 4.3.2.2), i pro značení vzorků lektiny (viz 4.3.2.3) a protilátkami (viz 4.3.2.4). Odvodnění, a projasnění vzorku někdy vedlo k jeho smrštění, ztmavnutí či zvýšené křehkosti. Prosyncování vzorků navíc probíhá za vysokých teplot, které mohou pozměnit antigenní epitopy, na které se vážou protilátky.

Postup:

Vzorky tkání zbavené fixáže (viz kapitola 4.4.1) byly odvodněny lázněmi 70%, 96% a 100% etanolu vždy 3x po 30 minutách. Pak byly vzorky předány do xylenu (2x 15 minut) a následně do směsi xylen-parafín (Leica, Microsystems) na 15 minut. Následovalo vlastní prosyncování tkáně parafínem, který byl celkem 3x vyměněn (nejprve po 1 hodině, pak druhý den ráno a pak znovu po 1 hodině) při teplotě 56 °C. Poté byly vzorky předány do čistého parafínu v silikonové formě, ve které tuhly při pokojové teplotě. Vzorky byly krájeny na mikrotomu (Shandon Finesse ME) na řezy silné 7 – 9 µm pro klasickou histologii nebo 17 µm pro imunohistochemii.

4.4.2.2 Zalévání vzorků do JB-4 Plus

Do glykolmetakrylátové pryskyřice JB-4 Plus (Polysciences, Inc.) je vhodné zalévat velmi malé objekty (v našem případě cercárie). Na rozdíl od zalévání do parafínu (viz kapitola 4.2.1) se zhotovené řezy nemusí zavodňovat a je možné je ihned barvit.

Postup:

Po odstranění kyseliny pikrové z fixovaných cercárií (viz kapitola 4.4.1) byly cercárie promyty PBS (složení viz kapitola 4.2.1.1) a přemístěny do infiltračního roztoku (monomer A – 50 ml + benzoyl peroxid – 0,625 g). Následovalo zalití cercárií polymeračním roztokem (infiltrační roztok – 50ml, + roztok B – 2 ml) a centrifugování (centrifuga Eppendorf Minispin, rychlost otáček 0,8 G, 30

vteřin). Polymerace v želatinové kapsli probíhala při pokojové teplotě v temnu bez přístupu vzduchu po 24 hodin. Druhý den byla želatinová kapsle odstraněna a vzorek byl krájen na mikrotomu (Shandon Finesse ME) na řezy silné 4 nebo 10 μm . Aby se zabránilo možné oxidaci a znehodnocení řezů, byly tyto řezy barveny do dvou týdnů od jejich zhotovení.

4.4.3 Použité barvicí metody

4.4.3.1 Barvení acetabulárních žláz cercárií a schistosomul

Před barvením schistosomul histologickými barvivy uvedenými v této kapitole bylo nejprve ověřeno, že u schistosom barví acetabulární žlázy stejně jako v případě cercárií. Všechny pokusy byly provedeny 3x.

4.4.3.1.1 Alizarín

Ve vodě alizarín barví cirkumacetabulární (CA) žlázy živých cercárií *T. regenti* (Mikeš a kol., 2005). Schistosomuly *T. regenti* ale bylo nutné barvit v PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1), ve kterém se alizarín srážel. Jeho schopnost vázat se na CA žlázy tím nebyla ovlivněna. Pod modrým fluorescenčním světlem alizarín fluoreskuje. Tato vlastnost umožnila lepší rozlišení jednotlivých buněk CA žláz.

Příprava:

Alizarín (Sigma) byl připraven za varu jako nasycený vodný roztok, který byl před barvením cercárií a schistosomul naředěn 50x ve vodě (barvení cercárií) nebo PBS pufrem (barvení schistosomul).

Postup při barvení cercárií:

Barvicí roztok alizarínu byl přidán ke stejnému objemu vody obsahující cercárie v Petriho miskách (\varnothing 3 cm). Finální ředění nasyceného roztoku alizarínu bylo 100x. Cercárie se barvily 15 minut, načež byly přendány do čisté vody a pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX51).

Postup při barvení schistosomul:

Schistosomuly byly pro tento pokus získány z *in vitro* penetrované kachní kůže (doba viz kapitola 4.3). Celková doba inkubace cercárií s kůží byla 30 minut. Schistosomuly byly následně sbírány do PBS pufru v Petriho miskách (\varnothing 3 cm). Pak byl ke schistosomulám přidán barvicí roztok o objemu, který odpovídal objemu PBS pufru v Petriho miskách. Nasycený roztok alizarínu tak byl naředěn celkem 100x. Po 15 minutách barvení se schistosomuly přendaly do čistého PBS pufru a následně na podložní skla. Povrchové struktury schistosomul bránily u některých červů v jasném

pozorování CA žláz světelným mikroskopem, a proto byly schistosomuly obarvené alizarínem pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX51).

4.4.3.1.2 Lithium-karmín

Lithium-karmín barví bazofilní postacetabulární (PA) žlázy cercárií *T. regenti* usmrcených a fixovaných 70% etanolem (Mikeš a kol., 2005). Pro barvení schistosomul lithium-karmínem bylo nutné modifikovat postup používaný na cercáriích, protože 70% etanol, ve kterém se barví cercárie, schistosomuly bez povrchového glykokalyxu poškozuje. Stav vyprázdnění PA žláz schistosomul byl pozorován světelným mikroskopem.

Příprava:

Ve 100 ml nasyceného vodného roztoku uhličitanu lithného (Li_2CO_3) připraveného za laboratorní teploty bylo následně za varu rozpuštěno 2,5 g karmínu. Vzniklý roztok byl pro účely barvení červů ředěn 50x 70% etanolem.

Postup při barvení cercárií:

- fixace cercárií 70% etanolem – 30 minut
- barvení cercárií lithium-karmínem, barvicí roztok byl naředěn 70% etanolem obsahujícím cercárie v poměru 1:1, výsledné ředění zásobního roztoku 100x – 15 minut
- promývání schistosomul 70% etanolem – 5 minut

Postup při barvení schistosomul:

- sbírání schistosomul z kachní kůže inkubované s cercáriemi 30 minut (viz kapitola 4.3) do PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1)
- fixování schistosomul 4% PFA v PBS pufru – 30 minut
- permeabilizování povrchu schistosomul PBS pufrem s 0,3% Tritonem X-100 (Sigma) – 30 minut
- PBS – 5 minut
- promývání schistosomul 70% etanolem – 5 minut
- barvení schistosomul roztokem lithium-karmínu v 70% etanolu; objem barvicího roztoku byl totožný s objemem 70% etanolu (výsledné ředění zásobního roztoku 100x), ve kterém se nacházely fixované schistosomuly – 15 minut
- promývání schistosomul 70% etanolem – 5 minut

Do Petriho misek obsahujících jednotlivé lázně byly schistosomuly přendávány pomocí pipety.

4.4.3.1.3 Apomorfin

V cercáriích schistosom rodu *Schistosoma* (Bruckner a kol., 1974) a stejně tak i rodu *Trichobilharzia* lze apomorfinem obarvit CA i PA žlázy najednou. Každý typ žláz se barví jinou barvou. U cercárií *T. regenti* se CA žlázy barví zeleně a PA žlázy hnědě. Pořadí vyprazdňování acetabulárních žláz schistosomul bylo pozorováno pomocí světelného mikroskopu.

Příprava (podle Brucknera a kol., 1974):

K barvení cercárií i schistosomul byl použit roztok 1mM apomorfinu (Sigma) v PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1). Aby došlo k oxidaci apomorfinu, bylo nejprve nutné ponechat roztok 24 hodin na třepačce při pokojové teplotě.

Postup při barvení:

- sbírání schistosomul z kachní kůže inkubované s cercáriemi 30 minut (viz kapitola 4.3) do PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1), cercárie byly před barvením sbírány do odstáté vody
- fixování červů 4% PFA v PBS pufru – 1 minuta
- přendání červů z PBS pufru do 1,9 ml barvicího roztoku apomorfinu pomocí pipety se 100 μ l špičkou (naředění roztoku apomorfinu PBS pufrem v poměru 1:19) – 4 hodiny na třepačce
- promytí červů PBS pufrem

4.4.3.1.4 Fluorescenčně značené lektiny (FITC-lektiny)

Lektiny jsou proteiny neimunoglobulinové a neenzymatické povahy rozpoznávající sacharidové epitopy. Navázaný fluorochrom propůjčuje FITC-lektinům (Vector Laboratories, dál jen lektiny) fluorescenční vlastnosti. V našem případě byly lektiny použity na značení acetabulárních žláz celých cercárií *T. regenti* a jejich histologických řezů (viz kapitola 4.3.2.3). Seznam použitých lektinů je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6. Seznam lektinů, kterými byly značeny acetabulární žlázy cercárií *T. regenti*.

Lektin	Původ
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>
PSA	<i>Pisum sativum</i>
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i>
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>
WGA	<i>Triticum vulgare</i>

STA	<i>Solanum tuberosum</i>
-----	--------------------------

Modifikovaný postup Collinse a kol. (2011) pro značení acetabulárních žláz cercárií:

- fixování cercárií v 8% PFA (Fluka) v PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1)
- opláchnutí 0,3% Tritonem X-100 (Sigma) v PBS pufru (PBST)
- permeabilizování povrchu cercárií inkubací s proteinázou K (Qiagen, 2 µg/ml v roztoku pro permeabilizaci) + 0,5% (w/v) SDS (Serva) v PBST – 5 minut
- opáchnutí cercárií PBST
- blokování nespecifických vazeb blokačním roztokem: 5% (w/v) BSA (Sigma) + 0,3% Triton X-100 + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) v PBS pufru – 2 hodiny
- inkubování s lektiny (2 mg/ml v blokačním roztoku) – ve tmě při 4 °C přes noc
- opláchnutí PBS

4.4.3.2 Barvení řezů

4.4.3.2.1 Hematoxylin-eozin

Kombinace hematoxylinu a eozinu (H-E) patří mezi základní komplexní barvení histologických řezů. Bazofilní oblasti buněk (např. jádra) jsou barveny odstíny modré barvy, acidofilní oblasti (např. cytoplazma) se barví odstíny červené barvy. Při barvení parafinových řezů byl použit Ehrlichův kyselý hematoxylin (složení viz níže).

Složení Ehrlichova kyselého hematoxylinu:

- 2 g hematoxylinu
- 100 ml 96% etanol
- 100 ml destilované vody
- 10 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml glycerinu
- 3 g síranu hlinito-draselného ($KAl(SO_4)_2$)
- 0,4 g jodičnanu sodného ($NaIO_3$)

Postup barvení parafinových řezů:

- odparafinování – xylen I
– xylen II – obě lázně 15 minut
- zavodnění – 100% etanol
– 96% etanol

- 70% etanol – všechny lázně 2 minuty
- destilovaná voda – 30 vteřin
- barvení – Ehrlichův kyselý hematoxylin – 5 minut
 - promývání pod tekoucí vodovodní vodou – 5 minut
 - eozin (Polysciences, Inc.) – 30 vteřin
 - destilovaná voda – 30 vteřin
- odvodnění a projasnění řezů (každý krok dvě minuty) – 70% etanol
 - 96% etanol
 - 100% etanol
 - xylen I
 - xylen II
- montování do kanadského balzámu (Sigma)

4.4.3.2.2 Giemsa

Giemsa je polychromní barvivo barvící bazofilní substance různými odstíny modré barvy a acidofilní substance různými odstíny červené nebo fialové. Giemsou byly barveny např. myší jícny se schistosomulami.

Postup:

Těsně před barvením byl zásobní roztok Giemsy (Sigma) naředěn destilovanou vodou v poměru 1:9. Barvení zavodněných parafinových řezů (viz kapitola 4.3.2.1) probíhalo 20 minut. Poté byly řezy opláchnuty vodou a podle potřeby 3 – 5x ponořeny do lázně 100% etanolu. Následovaly dvě xylenové lázně po 2 minutách a montování do kanadského balzámu (Sigma).

4.4.3.2.3 FITC-lektiny

Lektiny byly použity k detekci exkrečně-sekrecních produktů (ESP) cercárií a schistosomul *T. regenti* na histologických řezech. Pro naše účely (detekování ESP acetabulárních žláz během migrace schistosomul kachní kůží a jícnem na histologických řezech) byla postačující reakce lektinů bez ověření její specifity, neboť naším záměrem nebylo charakterizovat sacharidové složení ESP. Na zavodněné parafinové řezy byl aplikován vždy 1 z lektinů RCA-I a PNA (Vector Laboratories). Tyto lektiny byly vybrány na základě odlišné reakce s různými částmi acetabulárních žláz cercárií (viz tabulka 13). Na histologických řezech kachním jícnem a kůží předtím inkubovaných s cercáriemi (viz kapitola 4.3) bylo studováno vyprazdňování acetabulárních žláz migrujících schistosomul.

Postup značení řezů lektiny:

- naředění lektinů trisovým pufrem (složení viz níže) v poměru 1:9 (jejich výsledná koncentrace byla 0,5 mg/ml)
- inkubace lektinů se zavodněnými řezy (viz kapitola 4.3.2.1) v temné vlhké komůrce při pokojové teplotě – 30 minut
- opláchnutí řezů trisovým pufrem
- promývání řezů v trisovém pufru v zakryté kyvetě na laboratorní třepačce – 5 minut
- osušení buničitou vatou
- pozorování řezů po přidání Vectashield (Vector Laboratories)

Složení trisového pufru (1000 ml):

- Trizma base – 2,423 g (Sigma)
- NaCl – 8,75 g

Před upravením výsledného objemu roztoku bylo nutné pomocí koncentrované HCl upravit pH na požadovanou hodnotu 7,8.

4.4.3.2.4 Značení protilátkami

Specifickými protilátkami lze na histologických řezech prokázat přítomnost antigenů. Pro lepší pochopení role ESP během invaze kachního jícnu a kůže *in vitro* byl na histologických řezech těmito tkáněmi obsahujícími migrující schistosomuly detekován katepsin B2 *T. regenti* (TrCB2). Použité myši (kmen BALB/c) protilátky proti rekombinantnímu TrCB2 byly připraveny Dolečkovou a kol. (2009) za účelem imunodetekce TrCB2 v acetabulárních žlázách cercárií *T. regenti*. Po získání pozitivního séra byla autory ověřena funkčnost protilátek pomocí SDS-PAGE elektroforézy homogenátu cercárií a schistosomul *T. regenti* a následně imunodetekce TrCB2 na Western blotu.

Současně s inkubací s pozitivním myším sérem byly prováděny také kontrolní inkubace histologických řezů:

- s negativním myším sérem (dar od T. Macháčka, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra parazitologie) a sekundárními protilátkami (typy a výrobci použitých sekundárních protilátek jsou uvedeny v postupech jednotlivých značení)
- s PBS pufrem (místo pozitivního séra) a sekundárními protilátkami (složení PBS pufru viz kapitola 4.2.1.1)
- pouze s PBS pufrem

4.4.3.2.4.1 Značení parafinových řezů

Vzorky kůže a jícnu kachny penetrované cercářiemi *in vitro* byly po ukončení inkubace (viz kapitola 4.3) fixovány Bouinovou tekutinou (viz kapitola 4.4.1). Zkušebně bylo také provedeno značení parafinových řezů vzorků fixovaných čerstvým 4% PFA, ze kterých byl po 24 hodinách fixace PFA vymyt PBS pufrem (3x 30 minut, složení viz kapitola 4.2.1.1). Na zhotovených řezech byly následně antigenní epitopy odmaskovány zahříváním řezů v Tris-EDTA pufru (složení viz níže) v mikrovlnné troubě (500 W) po dobu 20 minut. Při použití fixace 4% PFA byl signál dokazující přítomnost katepsinu B2 na řezech slabý a od fixace vzorků paraformaldehydem bylo upuštěno.

Složení Tris-EDTA pufru (pH = 7,8):

- 10 mM Trizma base (Sigma)
- 1 mM EDTA (Sigma)

Po namíchání je nutné upravit hodnotu pH pomocí koncentrované HCl.

Postup značení řezů vzorků fixovaných Bouinovou tekutinou:

- 2x xylenová lázeň – každá 15 minut
- lázeň 100% etanolu – 2 minuty
- lázeň 96% etanolu – 2 minuty
- lázeň 3% H₂O₂ v metanolu – 30 minut
- lázeň 96% etanolu – 2 minuty
- lázeň 70% etanolu – 2 minuty
- opláchnutí řezů destilovanou vodou – 30 vteřin
- blokování nespecifických vazeb – 5% (v/v) negativní kozí sérum (Sigma) v PBS pufru ve vlhké komůrce – 2 hodiny
- inkubování řezů s pozitivním myším sérem (ředěné PBS pufrem v poměru 1:200) ve vlhké komůrce ve 4 °C – přes noc
- promytí řezů PBS pufrem – 3x 5 minut
- inkubování řezů se sekundárními protilátkami (Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Molecular Probes, ředěné PBS pufrem v poměru 1:5000)
- promytí řezů PBS pufrem – 3x 5 minut
- pozorování řezů po přidání Vectashield (Vector Laboratories)

4.4.3.2.4.2 Značení řezů zalitých v JB-4

Pro ověření negativního vlivu parafínu na detekci TrCB2 protilátkami uvnitř PA žláz cercárií byly tyto protilátky inkubované i s řezy zalitými v JB-4 Plus (viz 4.3.2.4.1).

Modifikovaný postup dle Dolečkové a kol. (2009):

- blokování endogenní peroxidázy lázní 3% H₂O₂ v metanolu – 30 minut
- blokování dalších nespecifických reakcí a možné peptidolytické aktivity (některá z látek, které jsou součástí produktů acetabulárních žláz, by mohla odstříhávat navázané protilátky) blokačním roztokem: 5% (w/v) odtučněné sušené mléko + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) + 0,1% (w/v) laminarin (Sigma, v PBS), + Complete Mini Protease Inhibitor Cocktails (Roche, dle protokolu výrobce) v PBS pufru (složení viz kapitola 4.2.1.1) ve vlhké komůrce přes noc ve 4 °C
- inkubování řezů s pozitivním myším sérem (ředěné PBS puftrem v poměru 1:50) s 2% (w/v) BSA (Sigma) + 0,05% Tween 20 v PBS pufru – 90 minut
- promytí PBS puftrem – 3x 10 minut
- inkubování řezů se sekundárními protilátkami (Anti-mouse IgG-HRP, Sigma, ředěné PBS puftrem v poměru 1:500) při pokojové teplotě – 45 minut
- promytí PBS puftrem – 3x 5 minut
- inkubování řezů se substrátem DAB+ (Dako, namíchan dle pokynů výrobce) – 5 minut (reakci je nutné sledovat pod mikroskopem)
- zastavení reakce v lázni destilované vody
- montování do kanadského balzámu (Sigma)

4.5 Proteolytické štěpení mucinů

Rekombinantní katepsin motolice *T. regenti* (TrCB2) v citrát-fosfátovém pufru (CPB, složení viz 5.1) motolice *T. regenti* (TrCB2), byl získán od H. Dvořákové (Přírodovědecká fakulta Karlovy Univerzity v Praze, katedra parazitologie).

4.5.1 Měření koncentrace TrCB2

K měření koncentrace TrCB2 byl použit Quant-IT Protein Assay Kit (Invitrogen). Měření bylo prováděno po dvojicích s 1, 2,5 a 5 µl zásobního roztoku TrCB2 (v CPB pufru, složení viz níže) za použití černých 96-jamkových destiček (Nunc) a fluorometru Schoeller Infinite M200 vybaveného programem Magellan 7,1. Měření bylo provedeno dvakrát. Při prvním měření byly naměřeny hodnoty nad rámec možností měření („overflow“), při druhém jsme proto nepracovali s původním zásobním roztokem TrCB2, ale s 10x ředěným roztokem. V programu Microsoft Excel byla z hodnot získaných ve druhém měření pomocí křivky standardu stanovena koncentrace zásobního roztoku TrCB2.

Příprava 50mM citrát/100 mM fosfátového pufru (CPB, pH = 6):

- roztok A – 0,1 M kyselina citrónová
- roztok B – 0,2 M Na₂HPO₄
- destilovaná voda

Pro dosažení CPB pufru s pH 6 (optimální pH TrCB2, Dolečková a kol., 2009) bylo smícháno 17,9 ml roztoku A a 32,1 ml roztoku B. Vzniklý roztok se destilovanou vodou doplnil do 100 ml.

4.5.2 Měření proteolytické aktivity TrCB2

Postup:

Do každé jamky 96-jamkové černé destičky (Nunc) bylo napipetováno 100 μ l CPB (složení viz kapitola 4.5.1) s DTT (Sigma, výsledná koncentrace DTT byla 4 mM). Ihned po přidání fluorogenního substrátu Z-Phe-Arg-AMC (Bachem, finální koncentrace 50 μ M) byla měřena peptidázová aktivita TrCB2 pomocí fluorometru Schoeller Infinite M200 s množstvím TrCB2 0,5, 1 a 2 μ g/jamku v CPB pufru (finální objem v 1 jamce byl 200 μ l). Měření fluorescence uvolňovaného AMC bylo prováděno v intervalech 2 minut po celkovou dobu 30 minut při pokojové teplotě (excitační vlnová délka – 355 nm, emisní vlnová délka – 460 nm).

4.5.3 Separace frakcí myelinu

Peptidázová aktivita TrCB2 byla také ověřena analýzou štěpů MBP (myelin basic protein, Sigma) na SDS-PAGE elektroforéze (Dolečková a kol., 2009).

Postup inkubace TrCB2 s MBP:

Katepsin B2 *T. regenti* ředěný CPB puftrem (složení viz kapitola 4.5.1) v poměru 1:100 při finální koncentraci TrCB2 0,02 μ g/ μ l byl inkubován s MBP o výsledné koncentraci 0,2 μ g/ μ l v 50 μ l CPB pufru obsahujícím DTT (Sigma) o výsledné koncentraci 2mM nebo 100 μ M E-64 (Sigma) o výsledné koncentraci 10 mM. Před zahájením inkubace ve 37°C vodní lázni (Thermomixer Comfort, Eppendorf) byl do zkumavky s CPB puftrem, TrCB2 a DTT nebo E-64 přidán MBP vždy jako poslední 15 minut po zmíněných látkách. Po 1 a 3 hodinách od začátku inkubace, a také druhý den ráno bylo z mikrozkušavek odebráno vždy 10 μ l, které byly zamrazeny a následně analyzovány SDS-PAGE elektroforézou (viz kapitola 4.5.3.1).

4.5.3.1 SDS-PAGE elektroforéza

Postup:

Alikvoty frakcí MBP (Sigma) získaných inkubací s TrCB2 (viz kapitola 4.5.3) byly smíchány s neredukujícím vzorkovým pufrům – 65 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 10% glycerol a bromfenolové modři o výsledné koncentraci 1 mg/ml – v poměru 4:1 a analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Bio-Rad) na 15% polyakrylamidových gelech o tloušťce 0,75 mm. Dělení proběhlo za konstantního napětí (PowerPack Universal™, Bio-Rad) 150 V (pro jeden gel) nebo 200 V (pro dva gely) v elektrodovém pufru Tris/Glycin/SDS Buffer (Bio-Rad) v Mini-Protean® 3 Cell (Bio-Rad). Jako standardy byly použity Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad) obsahující spektrum proteinů od 2 do 250 kDa. Gely byly barveny Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Electrophoresis) a foceny pomocí skeneru GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

4.5.4 Dot bloty

Inkubací dot blotů (substrátových polyakrylamidových gelů, dál jen gelů) obsahujících muciny (složky hlenu kryjící sliznici trávicí soustavy) s TrCB2 bylo zjišťováno, zda je tento enzym schopný muciny proteolyticky rozštěpit. Složení gelů bylo podobné složení 10% separačních gelů (viz níže), ale substrátové gely navíc obsahovaly 1% substrátu (gely s 0,1% substrátu se osvědčily méně). Jako kontroly sloužily gely obsahující 1% želatinu. Gely byly barveny buď Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo PAS reakcí. Barvení gelů pomocí PAS reakce (modifikovaný postup podle Dubray a Bezard, 1982 viz níže), kterou se prokazují polysacharidy, se neosvědčilo a nebylo proto dále používáno. Po obarvení byly gely foceny pomocí skeneru GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

Složení 1% substrátových gelů:

- polyakrylamid (Bio-Rad) – 1 ml
- CPB se 40,3 mg mucinu/želatiny (výsledná koncentrace substrátu v gelu byla 10 mg/ml) – 3 ml
- Temed (Sigma) – 2,5 µl
- 10% (w/v) peroxodisíran amonný – 25 ml

Postup inkubace TrCB2 s gely:

- inkubování gelů s 10 µl kapky CPB pufru (složení viz kapitola 4.5.1) obsahující TrCB2 o výsledné koncentraci 1 mg/ml a DTT (Sigma) o výsledné koncentraci 2 mM – ve vlhké komůrce přes noc při teplotě 37 °C
- odmytí enzymu 0,3% Tritonem X-100 (Sigma) v destilované vodě (2x 10 minut na laboratorní třepačce)
- barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Electrophoresis)

- uskladnění gelů v destilované vodě

Modifikovaný postup barvení gelů podle Dubray a Bezard (1982):

- ponoření gelů do 7,5% kyseliny octové – 30 minut
- ponoření gelů do 0,2% kyseliny perjodisté – 1 hodina ve 4 °C
- přendání gelů do Schiffova činidla (Sigma) – 1 hodina ve 4 °C
- ponoření gelů do 7,5% kyseliny octové – 1 hodina
- uskladnění gelů v destilované vodě

5. VÝSLEDKY

5.1 Fluorescenční značení cercárií a schistosomul *T. regenti*

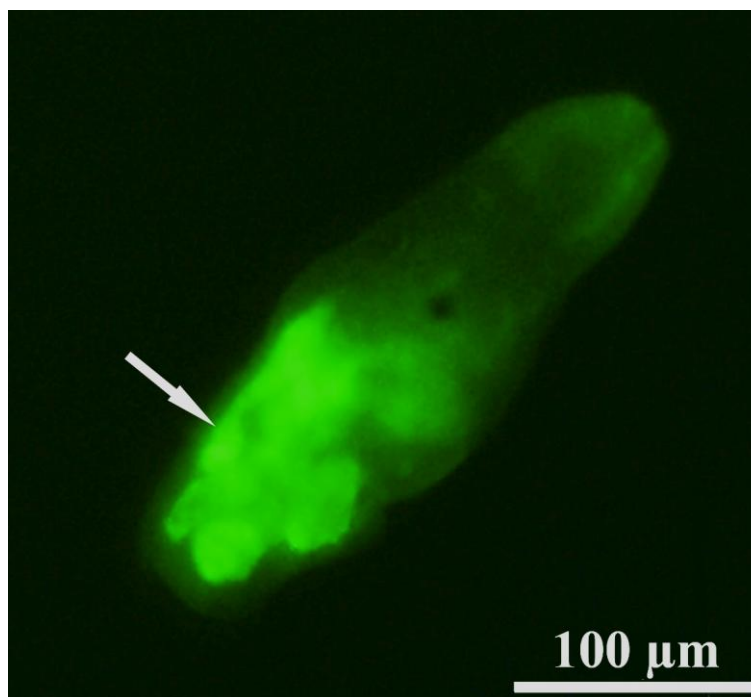
Migrace schistosomul náhodným hostitelem byla studována z pitvaných orgánů myši. Myši byly nakaženy cercáriemi nebo schistosomulami. Tato larvální stadia byla u některých infekčních pokusů před nákazou fluorescenčně značena pro jejich snadnější nalezení v prohlížené tkáni a odlišení od okolních objektů (např. krevních sraženin).

5.1.1 Značení *in vitro* transformovaných schistosomul pomocí CFSE

Schistosomuly transformované *in vitro* byly inkubovány v médiu obsahujícím CFSE. Tyto pokusy byly provedeny, aby bylo zjištěno, zda po několika dnech inkubace zůstane CFSE uvnitř těl schistosomul. Roztokem o výsledné koncentraci CFSE 0,5 μM byly schistosomuly značeny velmi slabě. S koncentracemi 1 a 2 μM CFSE byly získány živé schistosomuly, které si v těle udržely tolik CFSE, že poskytovaly signál i po 11 dnech inkubace. Schistosomulám se CFSE vázal převážně na penetrační žlázy a povrch.

5.1.2 Značení cercárií pomocí CFSE s následnou transformací *in vitro* a inkubací

Značení cercárií pomocí CFSE následované transformací na schistosomuly *in vitro* a jejich inkubací bylo provedeno za účelem stanovení netoxické koncentrace, při které by CFSE zároveň poskytovalo dostatečný signál i uvnitř červů několik dní po odvržení glykokalyxu. Značení cercárií probíhalo s nejlepšími výsledky ve vodném roztoku o výsledné koncentraci CFSE 20 μM . I takto vysoká koncentrace CFSE nebyla pro cercárie toxická. Po následné transformaci *in vitro* byl CFSE navázán na penetračních žlázách schistosomul, a to i po 4 dnech inkubace (viz obrázek 1).



Obrázek 1. Inkubovaná schistosomula stará 4 dny s fluorescenčně svítícími acetabulárními žlázami značenými pomocí 20μM CFSE. Šipka acetabulární žlázy.

5.2 Migrace schistosomul nakaženými hostiteli

5.2.1 Alimentární nákazy kachen cercářiemi *T. regenti* a *T. szidati*

Prohlížením pitvaných orgánů byla studována migrace motolic *T. regenti* a *T. szidati* v alimentárně nakažených kachnách během prvních 5, resp. 4, dní po infekci. Cercárie *T. regenti* v alimentárně nakažených kachnách penetrují stěnu ústní dutiny, jazyk, hltan a jícen. Jícen schistosomuly opouští nejčastěji 24 hodin p.i. V čevech migrujících z jícnu míšními nervy byla nalezena granula podobná pozřené nervové tkáni (viz obrázek 3). Míšními nervy schistosomuly migrují do míchy kachny, ve které se vyskytují od 2. dny p.i. Během této doby některé schistosomuly invadují prodlouženou míchu. V mozku dále migrují mozečkem, optickými laloky a hemisférami. Třetí den po infekci jsou schistosomuly nacházeny také v plicích.

Tabulka 7. Migrace schistosomul *T. regenti* v kachnách nakažených alimentárně cercářiemi. den p.i. den po infekci, hod p.i. hodina po infekci, X 1-10 schistosomul, XX 11-50 schistosomul, XXX 51 a víc schistosomul, n/a údaje nejsou dostupné

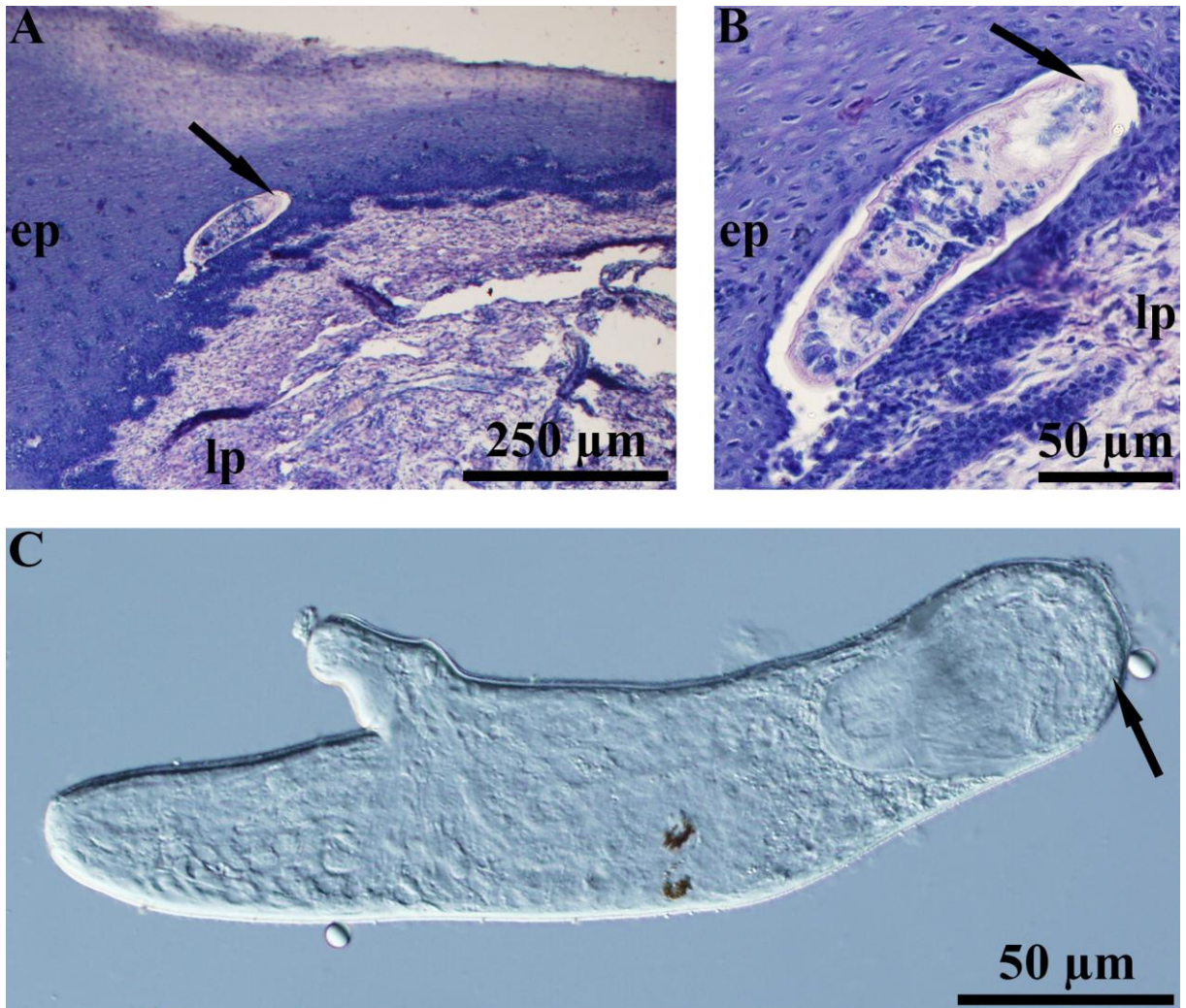
	12 hod p.i.	1 den p.i.	2 dny p.i.	3 dny p.i.	4 dny p.i.
ústní dutina	X	0			
jazyk	X	0			
hltan	X	X	0	0	0

jícen	X	XX	X	0	0
mezižeberní svalovina	n/a	n/a	0	n/a	n/a
pľíce	0	0	0	X	0
játra	n/a	n/a	0	n/a	n/a
krční míšňí nervy	0	0	X	X	0
hrudňí míšňí nervy	0	X	X	X	0
synsakraľňí míšňí nervy	0	0	X	0	0
krční mícha	0	0	X	X	XXX
hrudňí mícha	0	0	XX	XX	XX
synsakraľňí mícha	0	0	XX	X	X
prodloužená mícha		0	X	XX	XX
mozeček				0	X
optické laloky				0	X
hemisféry				0	X
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených kachen	27/2	52/3	86/4	99/2	338/3

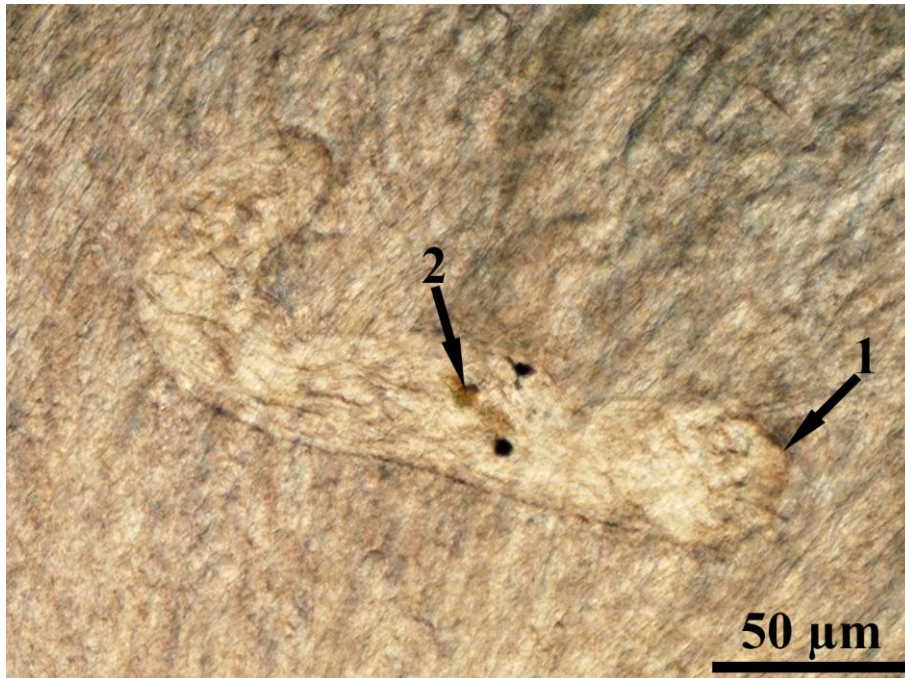
Trichobilharzia szidati opouští jícen kachen po 12 hodinách p.i. a následně migruje žilní krví do pľíc, ve kterých se schistosomuly objevují 2. den p.i. a setrvávají zde i 3. den p.i. K invazi jater definitivního hostitele během prvních 3 dnů p.i. nedochází.

Tabulka 8. Migrace schistosomul *T. szidati* v kachňách nakažených alimentárně cercáriemi. den p.i. den po infekci, X 1-10 schistosomul, XX 11-50 schistosomul

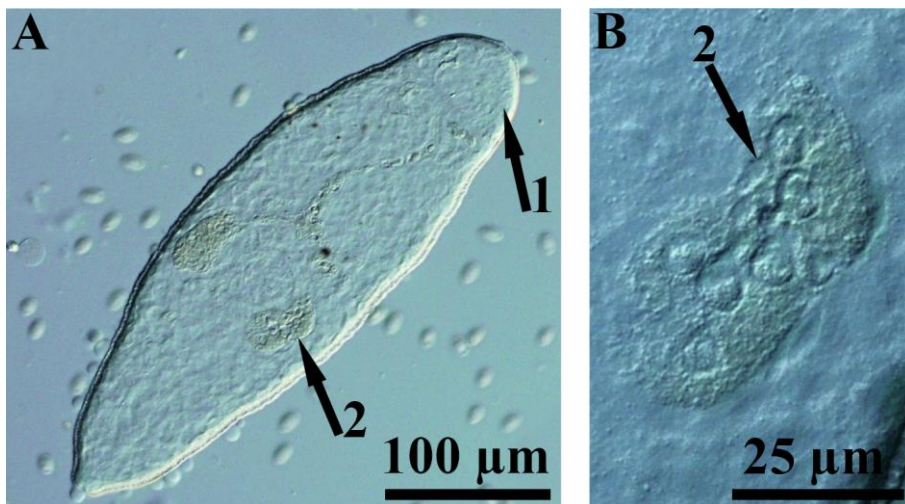
	0,5 dne p.i.	1 den p.i.	2 dny p.i.	3 dny p.i.
jícen	XX	0	X	0
pľíce	0	0	XX	XX
játra	0	0	0	0
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených kachen	16/1	0/2	17/1	18/1



Obrázek 2. *Schistosomula T. regenti* migrující jazykem kachny nakažené alimentárně cercáriemi, 12 hodin p.i. **A, B:** schistosomula na podélném řezu jazykem, H-E. **C:** schistosomula z povrchu jazyka. **ep** epitel, **lp** lamina propria, **šipka** apikální konec červa



Obrázek 3: *Schistosomula T. regenti* na roztlakovém preparátu 3. hrudního nervu kachny nakažené alimentárně cercáriemi, 2 dny p.i. 1 apikální konec schistosomuly, 2 pravděpodobně střevní obsah



Obrázek 4. *Schistosomula T. szidati* z plic alimentárně nakažené kachny, 2 dny od nákazy. **A:** celkový pohled na schistosomulu. **B:** střevní větev s pozřitou potravou. 1 apikální konec schistosomuly, 2 střevní větev s pozřitou potravou

5.2.2 Alimentární nákazy kachen hepatopankreaty infikovaných plžů *L. stagnalis*

Migrace schistosomul motolice *T. szidati* byla studována také v kachnách alimentárně nakažených hepatopankreaty plžů *L. stagnalis* obsahujícími cercárie *T. szidati*. Tyto nákazy byly uskutečněny s cílem zjistit, zda se DH může nakazit i po pozření infikovaného meziphostitele. Schistosomuly jsou v nakažených kachnách schopné migrovat z jícnu žilní krví do plic, kde se jich větší počet nachází 3. den p.i. V játrech schistosomuly nalezeny nebyly.

Tabulka 9. Migrace schistosomul *T. szidati* v kachnách nakažených alimentárně hepatopankreaty infikovaných plžů *L. stagnalis*. den p.i. den po infekci, hod p.i. hodina po infekci, X 1-10 schistosomul, XX 11-50 schistosomul

	12 hod p.i.	1 den p.i.	2 dny p.i.	3 dny p.i.
jícen	XX	X	X	0
plíce	0	0	X	XX
játra	0	0	0	0
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených kachen	16/1	8/1	9/2	23/1

5.2.3 Alimentární nákazy myší cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati*

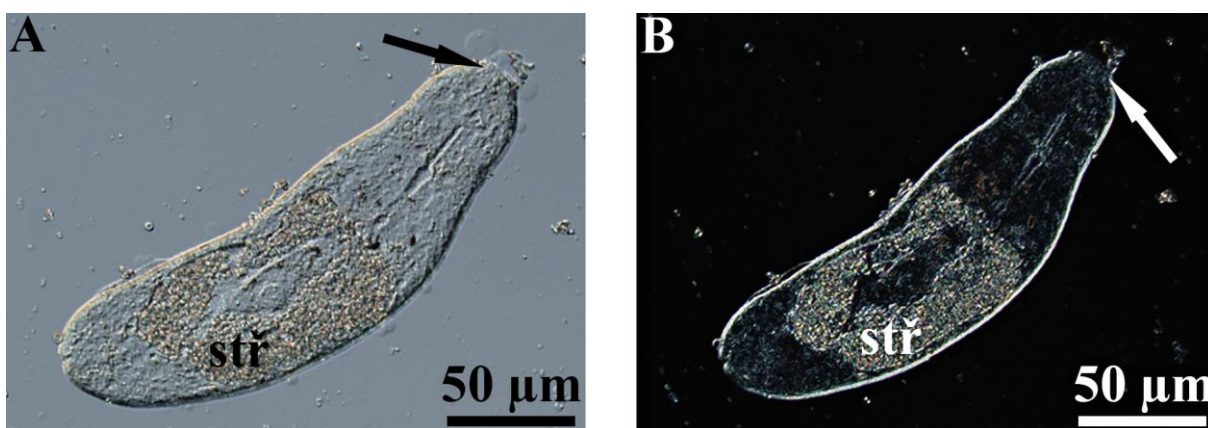
Migrace schistosomul *T. regenti* a *T. szidati* byla studována i v náhodných hostitelích, myších, nakažených alimentárně cercáriemi. Nákazy myší hepatopankreaty infikovaných plžů nebyly možné ani Pasteurovou pipetou, ani injekční stříkačkou s tenkou gumovou hadičkou, a nebyly proto provedeny.

V jícnu nakažených myší se schistosomuly *T. regenti* nacházejí do 2 dnů p.i. Následně migrují míšními nervy do míchy, kterou invadují 2. den p.i. V alimentárně nakažených myších se 5. den p.i. vyskytují i v mozku.

Tabulka 10. Migrace schistosomul *T. regenti* v myších nakažených alimentárně cercáriemi. den p.i. den po infekci, hod p.i. hodina po infekci, X 1-10 schistosomul, XX 11-50 schistosomul, „X“ 1-10 mrtvých schistosomul, n/a údaje nejsou dostupné, T4 4. hrudní nerv.

	6 hod p.i.	12 hod p.i.	1 den p.i.	2 dny p.i.	5 dní p.i.
jícen	XX	XX	XX	0	0
plíce	0	0	0	X	X
mezižeberní svalovina	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
krční míšní nervy	0	0	0	0	0

hrudní míšňní nervy	0	0	0	„X“ (T4)	0
bederní míšňní nervy	0	0	0	0	0
krční mícha	0	0	0	X	X
hrudní mícha	0	0	0	0	X
bederní mícha	0	0	0	0	X
prodloužená mícha	0	0	0	0	X
mozeček	0	0	0	0	0
optické laloky	0	0	0	0	0
hemisféry	0	0	0	0	0
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených myší	19/2	41/2	31/3	13/3	12/1



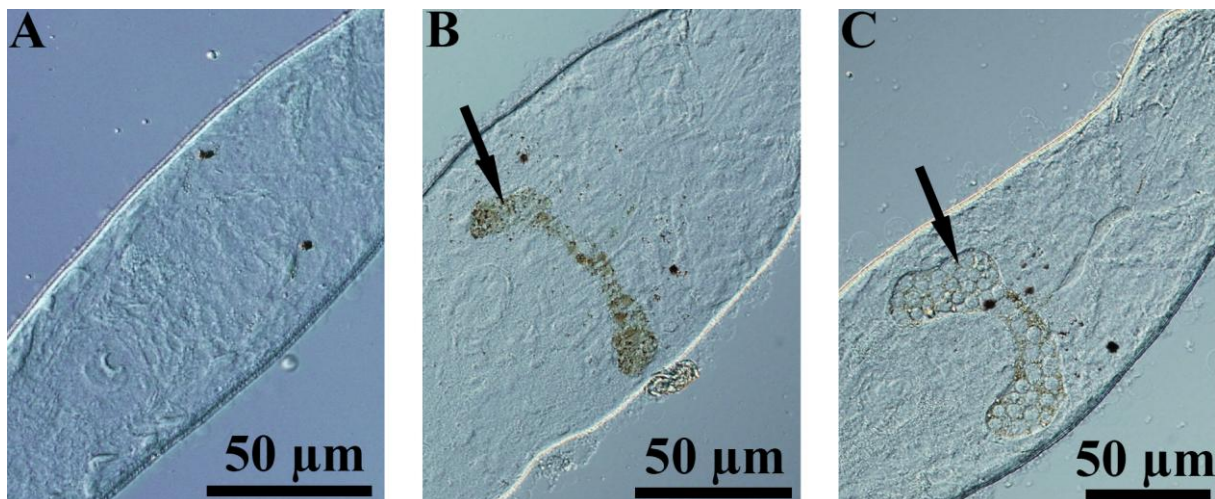
Obrázek 5. Schistosomula *T. regenti* nalezená v hrudní míše myši nakažené alimentárně 5 dní p.i. **A, B:** červ pozorovaný světelnou mikroskopií. **B:** negativní snímek pro lepší znázornění střevního obsahu. **stř** střevní větve, **šipka** apikální konec schistosomuly

Schistosomuly *T. szidati* migrují v myších nakažených alimentárně z jícnu, kde jsou nacházeny do 1 dne p.i., do plic (výskyt 2 – 3. den p.i.). V myších 2. den p.i. invadují také játra. Schistosomuly nalezené 2. den p.i. v jícnu měly prázdná střeva. Pozřená potrava ve střevech stejně starých schistosomul z jater a plic se lišila.

Tabulka 11. Migrace schistosomul *T. szidati* v myších nakažených alimentárně cercáriemi. **den p.i.** den po infekci, **hod p.i.** hodina po infekci, **X** 1-10 schistosomul, **XX** 11-50 schistosomul

	6 hod p.i.	12 hod p.i.	1 den p.i.	2 dny p.i.	3 dny p.i.
jícen	XX	XX	X	0	0

plíce	0	0	0	X	X
játra	0	0	0	X	0
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených myší	17/1	14/1	8/2	15/2	1/1



Obrázek 6. Odlišný střevní obsah schistosomul *T. szidati* z různých tkání myší nakažených alimentárně cercáriemi, 2 dny p.i. **A:** schistosomula ze sliznice jícnu. **B:** schistosomula z plic. **C:** schistosomula z jater. šipka střevní větev

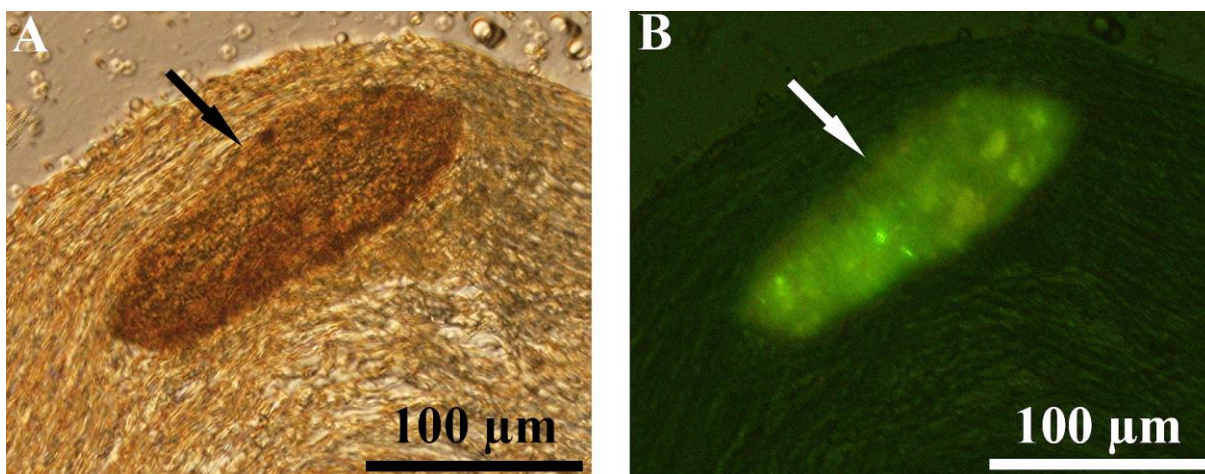
5.2.4 Alimentární nákazy myší cercáriemi *T. regenti* značenými CFSE

Fáze migrace, kdy schistosomuly *T. regenti* migrují periferními nervy náhodného hostitele, byla zkoumána také na myších (kmen BALB/c) nakažených alimentárně cercáriemi značenými pomocí fluorescenčního CFSE. Ve tkáni pitvaných orgánů tak bylo možné schistosomuly snadněji odlišit od okolních objektů (např. krevních sraženin) a přesněji určit, kudy červi migrují. Všechny schistosomuly nalezené v míšních nervech (18 – 48 hodin p.i.) a mezižební svalovině (18. hodin p.i.) myší byly mrtvé.

Tabulka 12. Migrace schistosomul *T. regenti* v myších nakažených alimentárně cercáriemi značenými CFSE. hod p.i. hodina po infekci, X 1-10 schistosomul, XX 11-50 schistosomul, „X“ 1-10 mrtvých schistosomul

	18 hod p.i.	20 hod p.i.	24 hod p.i.	30 hod p.i.	48 hod p.i.
jícen	XX	XX	X	0	X
plíce	0	0	0	0	XX

mezižeburní svalovina	„X“	0	0	0	0
krční míšňní nervy	0	0	0	0	0
hrudňní míšňní nervy	0	0	„X“	0	„X“
bederní míšňní nervy	0	0	0	0	0
krční mícha	0	0	0	0	6
hrudňní mícha	0	0	0	0	0
bederní mícha	0	0	0	0	0
prodloužená mícha	0	0	0	0	0
celkem nalezených schistosomul v celkovém počtu nakažených myší	13/1	24/1	3/2	0/1	29/4



Obrázek 7. Porovnání světelné a fluorescenční mikroskopie při pozorování schistosomul uvnitř 5. hrudňního nervu myší nakažené alimentárně cercáriemi značenými pomocí CFSE. A, B: mrtvá schistosomula 1 den p.i. Světelná (A), resp. fluorescenční (B), mikroskopie. šipka schistosomula

5.2.5 Subkutánní nákazy myší schistosomulami *T. regenti* značenými CFSE

Ve snaze zjistit, zda se CFSE udrží ve značených schistosomulách vyskytujících se několik dní uvnitř hostitele, byly provedeny subkutánní nákazy myší schistosomulami transformovanými *in vivo* a následně značenými pomocí CFSE. Dvě nakažené myší byly pitvané 5 dní p.i.; celkem bylo nalezeno pouze 5 mrtvých schistosomul a od tohoto typu nálezů bylo proto dále upuštěno.

5.2.6 Perkutánní nákazy myší cercáriemi *T. regenti* značenými CFSE

Myši byly perkutánně nakaženy cercáriemi značenými CFSE k posouzení vlivu penetrace a transformace cercárií *in vivo*, a migrace schistosomul uvnitř tkání myši na sílu signálu CFSE při pozorování nalezených červů. Nákazy nejprve probíhaly umístěním myši do vody se značenými cercáriemi. Výsledná představa o migraci schistosomul centrální nervovou soustavou tak ale mohla být ovlivněna tím, že cercáriím bylo umožněno penetrovat kůži předních i zadních končetin myši. Proto byly dále perkutánně nakažovány jen myši v anestezii, kterým cercárie mohly penetrovat kůži pouze jedné zadní končetiny.

Při pitvě dvou myší, kterým cercárie penetrovaly kůži všech končetin, byly v míše 5 dní p.i. nalezeny 4 živé schistosomuly a 9 živých schistosomul 11 dní p.i. U 2 ze 3 myší nakažených v anestezii se 2. a 3. den p.i. objevila paralýza penetrované končetiny. Histologické zpracování sedacích nervů postižených končetin paralyzovaných myší však nebylo provedeno správně. V těchto myších bylo celkem nalezeno 7. den p.i. 14 schistosomul v míše, 10. den p.i. 25 schistosomul v míše a 1 v mozku a 21. den p.i. 4 schistosomuly v míše. Schistosomuly byly živé a na penetrační žlázy byl stále navázán CFSE.

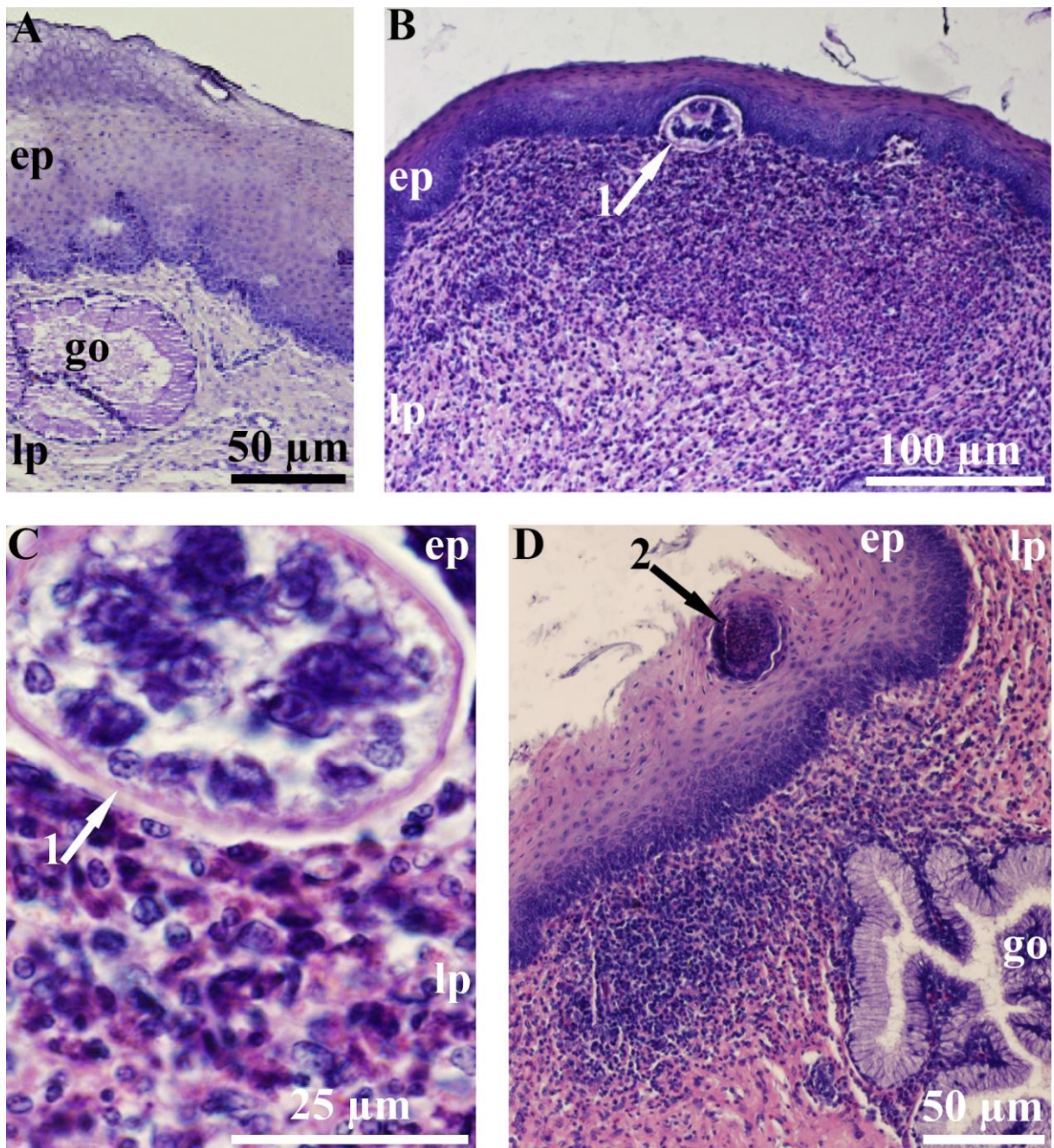
5.3 Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži opakovaně nakažených hostitelů

Sledování výskytu buněčného infiltrátu reagujícího na přítomnost motolic *Trichobilharzia* spp. proběhlo hodnocením histologických řezů jícnu a kůže imunizovaných kachen a myši nakažených alimentární nebo perkutánní cestou.

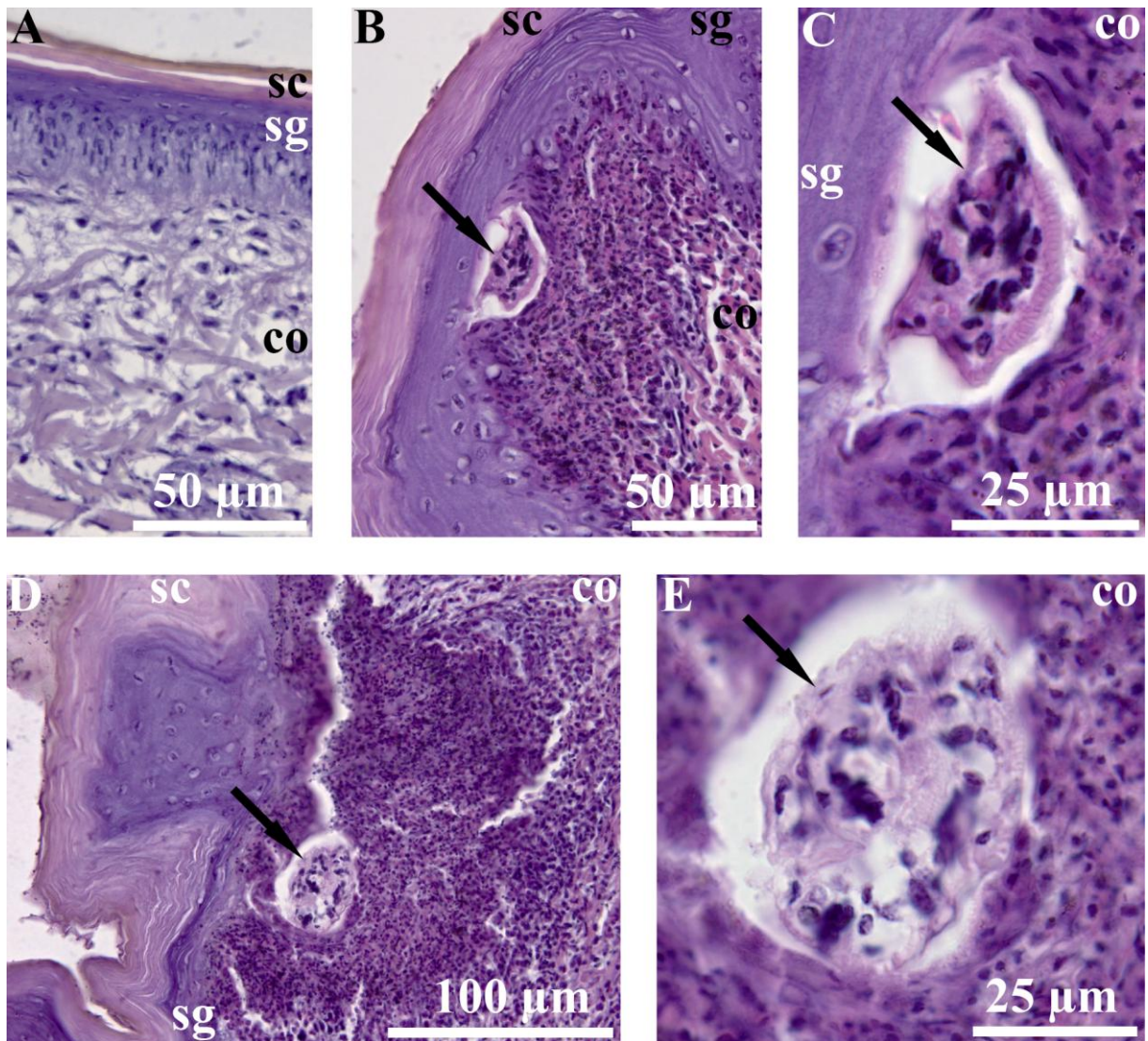
5.3.1 Výskyt buněčného infiltrátu v kachnách opakovaně nakažených motolicí *T. regenti*

Pro tyto pokusy byly kachny nakaženy celkem 2x nebo 4x. V jícnu a kůži kachen nakažených 2x, a také v hrudní části jícnu kachen nakažených 4x nebyli nalezeni žádní červi. Na řezech jícnu 4x nakažených kachen byly schistosomuly vzácně nalezeny v počtech několik jedinců, a to jen v jejich krční části. Na stejných řezech byla 1. i 2. den p.i. v epitelu pozorována nekrotická ohniska a také buněčný infiltrát vyskytující se v *lamina propria* nezávisle na přítomnosti parazita anebo v blízkosti neporušených červů. Tento infiltrát nebyl z časových důvodů blíže charakterizován.

V kůži 4x nakažených kachen byla 1. i 2. den p.i. pozorována hojící se/již zahojená tkáň v těsné blízkosti schistosomul. Schistosomuly nalezené po 4. infekci byly jak živé, tak mrtvé. Kolem živých i mrtvých schistosomul byl 1. i 2. den p.i. nashromážděn rozsáhlý buněčný infiltrát tvořený především granulocyty s malým podílem makrofágů. Typ přítomných leukocytů nebyl z časových důvodů blíže určen.



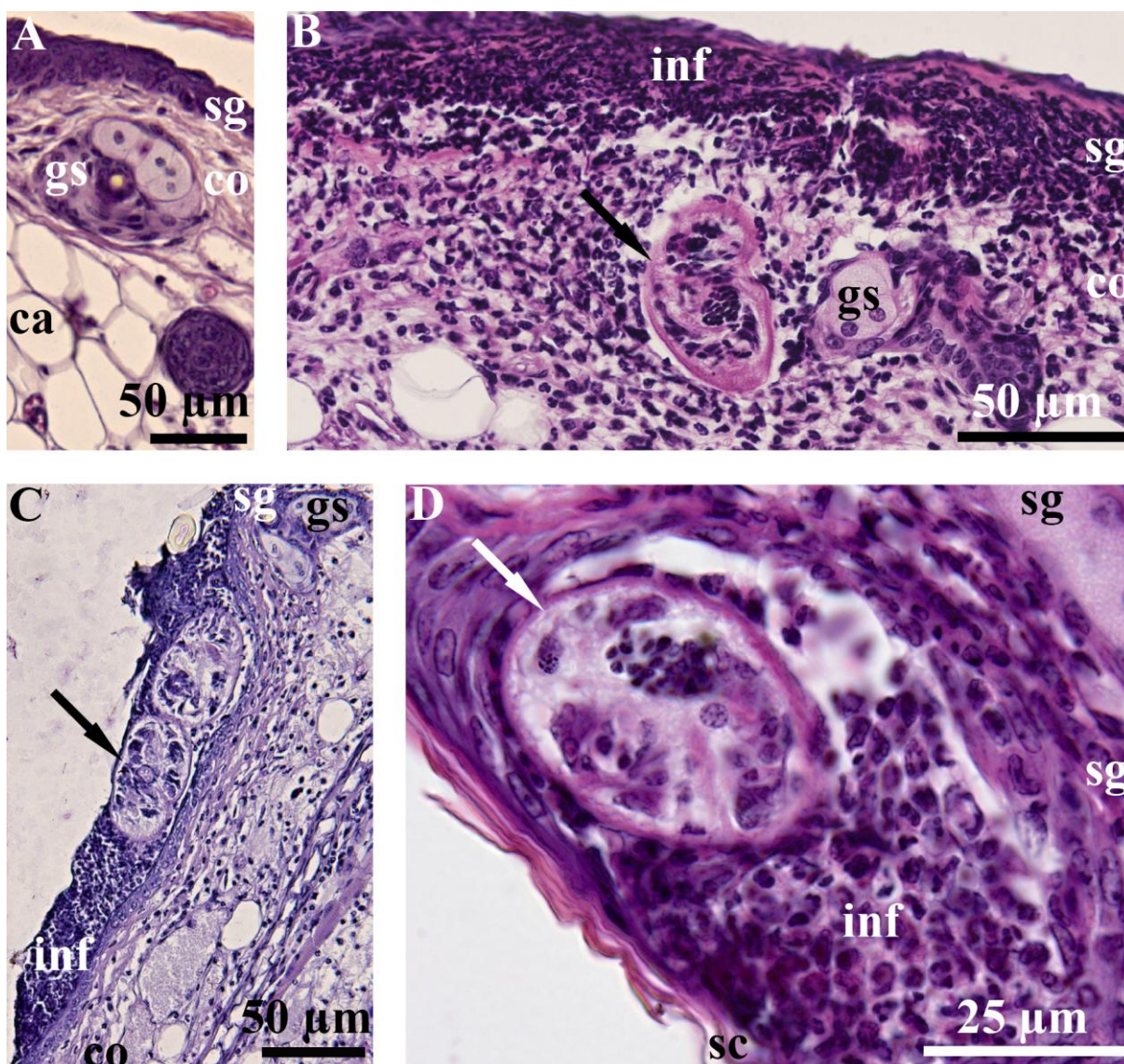
Obrázek 8. Buněčná imunitní odpověď proti *T. regenti* v krční části jícnu 4x nakažené kachny, 1 den p.i. příčné řezy jícnem, H-E. A: jícen nenakažené kachny. **B:** schistosomula na rozhraní epitelu a lamina propria s přítomným buněčným infiltrátem. **C:** schistosomula v blízkosti buněčného infiltrátu s nepoškozeným tegumentem. **D:** nekrotické ložisko v epitelu pravděpodobně způsobené migrujícím červem a buněčný infiltrát přítomný v l. propria. **ep** epitel, **go** glandulae oesophageales, **lp** l. propria, **1** schistosomula, **2** nekrotické ložisko



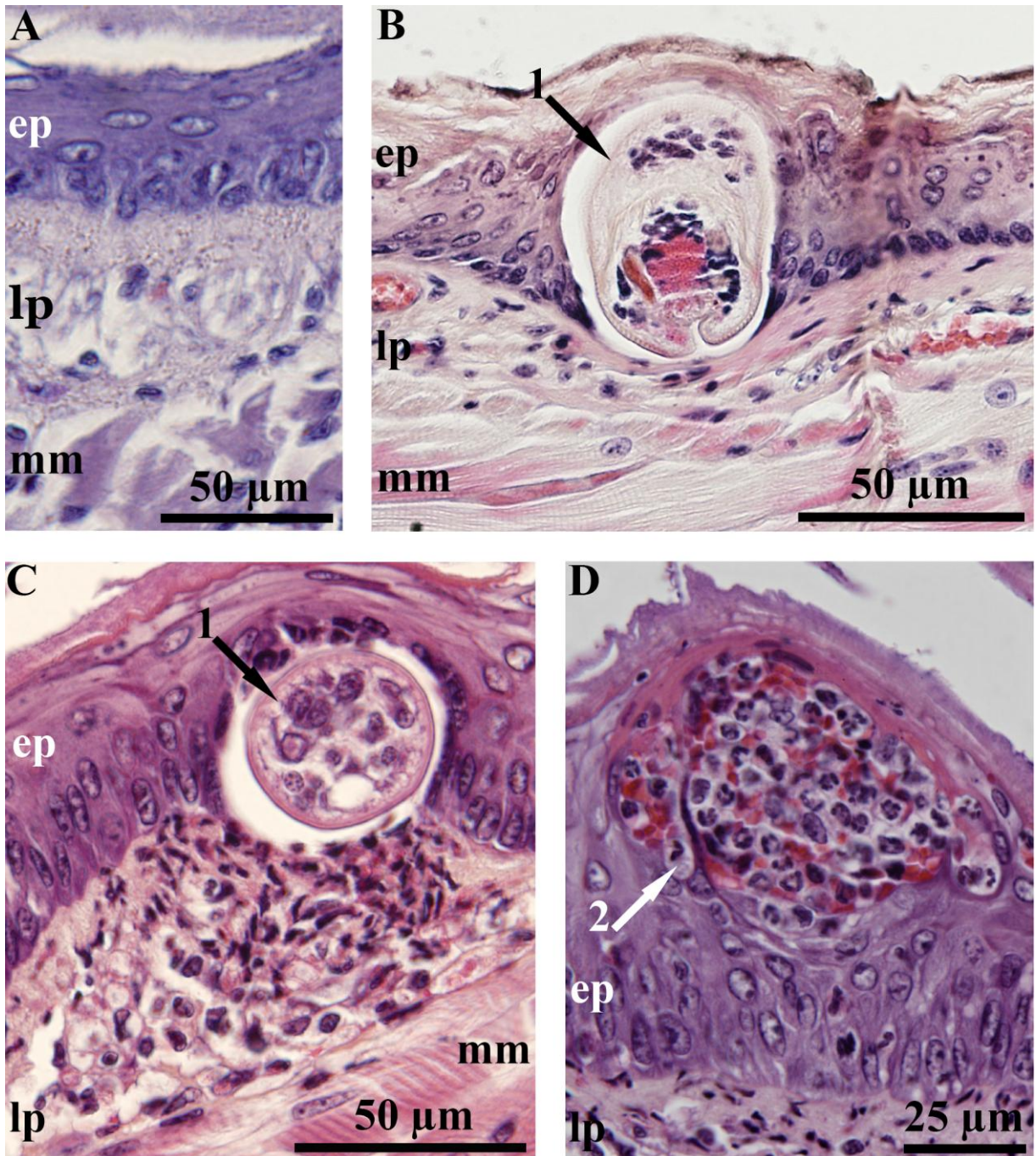
Obrázek 9. Buněčná imunitní odpověď proti *T. regenti* v kůži 4x nakažené kachny, 1 den p.i., příčné řezy kůží, H-E. A: kůže nenakažené kachny. **B, C:** živá schistosomula mezi vrstvami *stratum germinativum* a *corium* obklopené buněčným infiltrátem. **D, E:** mrtvý červ na rozhraní vrstev *s. germinativum* a *corium* obklopený buněčným infiltrátem v blízkosti jizvy vzniklé pravděpodobně následkem penetrace cercárie. **sc** *s. corneum*, **sg** *s. germinativum*, **co** *corium*, **šipka** červ

5.3.2 Výskyt buněčného infiltrátu v myších opakovaně nakažených motolicí *T. szidati*

Na řezech tkání nakažených myší byly schistosomuly v porovnání s řezy kachních tkání nacházeny snáze. Alimentární infekce myši, u které byly vynechány první 2 nákazy, se ale nepovedla. Schistosomuly byly 1 den p.i. v jícnu myší nakažených 4x nacházeny nepoškozené, ačkoli se v jejich okolí hromadily buňky imunitního systému – především granulocyty. V *lamina propria* jícnu 4x nakažených myší byla přítomná zánětlivá granulomatózní ložiska a hemorhagie.



Obrázek 10. Buněčná imunitní reakce proti *T. regenti* v kůži myši, příčné řezy, H-E. **A:** nenakažené myši. **B:** vertikálně migrující schistosomula na v kůži 4x nakažené myši. **C:** horizontálně migrující schistosomula v kůži 2x nakažené myši. **D:** schistosomula ve vrstvě *stratum germinativum* kůže 4x nakažené myši obklopené granulomatózním buněčným infiltrátem. **ca** cartilago, **co** corium, **gs** glandula sebacea, **inf** buněčný infiltrát, **sg** s. *germinativum*, šipka čern



Obrázek 11. Buněčná imunitní reakce proti *T. regenti* v jícnu myši 1 den p.i., příčné řezy, H-E.
A: jícen nenakažené myši. **B:** schistosomula invadující *corium* naivní myši. **C:** jícen 4x infikované myši s buněčným infiltrátem v *lamina propria* obklopujícím schistosomulu. **D:** granulomatózní léze s hemorhagií v epitelu jícnu 4x nakažené myši vzniklá pravděpodobně průnikem cercárií/schistosomul. **ep** epitel, **lp** *lamina propria*, **mm** *muscularis mucosae*, **1** schistosomula, **2** granulomatózní léze

Kůže myší penetrovaná cercáriemi při poslední nákaze byla oproti nepenetrované kůži 1 den p.i. nápadně zarudlá a oteklá. V kůži myší infikovaných pouze 2x byly schistosomuly 1 den p.i. nacházeny ve vrstvě *stratum corneum*. Schistosomuly touto vrstvou migrovaly horizontálně a zanechávaly za sebou tunel vyplněný buněčným infiltrátem. Na řezech kůže myší infikovaných 4x bylo okolí schistosomul (resp. *s. germinativum*) silně infiltrováno zánětlivými buňkami s převahou granulocytů. Schistosomuly se často nacházely v blízkosti penetrovaného místa a migrovaly vertikálně hlouběji do vrstvy *corium*, která byla nápadně nateklá.

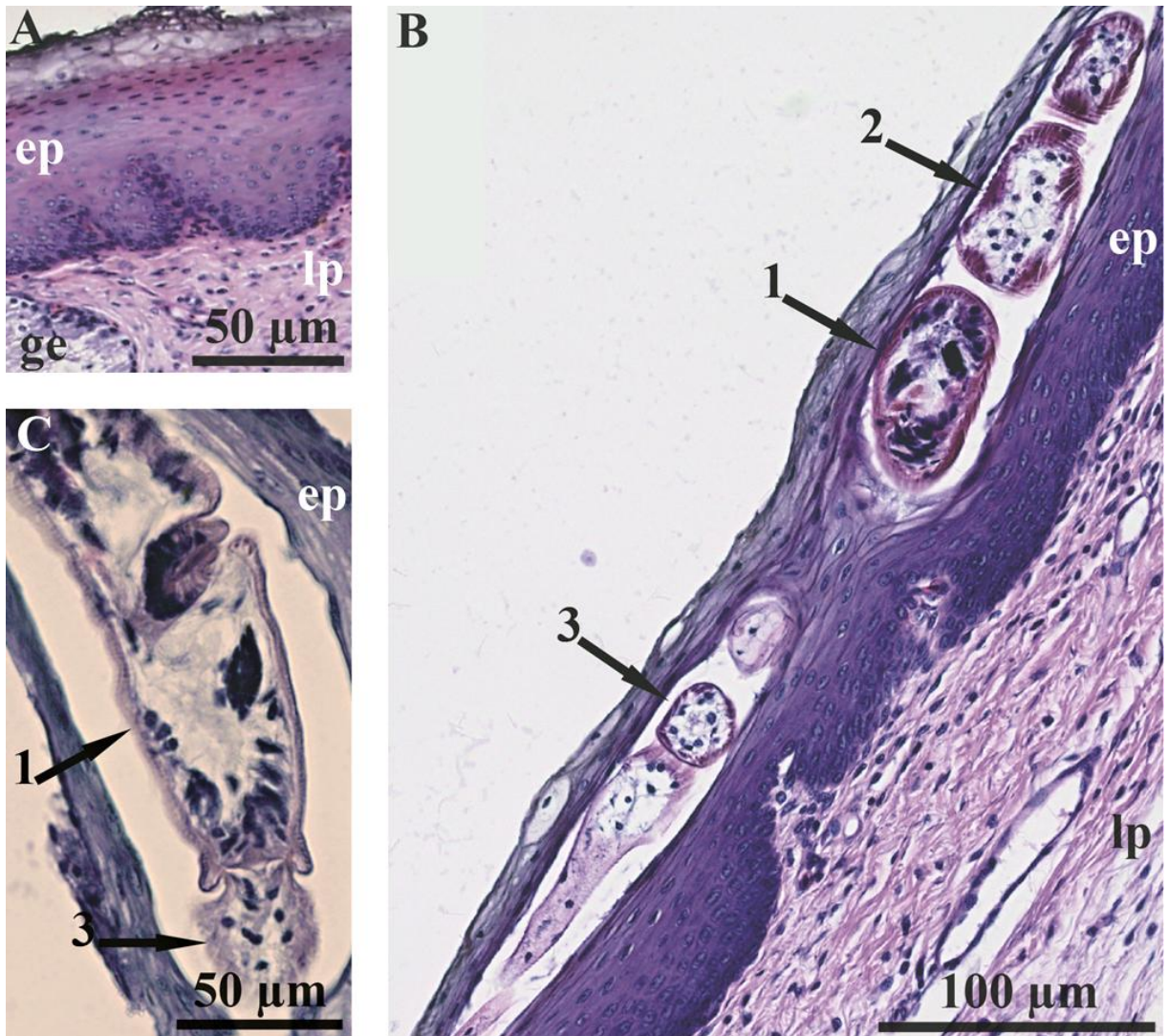
5.4 Penetrace cercárií *in vitro*

Schistosomuly byly po penetraci kachní kůže a jícnu cercáriemi *in vivo* na histologických řezech nacházeny jen vzácně. Časná fáze migrace schistosomul, tedy první 3 hodiny od penetrace, a vyprazdňování jejich penetračních žláz proto byly studovány na tkáních penetrovaných cercáriemi *in vitro*.

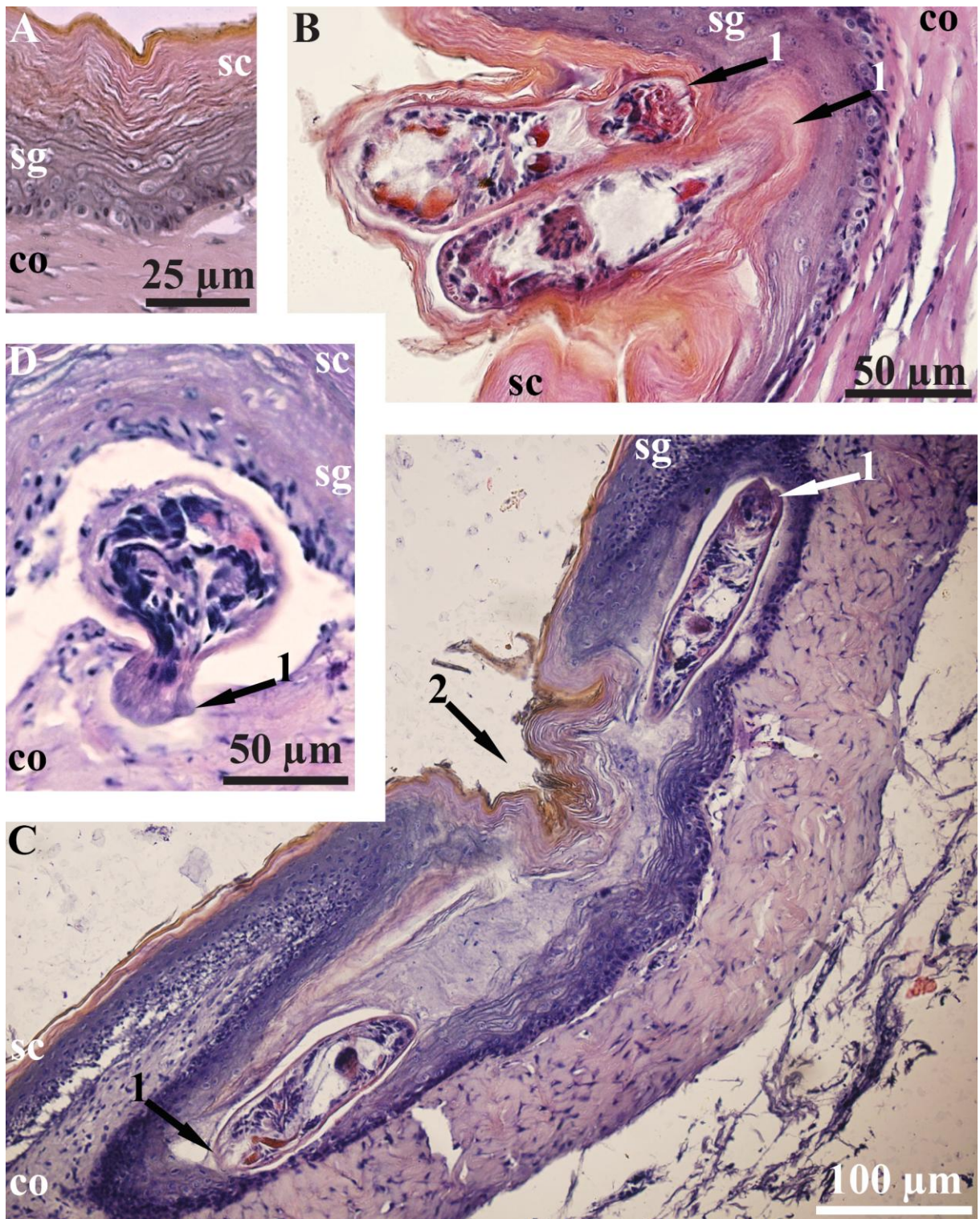
5.4.1 Časná fáze migrace *T. regenti* kachní kůží a jícnem

Na histologických řezech kůže byly pozorovány cercárie penetrující tkáň společně (nejčastěji v počtu 2 – 4 cercárií) v jednom místě. Cercárie s neodhozenými ocásky byly ve *stratum corneum* nacházeny výjimečně. Cercárie/schistosomuly nejprve v kůži migrovaly horizontálně vrstvou *s. corneum*. K invazi vrstev kůže ležících dál od povrchu docházelo vertikálním stočením apikálního konce těla a jeho zanořením hlouběji. Především prvních 30 minut p.p. se schistosomuly často vyskytovaly na rozhraní vrstev *s. corneum* a *s. germinativum*. V *corium* se první červi vyskytovali již 30 minut p.i., ale jejich větší počet byl v této vrstvě nacházen 3 hodiny p.i. Migrující schistosomuly nebyly těsně obklopeny tkání hostitele, ale měly kolem sebe prázdný prostor.

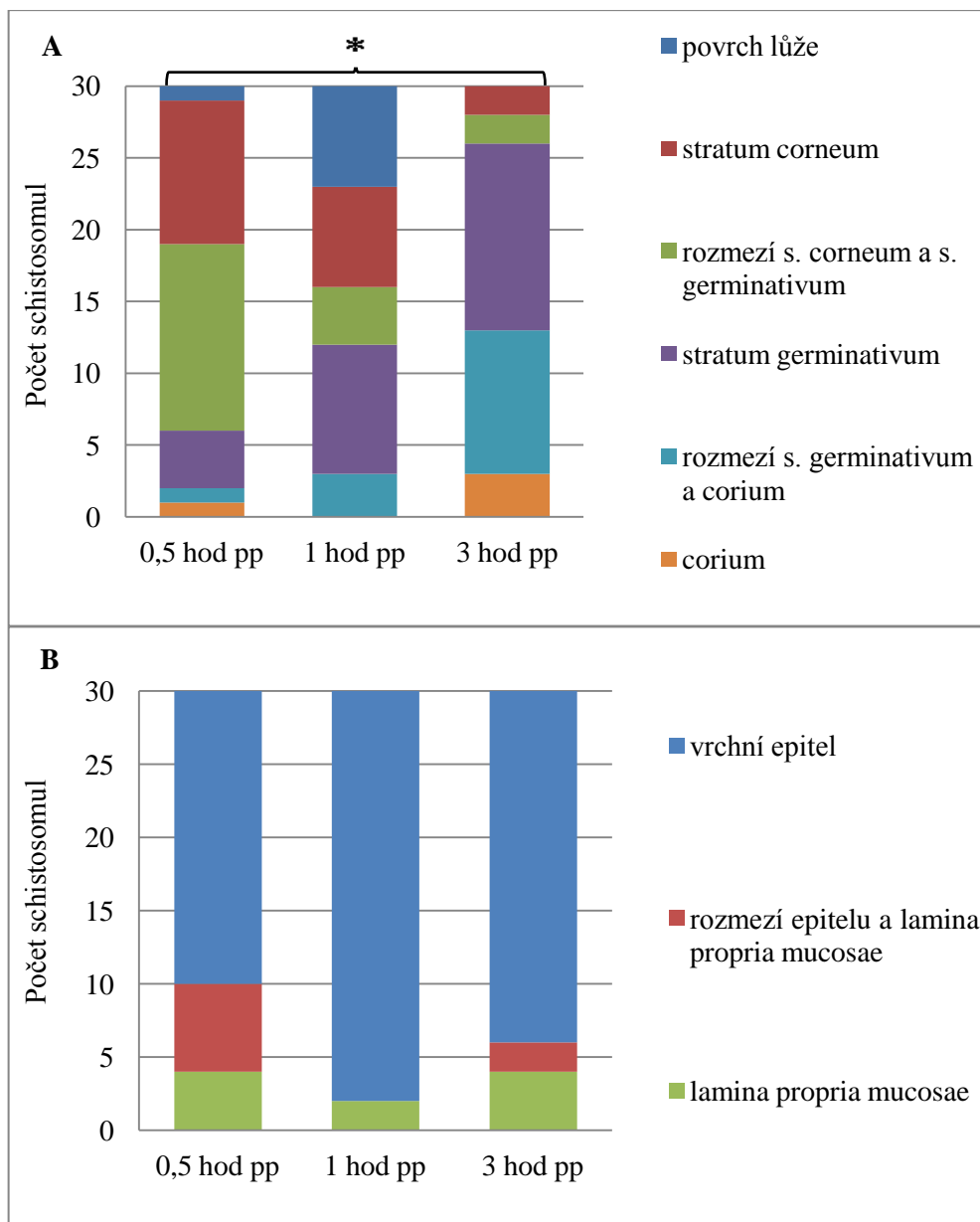
Během prvních 3 hodin od invaze jícnu se většina cercárií/schistosomul zdržovala ve vrchním epitelu, který byl jejich migrací poškozen. Asi jedna polovina červů měla stále neodhozené ocásky i 3 hodiny od začátku penetrace. Cercárie/schistosomuly byly zřídka nacházeny v těsné blízkosti. Na řezech jícnu byly během prvních 3 hodin p.p. nejčastěji nacházeny v horizontální poloze a jen výjimečně v tuto dobu docházelo k průniku červů do *lamina propria*.



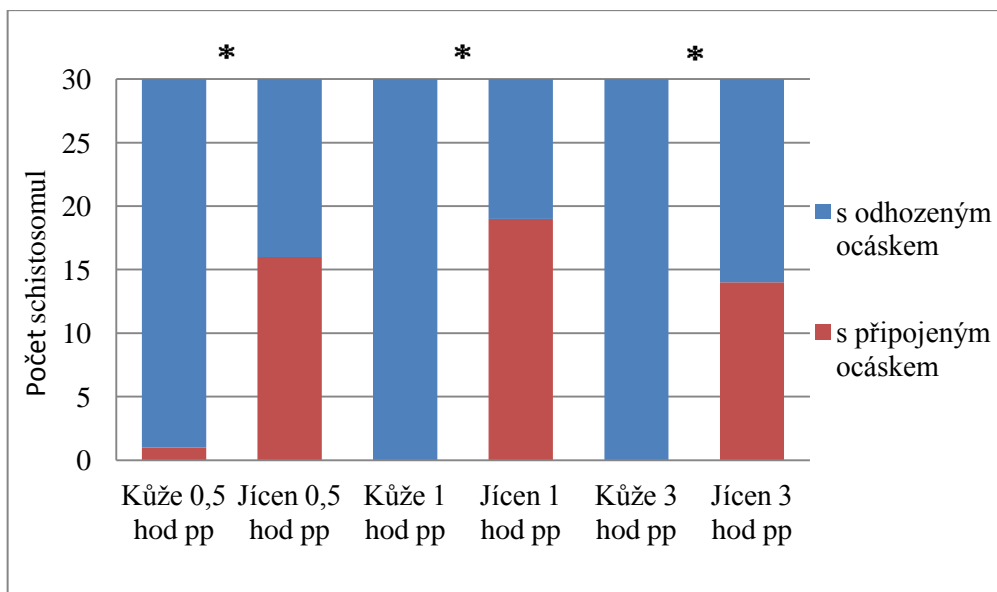
Obrázek 12. Invaze jícnu kachny cercáriemi *T. regenti*, příčné řezy, H-E. A: nepenetrovaný jícn. **B:** cercárie *T. regenti* s neodhozeným ocáskem ve vrchní epitelové vrstvě 3 hodiny p.p. **C:** detail připojení neodhozeného ocásku k tělu cercárie, 3 hodiny p.p. **1** tělo cercárie, **2** apikální konec cercárie, **3** ocásek



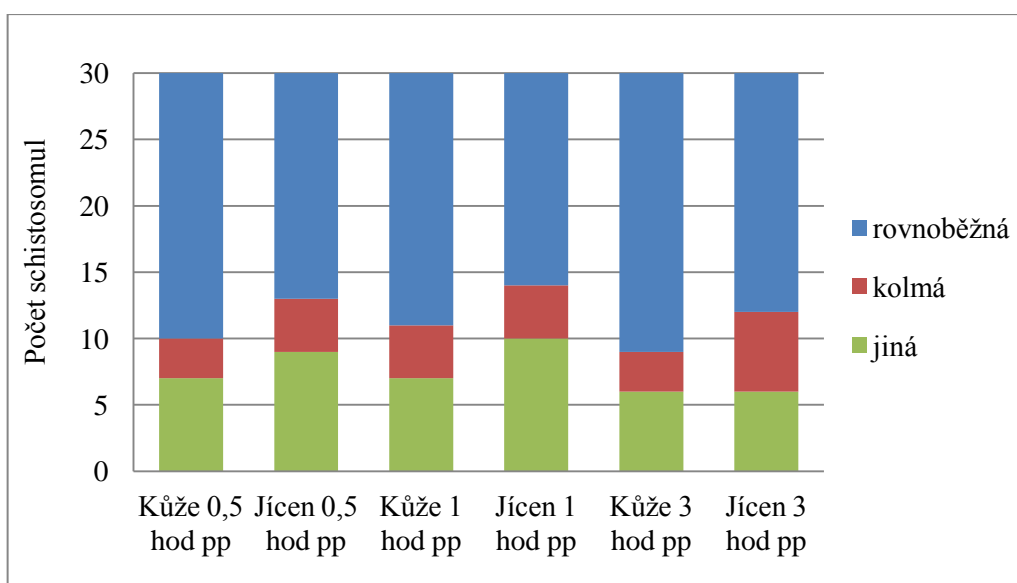
Obrázek 13. Migrace motolice *T. regenti* kůže kachny první 3 hodiny od penetrace, příčné řezy, H-E. A: nepenetrovaná kůže. B: penetrace kůže 2 cercáriemi 0,5 hodiny p.p. C: schistosomuly na příčném řezu kůží 1 hodinu p.p. D: schistosomula invadující *corium* 3 hodiny p.i. sc *stratum corneum*, sg *s. germinativum*, co *corium*, 1 apikální konec červa, 2 místo penetrace kůže cercáriemi



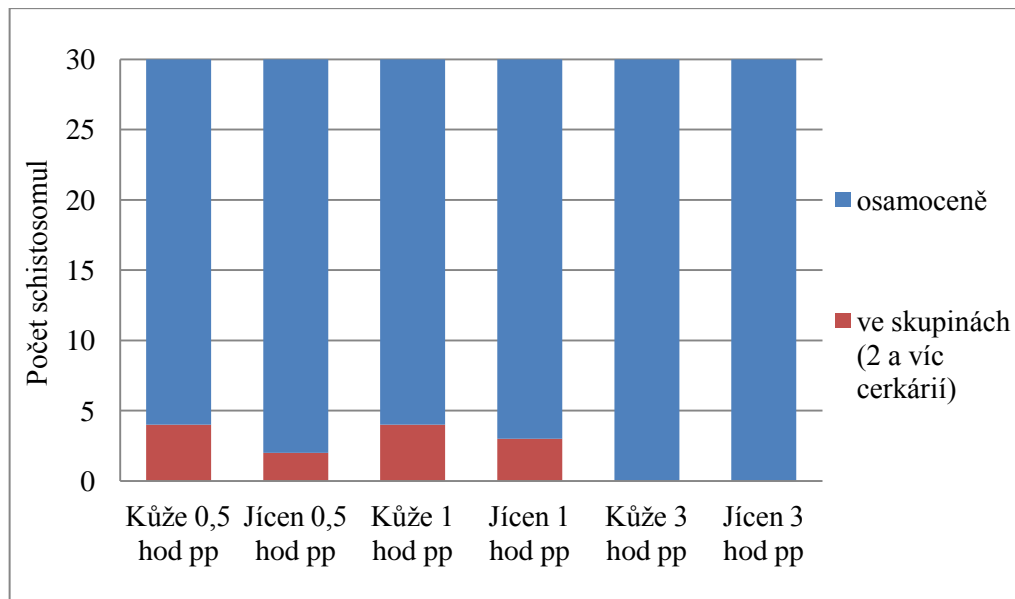
Graf 1. Migrace schistosomul *T. regenti* kachní kůží (A) a jícnem (B) penetrovaných cercáriemi *in vitro*. * významný rozdíl v rozložení schistosomul mezi jednotlivými vrstvami tkáně během 3 hodin po penetraci, testovány byly najednou časové intervaly 0,5, 1 a 3 hodin p.p., **hod pp hodina po penetraci**



Graf 2. Odhození ocásků během invaze kůže a jícnu kachny cercáriemi během 3 hodin od penetrace. * významný rozdíl v počtu neodhozených ocásků v jícnu a kůži testovaných současně pro interval 0,5; 1 nebo 3 hodiny, **hod pp** hodina po penetraci



Graf 3. Poloha těla *T. regenti* po penetraci kachní kůže a jícnu během 3 hodin od penetrace. **hod pp** hodina po penetraci



Graf 4. Samostatná nebo hromadná penetrace kachního jícnu nebo kůže cercáriemi *T. regenti*. hod pp hodina po penetraci

5.4.2 Vyprazdňování penetračních žláz během časně fáze migrace *T. regenti*

Vyprazdňování penetračních žláz cercárií a schistosomul *T. regenti* během prvních 3 hodin invaze kachního jícnu a kůže bylo studováno na celých schistosomulách. Schistosomuly byly získány z tkání inkubovaných s cercáriemi 0,5, 1 nebo 3 hodiny. Z těchto tkání byly rovněž zhotoveny histologické řezy, jejichž barvením, resp. značením, byla doplněna představa o průběhu sekrece acetabulárních žláz.

5.4.2.1 Značení parafinových řezů lektiny

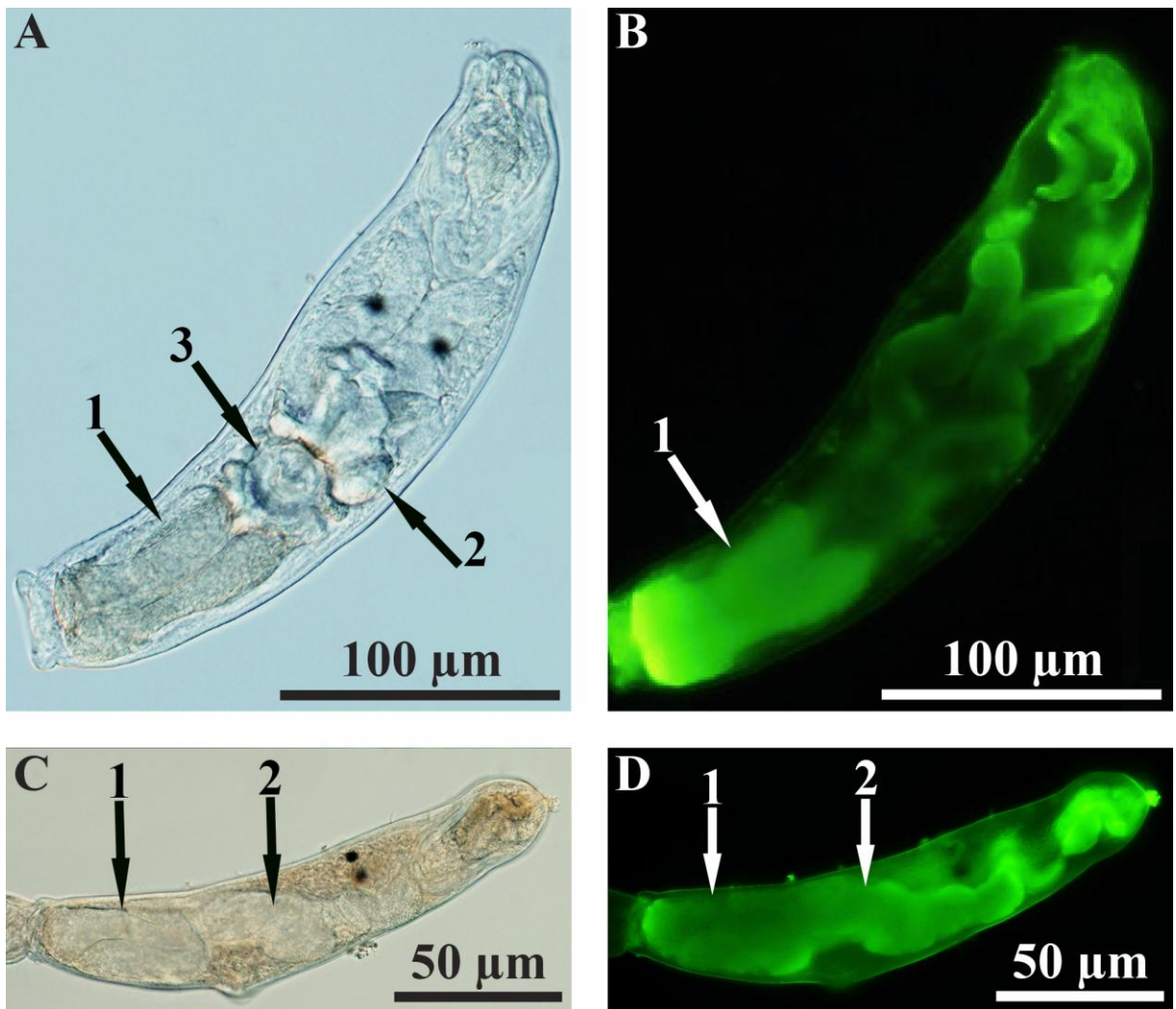
Množství sekrečních produktů vyloučených z jednotlivých typů penetračních žláz během prvních 3 hodin migrace cercárií/schistosomul bylo detekováno na histologických řezech značených fluorescenčními lektiny RCA-I nebo PNA. Tyto lektiny byly z 8 testovaných lektinů vybrány podle toho, na jaký typ acetabulárních žláz se vázaly (viz tabulka 13). Lektiny se vázaly buď pouze na PA žlázy (lektiny PNA, PSA, ConA, WGA, STL) nebo na CA i PA žlázy najednou (lektiny LTA, UEA-I, RCA-I).

Tabulka 13. Značení acetabulárních žláz cercárií *T. regenti* pomocí lektinů.
PA postacetabulární, **CA** cirkumacetabulární

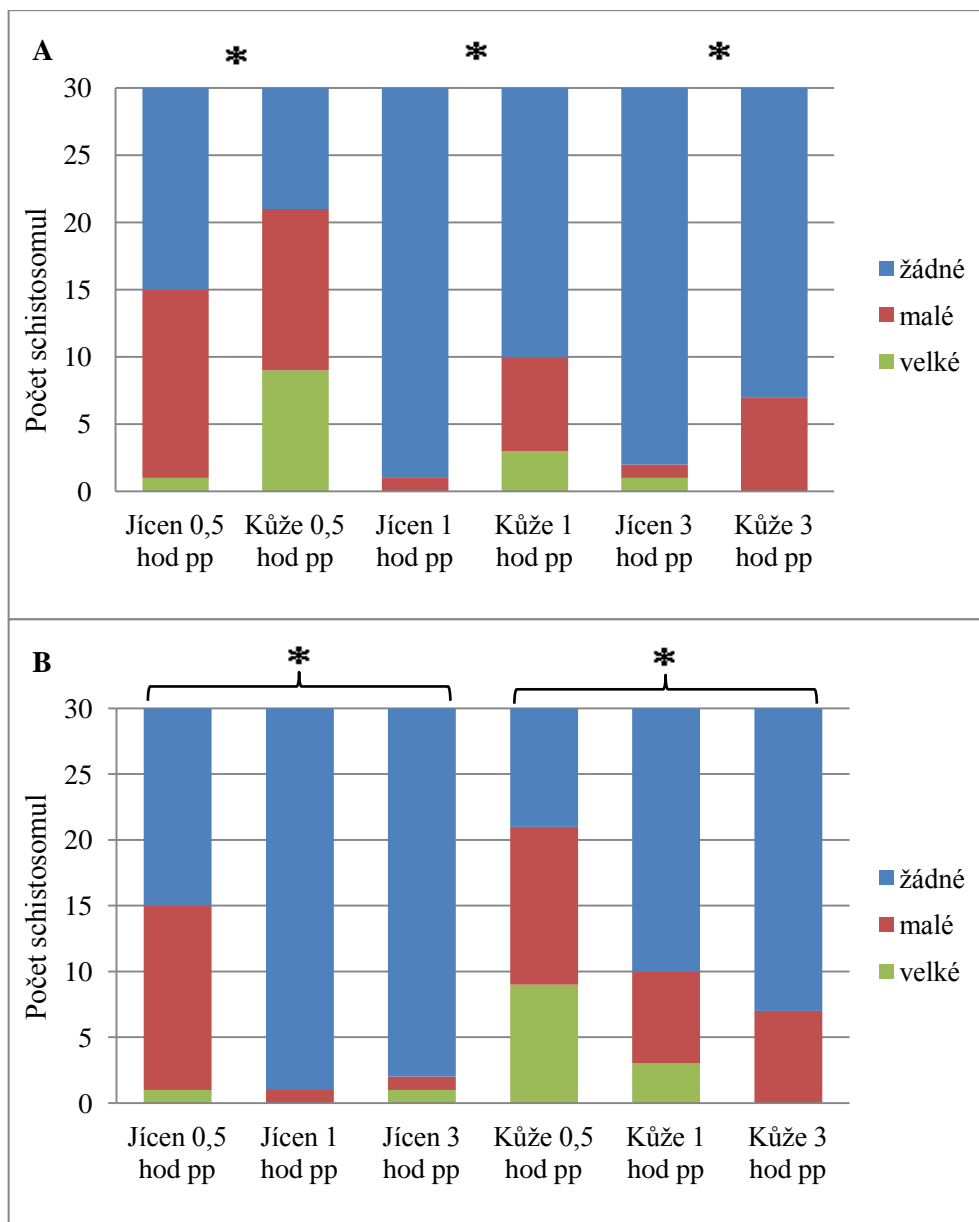
Lektin	Typ značených žláz	Síla reakce
PNA	PA	silná
PSA	PA	slabá
ConA	PA	silná
LTA	CA i PA	slabá
UEA-I	CA i PA	silná
RCA-I	CA i PA	silná
WGA	PA	silná
STA	PA	slabá

Na řezech penetrovanou kůží byly pozorovány cercárie během společné penetrace jednoho místa. Tyto cercárie byly svými exkrečně-sekrečními produkty obklopeny ze všech stran. Z řezů penetrované kůže značené lektinem PNA, ne však RCA-I, bylo dále patrné, že cercárie/schistosomuly intenzivně vyprazdňovaly penetrační žlázy nejen 30 minut p.p., ale i 60 minut p.p. Vyprázdnění žláz většiny schistosomul bylo 3 hodiny od začátku penetrace ukončeno, kolem některých červů ale bylo nalezeno malé množství sekretů i v tuto dobu.

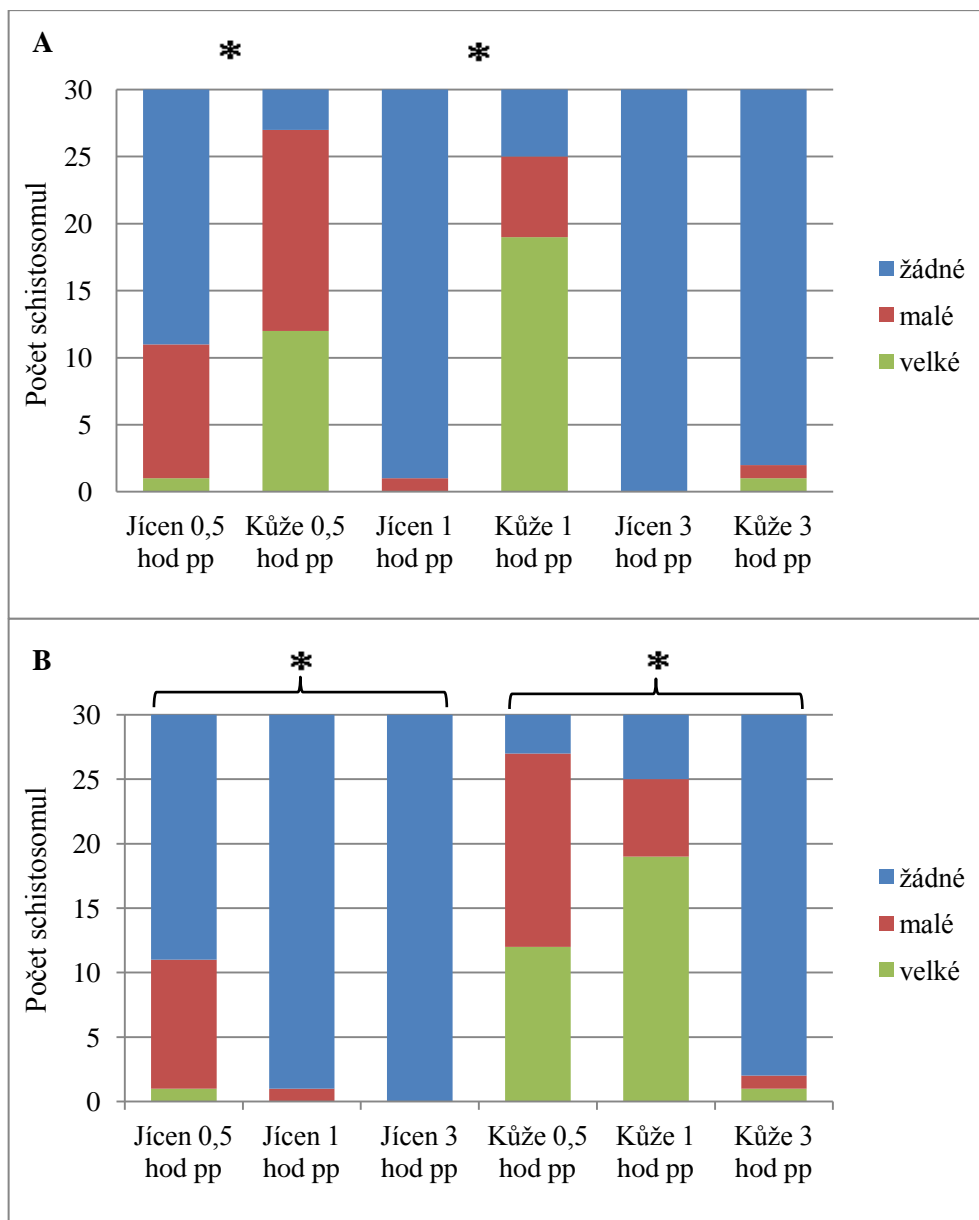
Exkrečně-sekreční produkty červů invadujících jícen byly na histologických řezech nacházeny v malém množství, a to většinou pouze 30 minut od penetrace. Penetrační žlázy červů v jícnu nebyly mnohdy vyprázdněny ani po 3 hodinách od penetrace. Dva červi nalezení na řezech jícnem vytvořily svou migrací vrchním epitelem tunel, který byl po značení lektiny vyplněn fluorescenčním signálem (viz obrázek 18).



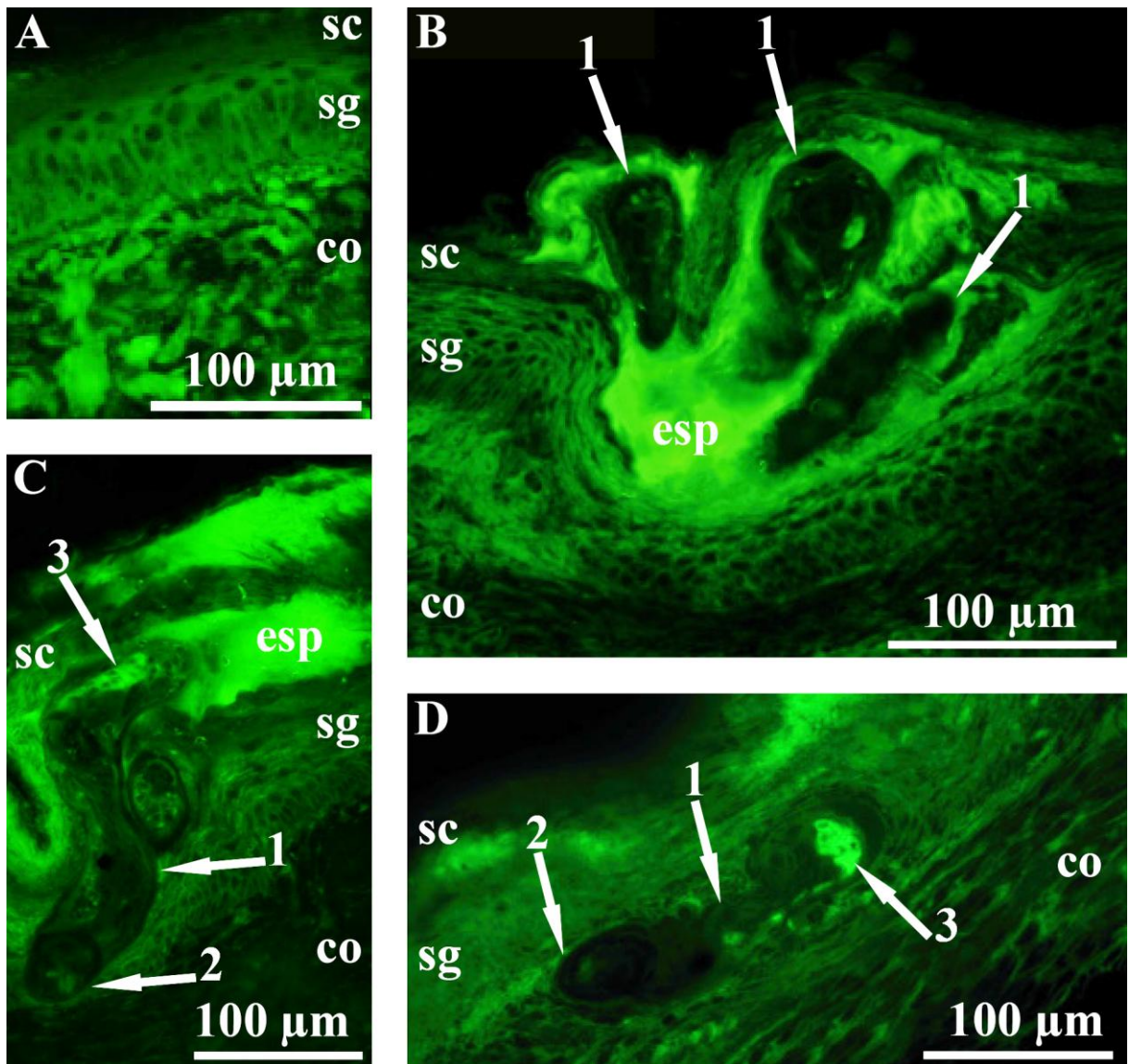
Obrázek 14. Značení penetračních žláz cercárií *T. regenti* pomocí fluorescenčních lektinů.
A, C: acetabulární žlázy cercárie *T. regenti*. **B:** postacetabulární žlázy cercárie značené lektinem PNA.
D: cirkumacetabulární a postacetabulární žlázy cercárie značené lektinem RCA-I. **1** postacetabulární žlázy, **2** cirkumacetabulární žlázy, **3** acetabulum



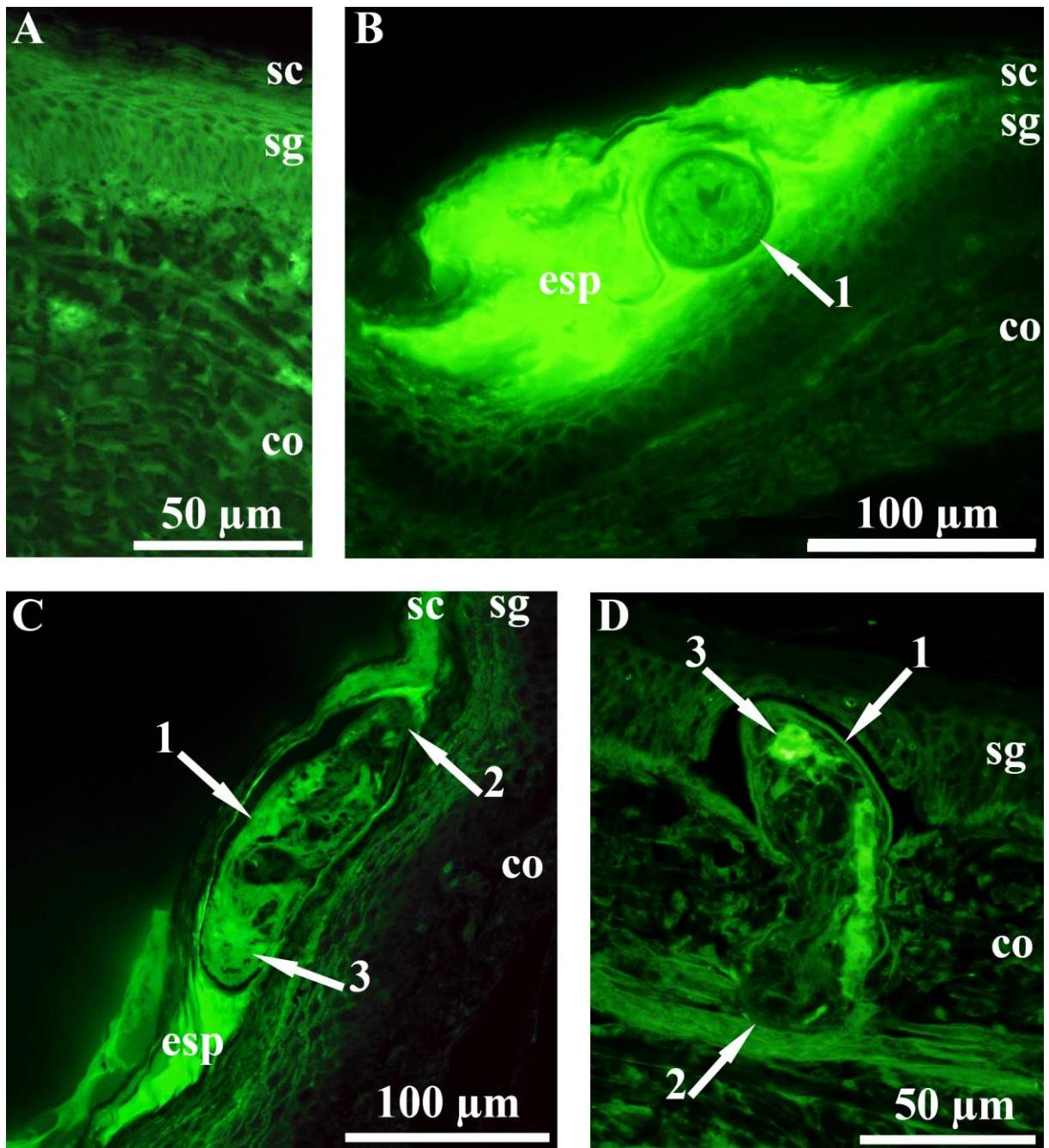
Graf 5. Množství ESP přítomných v okolí červů během 3 hodin od invaze jícnu nebo kůže kachny cercáriemi *T. regenti*, značení řezů lektinem RCA-I. * významný rozdíl v množství sekretů nalezených v okolí cercárií/schistosomul v kachním jícnu a kůži, testovány byly zmíněné tkáně současně pro časové intervaly 0,5; 1 nebo 3 hodiny od penetrace (A), resp. každá tkáň zvlášť v časových intervalech 0,5; 1 a 3 hodiny p.p. (B). hod pp hodina po penetraci



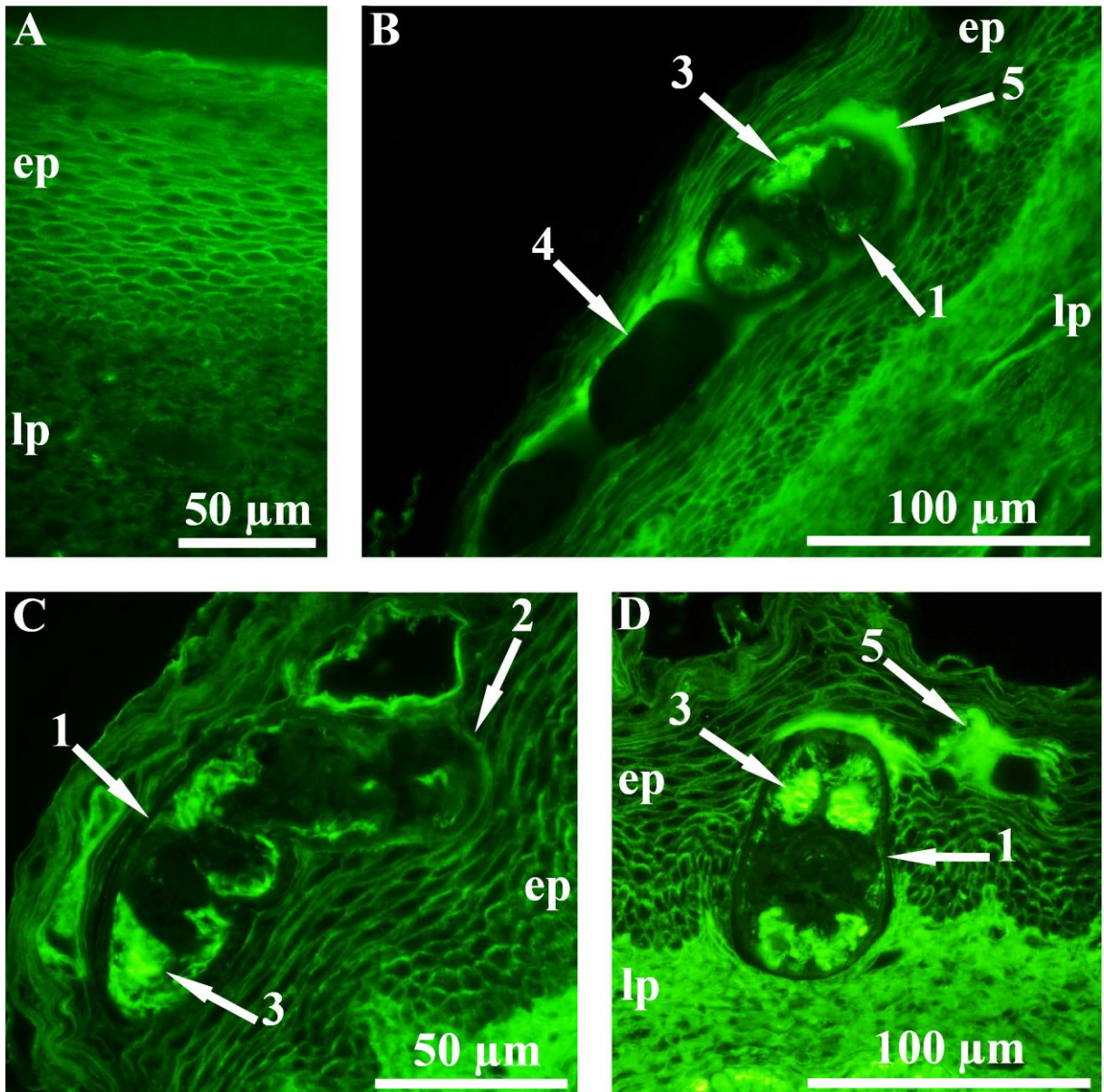
Graf 6. Množství ESP vyprazdňovaných během 3 hodin od invaze jícnu nebo kůže kachny cercáriemi *T. regenti*, značení řezů lektinem PNA. * významný rozdíl v množství sekretů nalezených v okolí cercárií/schistosomul v kachním jícnu a kůži. Testovány byly tyto tkáně současně pro časové intervaly 0,5; 1 nebo 3 hodiny od penetrace (A), resp. každá tkáň zvlášť v časových intervalech 0,5; 1 a 3 hodiny p.p. (B). **hod pp hodina po penetraci**



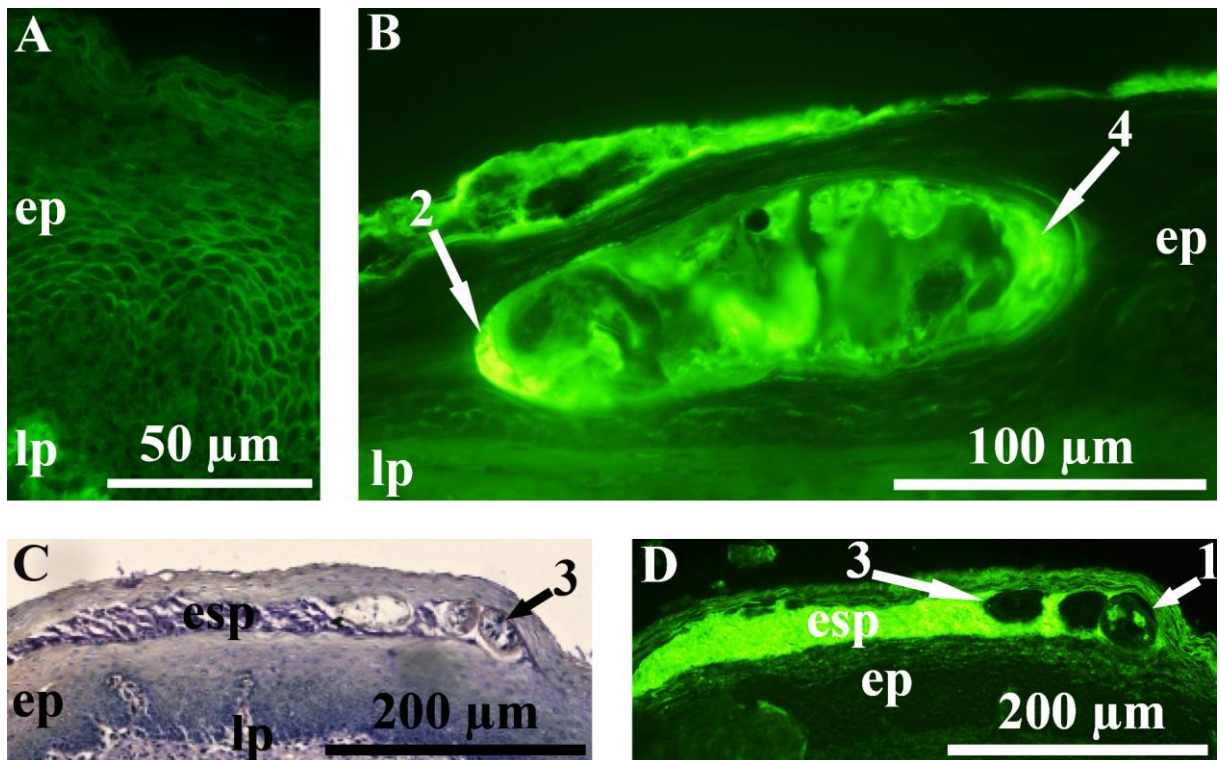
Obrázek 15. Sekrece ESP během invaze kůže kachny cercáriemi motolice *T. regenti* a následné migrace 3 hodiny p.p., příčné řezy, značení lektinem RCA-I. **A:** nepenetrovaná kůže. **B:** intenzivní vyprazdňování acetabulárních žláz během penetrace kůže skupinou cercárií 30 minut p.p. **C:** migrující schistosomula zanechávající za sebou ESP 1 hodinu p.p. **D:** migrace vrstvou *stratum germinativum* bez přispění ESP 3 hodiny p.p. **sc** *s. corneum*, **sg** *s. germinativum*, **co** *corium*, **esp** exkretčně-sekreční produkty, **1** schistosomula, **2** apikální konec červa, **3** acetabulární žlázy



Obrázek 16. Sekrece ESP během invaze kůže kachny cercáriemi motolice *T. regenti* a následné migrace 3 hodiny p.p., příčné řezy, značení lektinem PNA. **A:** nepenetrovaná kůže. **B:** narušení vrstvy *stratum corneum* ESP penetrující cercárie 30 minut p.p. **C:** migrující schistosomula zanechávající za sebou ESP 1 hodinu p.p. **D:** schistosomula invadující *corium* bez přispění ESP 3 hodiny p.p. **sc** *s. corneum*, **sg** *s. germinativum*, **co** *corium*, **esp** exkrečně-sekreční produkty, **1** schistosomula, **2** apikální konec červa, **3** acetabulární žlázy



Obrázek 17. Sekrece ESP během invaze jícnu kachny cercáriemi motolice *T. regenti* a následné migrace 3 hodiny p.p., příčné řezy, značení lektinem RCA-I. A: nepenetrovaný jícn. B: minimum ESP vyloučených cercárií s neodhozeným ocáskem v povrchovém epitelu jícnu 0,5 hodiny p.p. C: červ bez ocásku migrující bez sekrece ESP v povrchovém epitelu jícnu 1 hodinu p.p. D: červ invadující lamina propria 3 hodiny p.p. ep epitel, lp l. propria, 1 schistosomula, 2 apikální konec červa, 3 sekreční soustava, 4 ocásek, 5 ESP

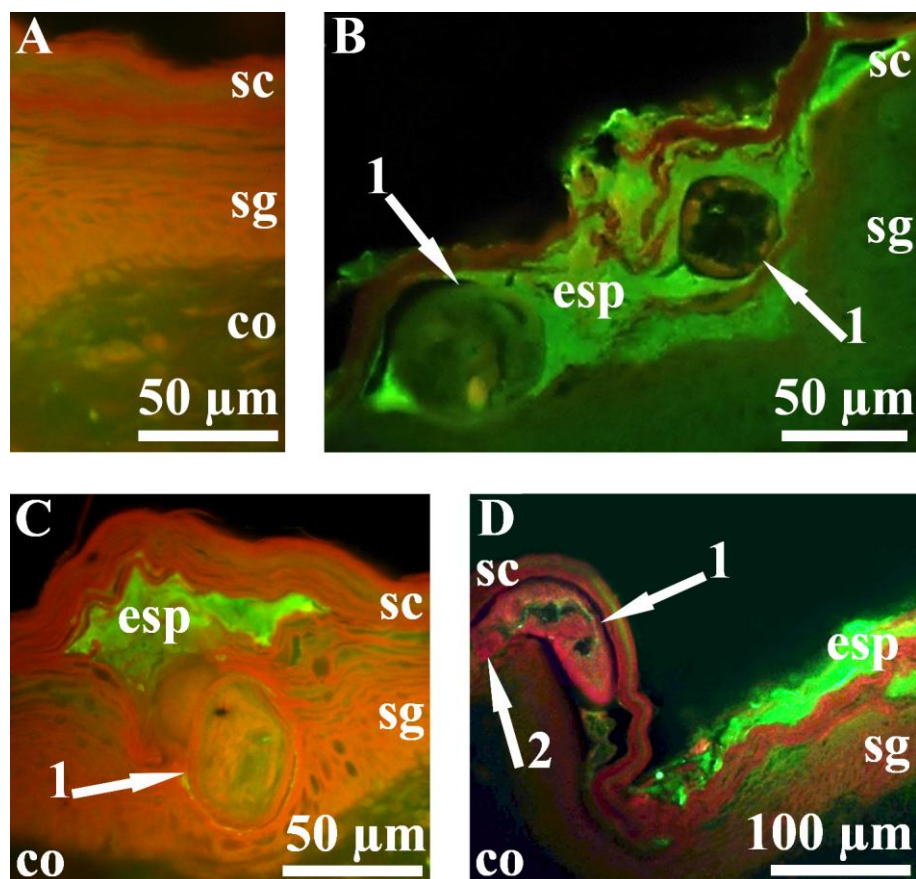


Obrázek 18. Sekrece ESP během invaze jícnu kachny cercáriemi motolice *T. regenti* a následné migrace 3 hodiny p.p., příčné řezy. A: nepenetrovaný jícen. **B:** schistosomula pronikající epitelem jícnu bez přítomných ESP 0,5 hodiny p.p., značení lektinem PNA. **C, D:** cercárie/schistosomula migrující epitelem jícnu s ESP zanechanými za sebou v tunelu 3 hodiny p.p., barvení H-E (C), resp. značení lektinem PNA (D). **ep** epitel, **lp** lamina propria, **esp** exkrečně-sekreční produkty, **1** červ, **2** apikální konec červa, **3** ocásek, **4** sekreční soustava

5.4.2.2 Imunohistochemické značení řezů

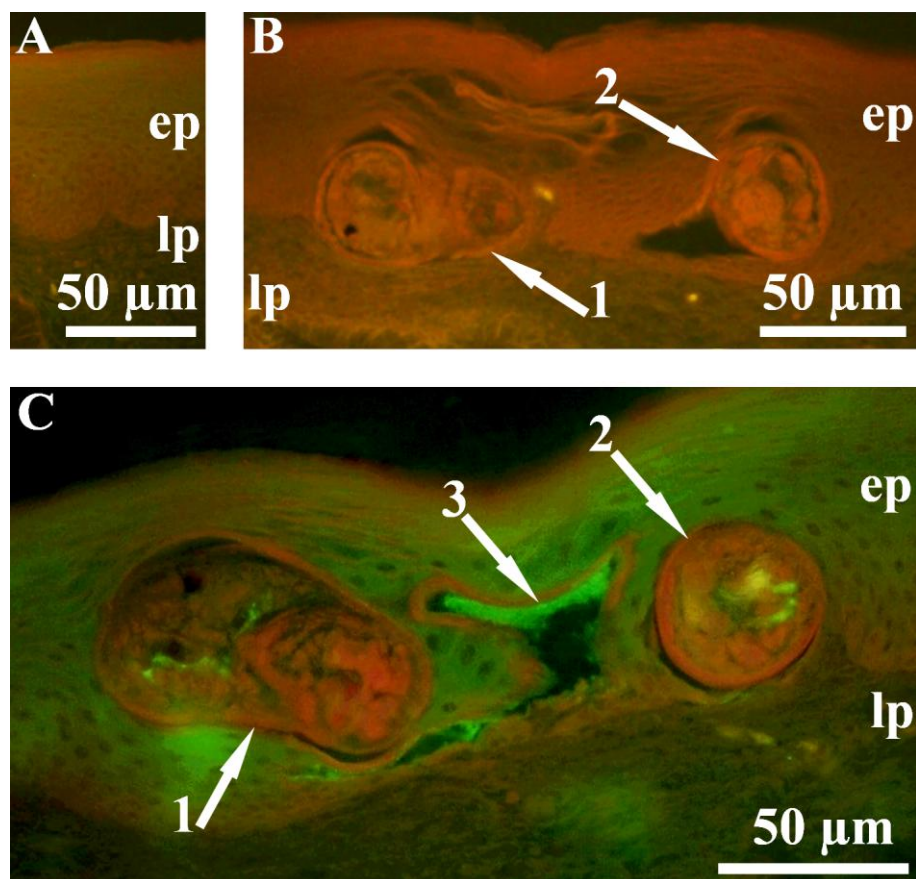
Přítomnost katepsinu B2 motolice *T. regenti* (TrCB2) na histologických řezech cercárií/schistosomul migrujících invadovaným jícnem a kůží kachen byla zjišťována imunohistochemicky. Získaná data byla následně porovnána. Pro nedostatečné množství primárních protilátek však nebyly nasbírané výsledky hodnoceny statisticky. Provedené kontrolní inkubace parafinových i JB-4 Plus řezů s negativním myším sérem a sekundárními protilátkami, a dále řezů bez primárních i sekundárních protilátek potvrdily specifitu primárních protilátek proti TrCB2. Na JB-4 Plus řezech se TrCB2 vázal na PA žlázy cercárií.

Na histologických řezech kůže byl katepsin B2 pozorován 30 minut po penetraci v místech, kde byla tkáň poškozena penetrujícími červy. Mezi 30 minutami a 3 hodinami od začátku penetrace schistosomuly migrovaly horizontálně; 1 hodinu p.p. byly obklopeny TrCB2, který vyplňoval tunel v narušené tkáni. S postupujícím časem množství TrCB2 ubývalo a 3 hodiny p.p. zůstával signál dokládající přítomnost TrCB2 v tunelu za červy, kteří dál migrovali již bez sekrece TrCB2.

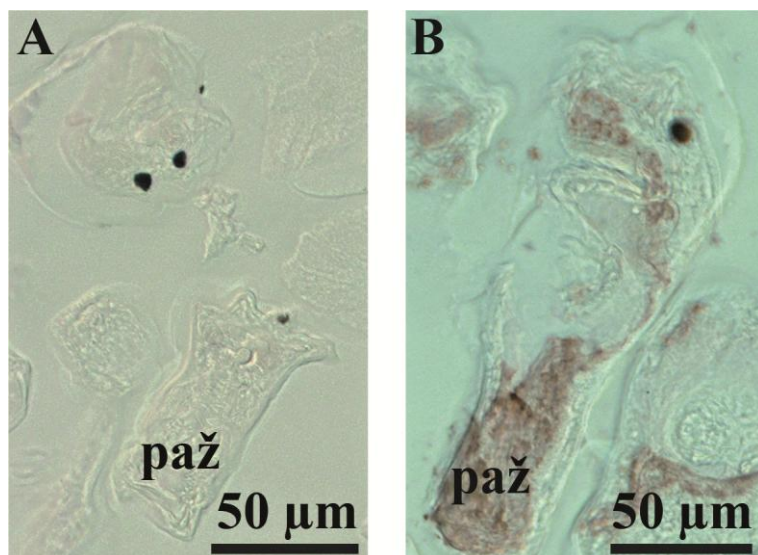


Obrázek 19. Množství TrCB2 detekované pomocí protilátek proti TrCB2 během penetrace cercárií *T. regenti* a prvních 3 hodin migrace schistosomul kachní kůží, příčné řezy. **A:** nepenetrovaná kůže. **B:** TrCB2 v okolí několika cercárií penetrujících jedno místo kůže 30 minut p.p. **C:** tunel vyplněný TrCB2, který je sekretován červem migrujícím na rozhraní vrstev *s. corneum* a *s. germinativum* 1 hodinu p.p. **D:** schistosomula migrující na rozhraní vrstev *s. corneum* a *s. germinativum* již s vyprázdněnými penetračními žlázami 3 hodiny p.p. **sc** *s. corneum*, **sg** *s. germinativum*, **co** *corium*, **esp** exkrečně-sekreční produkty, **1** schistosomula, **2** apikální konec červa, **3** acetabulární žlázy

Množství TrCB2 detekovaného na řezech jícnem, kterým migrovaly cercárie/schistosomuly, se od situace na řezech kůží lišilo. Na řezech jícnu byl katepsin B2 přítomen jen ve velmi malém množství nebo vůbec, a to po celé 3 hodiny od začátku penetrace.



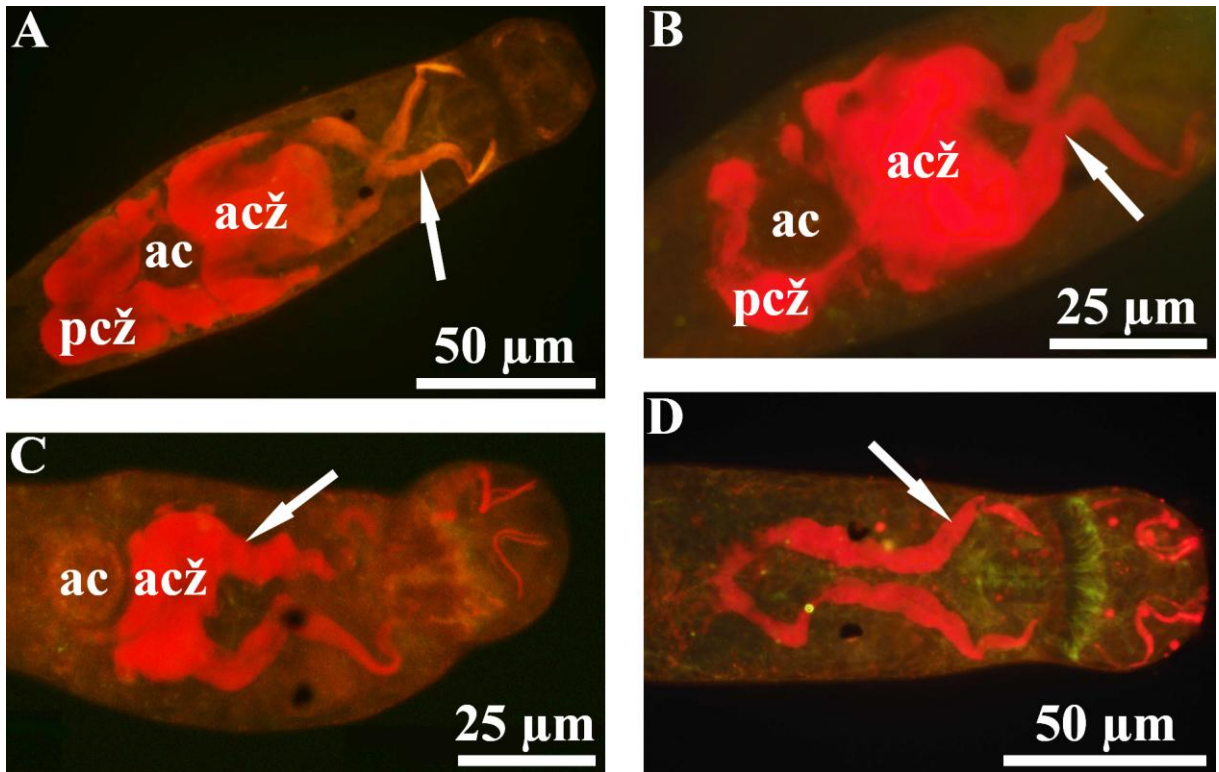
Obrázek 20. Množství TrCB2 detekované pomocí protilátek proti TrCB2 během penetrace cercárií *T. regenti* a prvních 3 hodin migrace schistosomul kachním jícnem, příčné řezy. **A:** nepenetrovaný jícen inkubovaný s pozitivním sérem. **B, C:** červ migrující povrchovým epitelem jícnu 30 minut p.p., inkubace řezu s negativním (B), resp. pozitivním (C), myším sérem. **ep** epitel, **lp** lamina propria, **1** červ, **2** apikální konec červa, **3** exkrečně-sekreční produkty



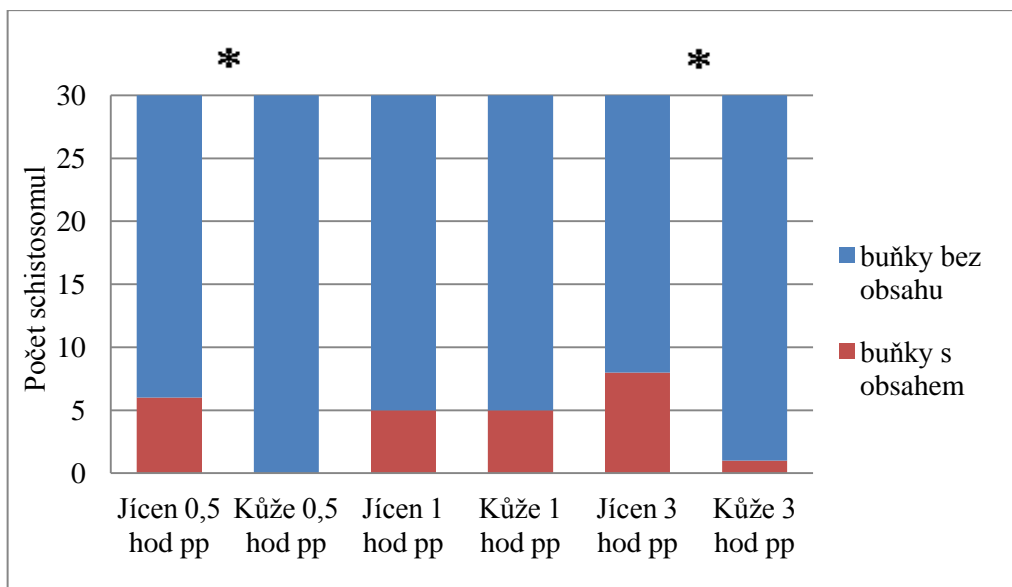
Obrázek 21. Imunodetekce TrCB2 v postacetabulárních žlazách na JB-4 řezech cercárií. A: kontrolní inkubace s negativním sérem, B: inkubace s pozitivním sérem. paž postacetabulární žlázy

5.4.2.3 Barvení schistosomul alizarínem

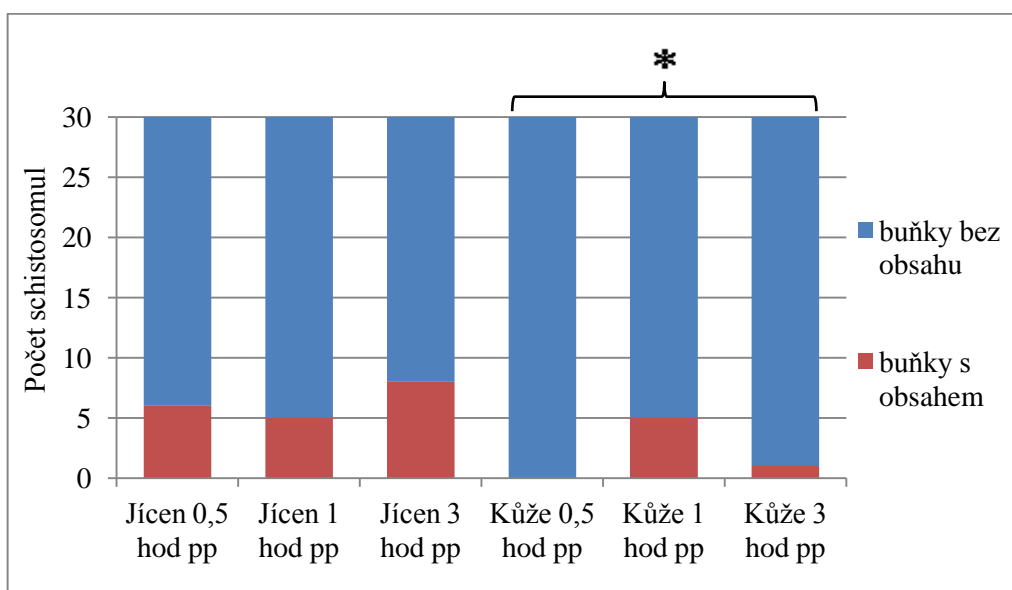
Na schistosomulách, které byly získány z cercáriemi penetrovaného jícnu nebo kůže a které byly následně barveny alizarínem, bylo pozorováno vyprazdňování cirkumacetabulárních žláz. Buňky těchto žláz bylo díky fluorescenční mikroskopii možné jasně rozlišit na dvě části – anteriorní a posteriorní. Pořadí vyprazdňování jednotlivých částí CA žláz bylo variabilní, ale většina schistosomul v kůži i jícnu vyloučila nejprve sekreční produkty posteriorní části žláz (během první hodiny po penetraci), a teprve potom té anteriorní (mezi 1. a 3. hodinou p.p.). Tři hodiny po penetraci byly sekreční produkty nacházeny pouze ve vývodech buněk tvořící žlázy červů (viz obrázek 22).



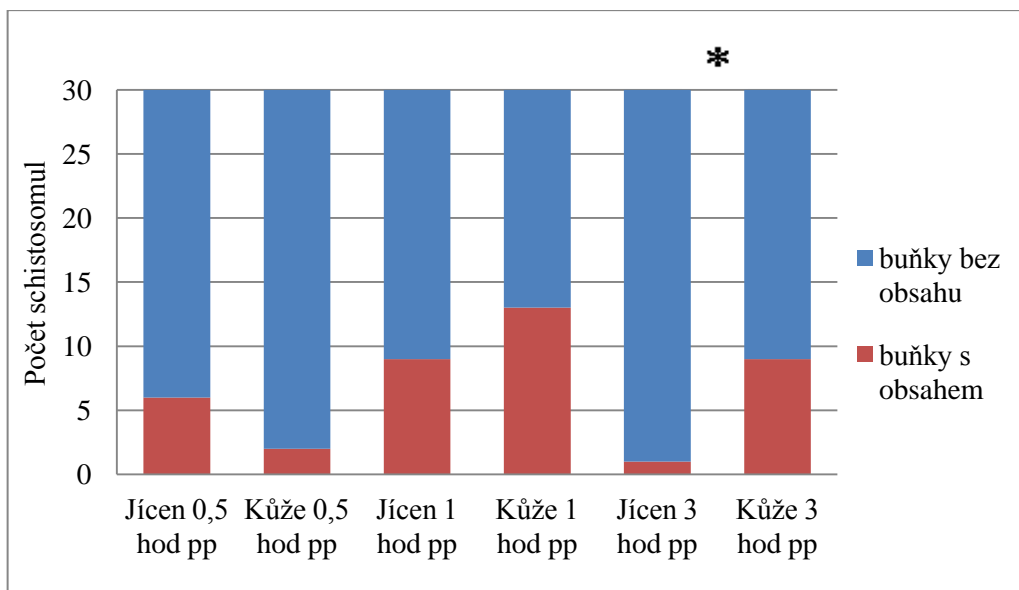
Obrázek 22. Pořadí vyprazdňování cirkumacetabulárních žláz cercárií, resp. schistosomul *T. regent*, barvení alizarínem. A: CA žlázy kontrolní cercárie. **B:** sekretované posteriorní CA žlázy červa z jícnu kachny 30 minut p.p. **C:** červ z kůže kachny s vyprázdněnými posteriorními, ale stále plnými anteriorními CA žlázami 1 hodinu p.p. **D:** červ z jícnu kachny s vyprázdněnými posteriorními i anteriorními CA žlázami, který má ve vývodech těchto žláz stále přítomné sekreční produkty 3 hodiny p.p. **ac** acetabulum, **acž** anteriorní CA žlázy, **pcž** posteriorní CA žlázy



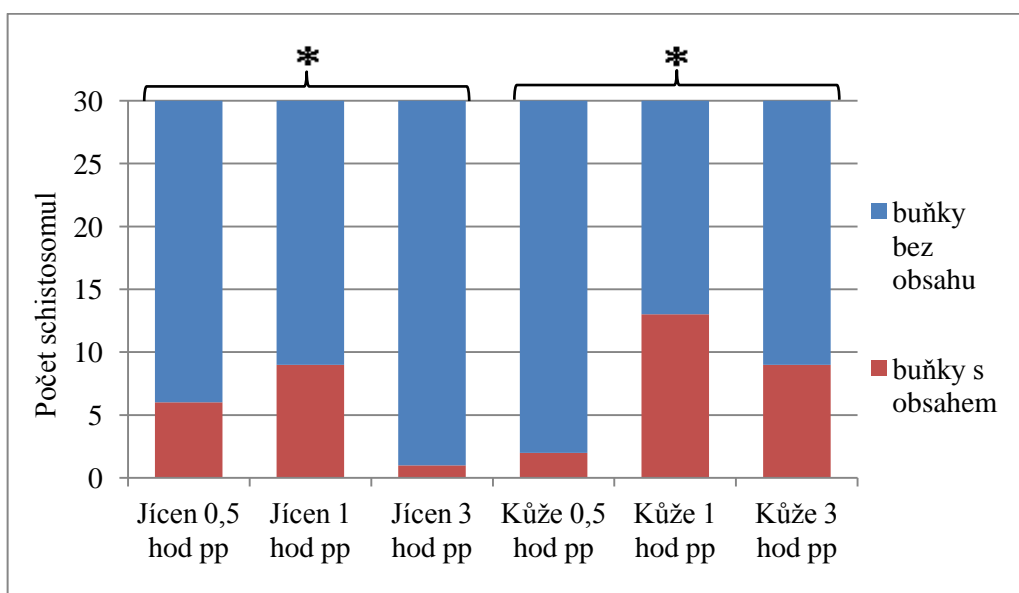
Graf 7. Sekrece anteriorní části CA žláz *T. regenti* barvených alizarínem v kachní kůži a jícnu během penetrace a 3 hodiny po ní. * významný rozdíl, testováni byli červi z kůže a jícnu najednou po časových intervalech 0,5;1 nebo 3 hodiny od penetrace, **hod pp** hodina po penetraci



Graf 8. Sekrece anteriorní části CA žláz *T. regenti* barvených alizarínem v kachní kůži a jícnu během penetrace a 3 hodiny po ní. * významný rozdíl, testováni byli červi z každé tkáně jednotlivě v časových intervalech 30, 60 a 180 minut, **hod pp** hodina po penetraci



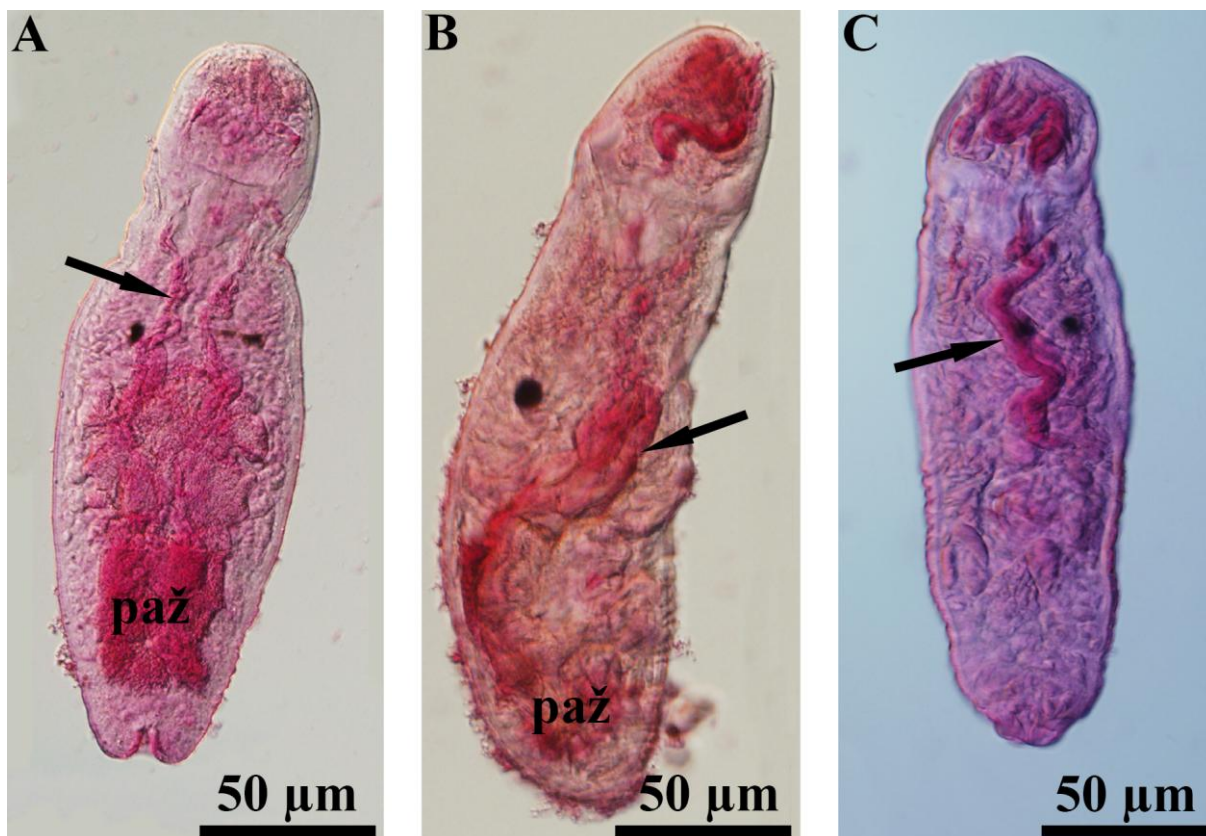
Graf 9. Sekrece posteriorní části CA žláz *T. regenti* barvených alizarínem v kachní kůži a jícnu během penetrace a 3 hodiny po ní. * významný rozdíl, testováni byli červi z kůže a jícnu najednou po časových intervalech 0,5;1 nebo 3 hodiny od penetrace, **hod pp** hodina po penetraci



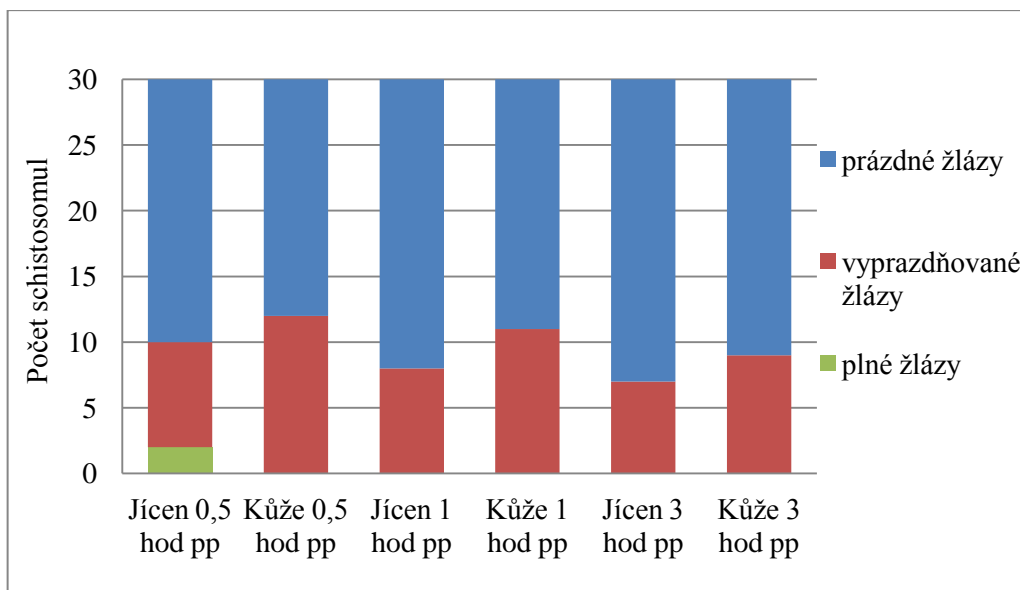
Graf 10. Sekrece posteriorní části CA žláz *T. regenti* barvených alizarínem v kachní kůži a jícnu během penetrace a 3 hodiny po ní. * významný rozdíl, testováni byli červi z každé tkáně jednotlivě v časových intervalech 0,5,1 a 3 hodin p.p., **hod pp** hodina po penetraci

5.4.2.4 Barvení schistosomul lithium-karmínem

Sledování časového průběhu vyprázdňování postacetabulárních žláz během 3 hodin po penetraci bylo provedeno na červech barvených lithium-karmínem. Tito červi byli získáni z kachní kůže a jícnu penetrovaných cercáriemi. Většina červů z kůže i jícnu měla PA žlázy vyprázdněné již 30 minut p.p.



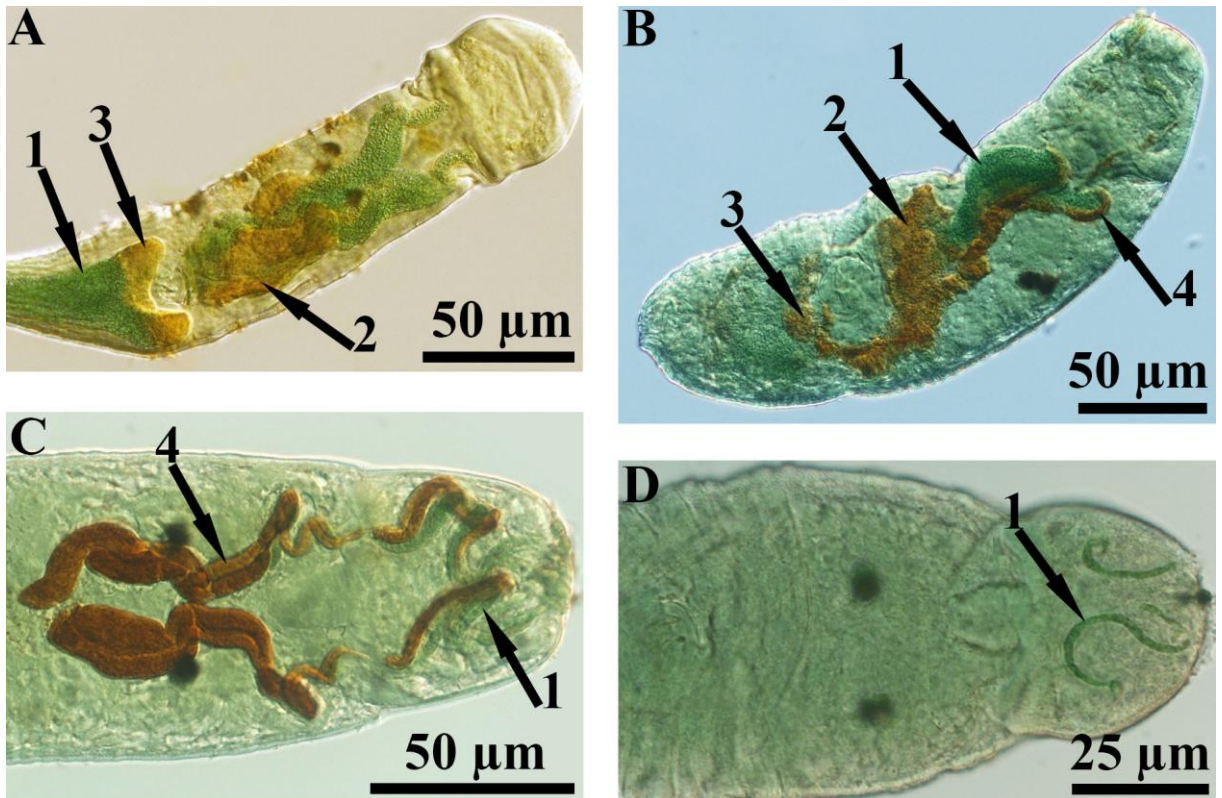
Obrázek 23. Časový průběh vyprázdnění postacetabulárních žláz motolice *T. regenti* během 3 hodin p.p. cercárií. **A:** červ z penetrované kůže kachny s nevyprázdněným obsahem PA žláz 30minut p.p. **B:** červ v procesu vyprázdňování PA žláz nalezený v kůži 1 hodinu p.p. **C:** červ z kachního jícnu s vyprázdněnými PA žlázami 3 hodiny p.p. **paž** postacetabulární žlázy, **šipka** vývody PA žláz



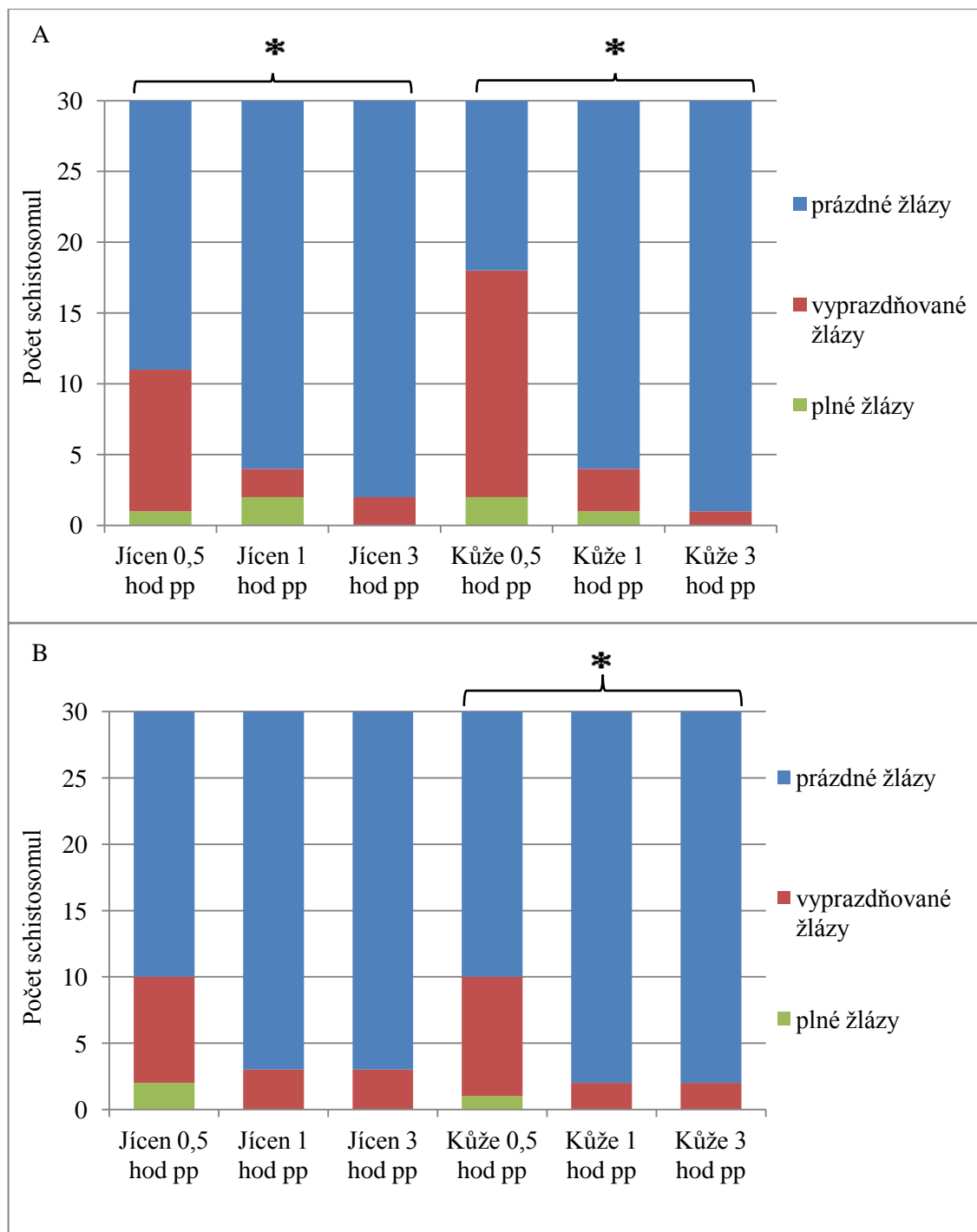
Graf 11. Vyprazdňování postacetabulárních žláz cercárií/schistosomul *T. regenti* během prvních 3 hodin od penetrace, barvení lithium-karmínem. hod pp hodina po penetraci

5.4.2.5 Barvení schistosomul apomorfinem

Poznatky o vyprazdňování CA a PA žláz schistosomul barvených alizarínem a lithium-karmínem byly rozšířeny o data, která byla získána po barvení červů apomorfinem. Z pořízených fotografií acetabulárních žláz bylo možné stanovit pořadí vyprazdňování CA a PA žláz u většiny červů: nejdříve se vyprázdňují sekrety PA žláz (do 30 minut p.p.), následně posteriorní (začátek vyprazdňování během prvních 30 minut p.p.) a nakonec i anteriorní části CA žláz (vyprázdňování mezi 1 a 3 hodinami p.p., viz obrázek 24). Tři hodiny od penetrace byly sekreční produkty acetabulárních žláz nacházeny pouze ve vývodech buněk, které tvoří penetrační žlázy.



Obrázek 24. Průběh vyprázdnění acetabulárních žláz motolice *T. regenti* barvené apomorfinem během 3 hodin od penetrace cercárií. **A:** cercárie s plnými žlázami. **B:** červ z jícnu s vyprázdněným obsahem PA žláz a posteriorních CA žláz 30 minut po penetraci. **C, D:** schistosomy z kachní kůže s vyprázdněnými PA i CA žlázami 1 hodinu (**C**), resp. 3 hodiny (**D**) od penetrace. **1** PA sekreční soustava, **2** anteriorní CA žlázy, **3** posteriorní CA žlázy, **4** vývody buněk CA žláz



Graf 12. Sekrece cirkumacetabulárních (A) a postacetabulárních (B) žláz cercárií/schistosomul *T. regenti* z kachní kůže a jícnu během 3 hodin od penetrace, barvení červů apomorfinem. * významný rozdíl, testována byla každá tkáň jednotlivě v časových intervalech 0,5, 1 a 3 hodiny p.p., hod pp hodina po penetraci

5.4.3 Statistické vyhodnocení

Časový průběh migrace kachní kůží a jícnem penetrovaných *in vitro*, a dynamika vyprazdňování penetračních žláz schistosomul *T. regenti* byly statisticky vyhodnoceny. Pomocí výsledné p-hodnoty pak byly určeny významné rozdíly (viz tabulka 14).

Tabulka 14. Statistické vyhodnocení migrace a vyprazdňování penetračních žláz *T. regenti* během prvních 3 hodin migrace. Žlutě jsou zvýrazněny p-hodnoty významných rozdílů. **H-E** hematoxylin-eozin, **L-K** lithium-karmín, **ESP** exkrečně-sekreční produkty, **RCA-I** lektin z *Ricinus communis*, **PNA** lektin z *Arachis hypogaea*. **CA** cirkumacetabulární, **PA** postacetabulární

Testováno Chí-kvadrát testem (červi z vybrané tkáně + délka doby inkubace v hodinách)	Výsledná p-hodnota	Poznámka
Migrace schistosomul tkání po penetraci		
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0001	v porovnání s jícnem je migrace červů hlouběji do kůže rychlejší
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0536	
Poloha těla schistosomuly (H-E)		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,7276	
kůže, 1 + jícen, 1	0,6748	
kůže, 3 + jícen, 3	0,5404	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,8979	
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,1164	
Počet schistosomul s neodhozeným ocáskem (H-E)		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,0001	více schistosomul s neodhozeným ocáskem je oproti kůži v jícnu
kůže, 1 + jícen, 1	0,0001	
kůže, 3 + jícen, 3	0,0001	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,3638	
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,4269	

Testováno Chí-kvadrát testem (červi z vybrané tkáně + délka doby inkubace v hodinách)	Výsledná p-hodnota	Poznámka
Počet schistosomul penetrujících tkáň ve skupině		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,3894	
kůže, 1 + jícen, 1	0,6876	
kůže, 3 + jícen, 3	0,9999	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,1113	
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,2271	
Množství ESP značených RCA-I v okolí schistosomul		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,0178	více uvolněných ESP se v okolí červů vyskytuje v kůži než v jícnu
kůže, 1 + jícen, 1	0,0103	
kůže, 3 + jícen, 3	0,0500	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0009	po penetraci dochází během prvních 3 hodin ke snížení množství uvolněných ESP nalezených v okolí červů
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0001	
Množství ESP značených PNA v okolí schistosomul		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,0001	více uvolněných ESP se v okolí červů vyskytuje v kůži než v jícnu
kůže, 1 + jícen, 1	0,0001	
kůže, 3 + jícen, 3	0,3554	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0001	po penetraci dochází během prvních 3 hodin ke snížení množství uvolněných ESP nalezených v okolí červů
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0002	
Vyprazdňování anteriorní části CA žláz schistosomul barvené alizarínem		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,0098	žlázy vyprázdní více červů v kůži než v jícnu
kůže, 1 + jícen, 1	0,9999	
kůže, 3 + jícen, 3	0,0114	žlázy vyprázdní více červů v kůži než v jícnu

Testováno Chí-kvadrát testem (červi z vybrané tkáně + délka doby inkubace v hodinách)	Výsledná p-hodnota	Poznámka
Vyprazdňování anteriorní části CA žláz schistosomul barvené alizarínem		
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0235	k vyprázdnění žláz většiny červů dochází během 30 minut p.p.
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,6269	
Vyprazdňování posteriorní části CA žláz schistosomul barvené alizarínem		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,1287	
kůže, 1 + jícen, 1	0,2839	
kůže, 3 + jícen, 3	0,0056	žlázy vyprázdní více červů v kůži než v jícnu
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0051	k vyprázdnění žláz většiny červů dochází během 30 minut
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0241	k vyprázdnění žláz většiny červů dochází během 30 minut p.p.
Vyprazdňování PA žláz schistosomul barvených L-K		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,2340	
kůže, 1 + jícen, 1	0,7174	
kůže, 3 + jícen, 3	0,6009	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,9570	
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,3663	
Vyprazdňování CA žláz schistosomul barvených apomorfinem		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,1922	
kůže, 1 + jícen, 1	0,7659	
kůže, 3 + jícen, 3	0,8749	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0001	po penetraci narůstá počet červů s prázdnými žlázami s průběhem času
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0106	

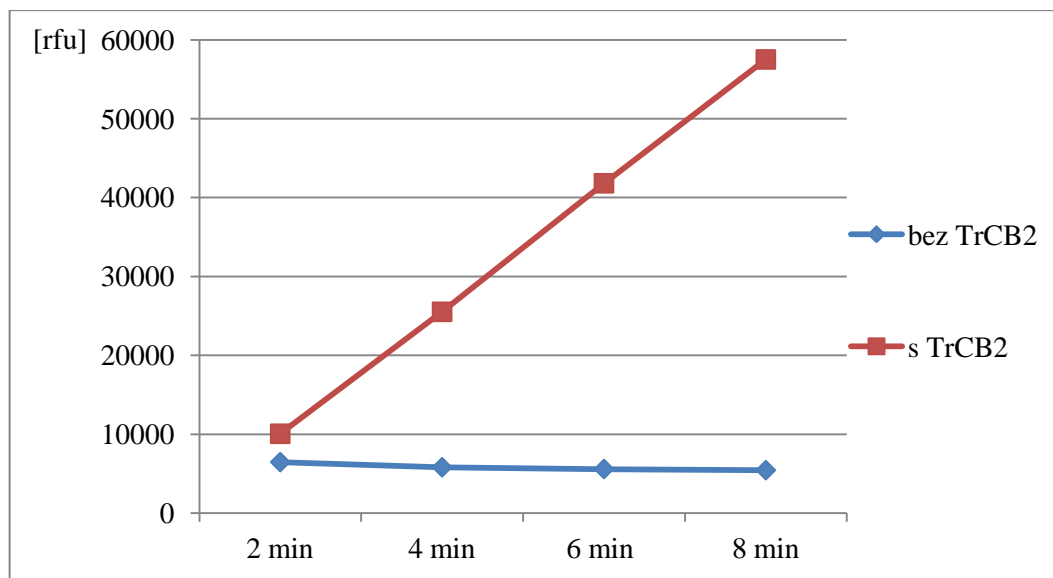
Testováno Chí-kvadrát testem (červi z vybrané tkáně + délka doby inkubace v hodinách)	Výsledná p-hodnota	Poznámka
Vyprazdňování PA žláz schistosomul barvených apomorfinem		
kůže, 0,5 + jícen, 0,5	0,8219	
kůže, 1 + jícen, 1	0,9119	
kůže, 3 + jícen, 3	0,9119	
kůže, 0,5 + kůže, 1 + kůže, 3	0,0217	po penetraci narůstá počet červů s prázdnými žlázami s průběhem času
jícen, 0,5 + jícen, 1 + jícen, 3	0,0576	

5.5 Proteolytické štěpení mucinů

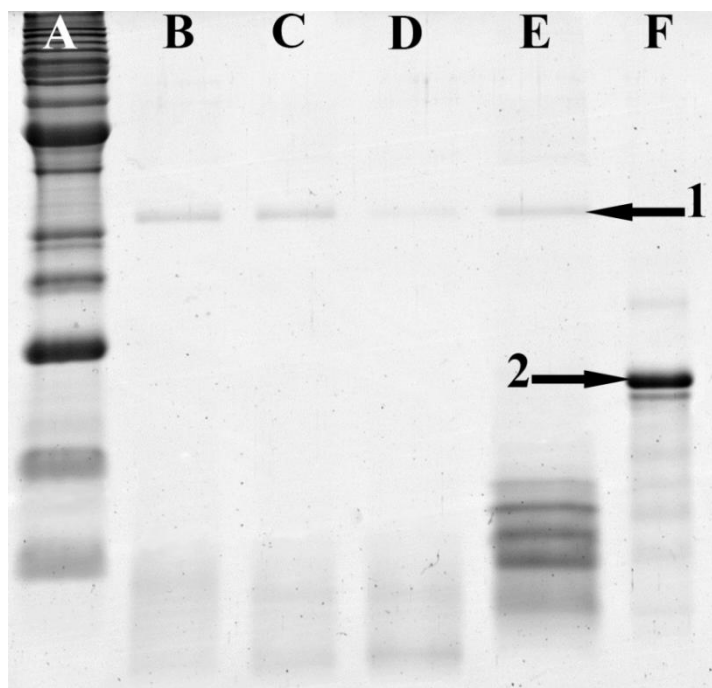
Stanovením proteolytické aktivity TrCB2 proti vybraným mucinům bylo zjištěno, zda motolice *T. regenti* proniká mucinovým hlenem kryjícím sliznici jícnu mechanicky nebo pomocí katepsinu B2. Koncentrace TrCB2 v citrát-fosfátovém pufru (zásobního roztok) byla stanovena na 1,30 g/μl.

5.5.1 Stanovení proteolytické aktivity TrCB2

Proteolytická aktivita roztoku TrCB2 byla určena dle degradace komerčního substrátu. Substrátovou doménu AMC štěpil TrCB2 ochotně. Katepsin B2 byl také během 1 hodiny schopný proteolyticky degradovat i MBP („myelin basic protein“). K částečné degradaci MBP došlo i katepsinem B2 inhibovaným pomocí E-64 (inkubace přes noc), jak ukazuje obrázek 25.



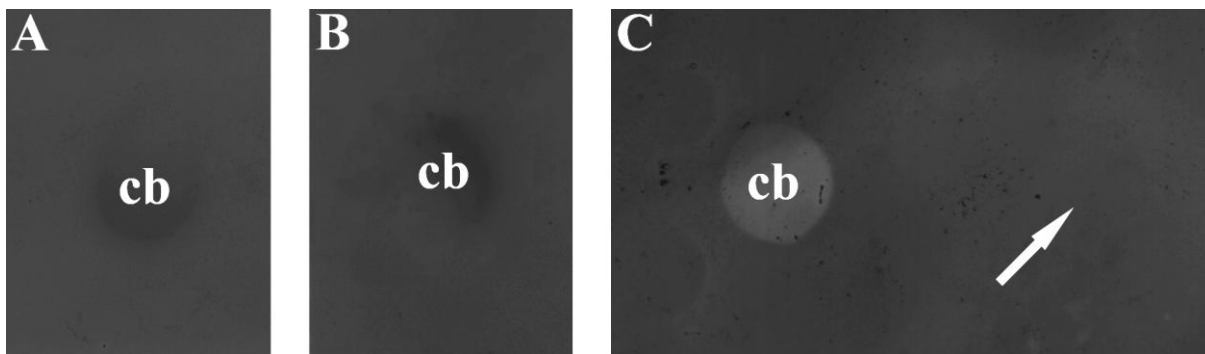
Graf 13. Stanovení proteolytické aktivity TrCB2 (výsledná koncentrace 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) štěpením domény AMC komerčního substrátu. Graf znázorňuje aritmetické průměry hodnot ze dvou opakování. rfu „relative fluorescent unit“



Obrázek 25: Separace štěpů MBP inkubovaného s TrCB2 pomocí SDS-PAGE elektroforézy. A: markery. B: inkubace 1 hodinu v roztoku s DTT. C: inkubace 3 hodiny v roztoku s DTT. D: inkubace přes noc v roztoku DTT. E: inkubace přes noc v roztoku s E-64. F: MBP bez TrCB2. 1 proužek katepsinu B2, 2 myelinový proužek

5.5.2 Dot bloty

Aktivita TrCB2 proti mucinům byla zkoumána inkubací této peptidázy se substrátovými gely. Substrátové gely obsahující muciny typu I nebo III nebyly na rozdíl od kontrolní želatiny katepsinem B2 motolice *T. regenti* proteolyticky degradované ani po inkubaci přes noc (viz obrázek 26).



Obrázek 26: Proteolytická aktivita TrCB2 proti mucinům, barvení Coomassie pomocí Brilliant Blue R-250. A, B: inkubovaný substrátový gel obsahující mucin typu I (A), resp. III (B), s TrCB2. **C:** inkubovaný kontrolní želatinový gel s TrCB2. **cb** místo nanesení kapky s katepsinem B2, **šipka** místo po nanesení kontrolní kapky vody

6. DISKUZE

Migrace tělem DH patří k důležitým aspektům životních cyklů schistosom vč. *Trichobilharzia* spp. Tato práce se zabývá migrací neurotropní *T. regenti* a viscerální *T. szidati* v definitivních a náhodných hostitelích nakažených alimentárně, a zaměřuje se na migraci schistosomul z trávicí soustavy (jícnu) během časně fáze infekce. Pokusy provedené v rámci této práce navazují na předchozí výzkum K. Blažové (nepublikováno), která se zabývala migrací *T. regenti* kachnami nakaženými alimentárně cercáriemi či hepatopankreaty infikovaných plžů *R. lagotis*.

6.1 Alimentární nákazy kachen motolicí *T. regenti*

Nálezy schistosomul ve stěně ústní dutiny, v jazyce, hltanu a jícnu svědčí o tom, že cercárie *T. regenti* mohou nakazit DH nejen ve vnějším prostředí, ale že zůstávají infekční i uvnitř DH. Nejdistančnějším orgánem ve směru od ústní dutiny, kde by teoreticky mohly cercárie úspěšně penetrovat stěnu trávicí trubice, je proventrikulus – svalnatý žaludek, ale Blažová (nepublikováno) v žaludeční stěně červy nikdy nenalezla. Pokud by cercárie byly schopné v ústní dutině, jazyce, hltanu a jícnu nalézt hlavové nervy inervující tyto tkáně (*nervus glossopharyngeus*, *n. hypoglosseus*, *n. accessorius*, *n. trigeminus*, *n. vagus*), domníváme se, že by se v mozku měly objevit dříve než 2. den p.i., kdy se červi již nacházejí v míše. V naší práci jsme se migrací schistosomul hlavovými nervy do mozku nezabývali, ale tuto hypotézu nepřímo podporují výsledky Blažové (nepublikováno), která schistosomuly v mozku alimentárně nakažených kachen nepozorovala ani 3. den p.i. Do míchy by schistosomuly *T. regenti* mohly z jícnu migrovat parasympatickými a sympatickými míšními nervy inervujícími jícen. V míšních nervech bylo ve srovnání s pozdějším výskytem schistosomul v míše nalezeno relativně malé množství migrujících červů. Migrace míšními nervy tak může být buď velmi rychlá, nebo se jedná pouze o jednu z cest vedoucích do míchy. Trávicí soustava schistosomul migrujících míšními nervy obsahovala granula připomínající pozřenu nervovou tkáň (Horák a kol., 1999, Blažová a Horák, 2005, Lichtenbergová a kol., 2011). Obsah střev ale nebyl např. využitím imunohistologických metod blíže charakterizován. Nebylo by příliš překvapivé, kdyby tkáň také periferní, a ne pouze centrální, nervové soustavy schistosomulám sloužila jako zdroj potravy (Lichtenbergová a kol., 2011).

Nálezy malého množství schistosomul v plicích 3. den p.i. naznačují, že někteří červi mohou invadovat míchu z krevního řečiště. Pravděpodobně se ale jedná o méně významnou migrační cestu (stejně jako u perkutánně nakažených ptáků, Horák a kol., 1999), protože většina schistosomul do míchy dorazí již 2. den p.i. Výskyt schistosomul v plicích 3. den p.i. mohl být při silné infekci také ektopický. Po invazi míchy pokračuje migrace schistosomul do mozku. Průnik do *b. olfactorius* je v perkutánně nakažených kachnách popisován 18. den p.i. (Hrádková a Horák., 2002). Blažová (nepublikováno) zde ale v alimentárně nakažených kachnách pozorovala červy o 11 dní dříve.

Vysvětlením takto rychlé migrace by mohlo být migrování právě periferními nervy inervujícími trávicí soustavu. Časově je výskyt červů v nazální sliznici kachen u perkutánních i perorálních infekcí nicméně podobný – cca 2. – 3. týden (Horák a kol., 1999, Chanová a Horák, 2007, Blažová, nepublikováno).

6.2 Alimentární infekce kachen motolicí *T. szidati*

Z jícnu kachen nakažených alimentárně cercáriemi *T. szidati* schistosomuly mizely relativně rychle a následně se (1 den p.i) vyskytovaly v žilní krvi. V porovnání s *T. regenti* může být rychlejší opuštění jícnu schistosomulami *T. szidati* zapříčiněno odlišným způsobem migrace tělem DH. Je možné, že ve sliznici jícnu je nalezení krevních kapilár snadnější než nalezení periferních nervů.

Nálezy většiny schistosomul v plicích kachen 2. a 3. den p.i. odpovídají jejich výskytu i v perkutánně nakažených kachnách (Chanová a kol., 2007). Absence schistosomul v játrech alimentárně nakažených kachen 2. a 3. den p.i., ve kterých se v perkutánně nakažených ptácích schistosomuly objevují již 1. den p.i., ovšem zůstává nevysvětlena. Podobný fenomén jsme pozorovali i v kachnách alimentárně nakažených hepatopankreaty plžů *L. stagnalis* infikovaných *T. szidati*.

Úspěšnost alimentárních infekcí kachen nakažených hepatopankreaty plžů *L. stagnalis* obsahujícími cercárie *T. szidati* nebo volnými cercáriemi *T. szidati* je dle počtu schistosomul nalezených v plicích 3. den p.i. (pozdější fázi infekce jsme se nezabývali) srovnatelná. Skutečnost, že lze kachny infikovat hepatopankreaty nakažených mezipřenosných plžů, mění pohled na koloběh nákazy v přírodě: DH se během zimní sezóny může infikovat pozřením zimujících vodních plžů (Blažová, nepublikováno). Nákazami přirozeně infikovaných ptáků motolicemi rodu *Trichobilharzia* během zimy se zabývali např. Jouet a kol. (2008). Z epizootologického hlediska je významné, že hepatopankreaty nakažených plžů představují pro DH silnou jednorázovou infekční dávku. V přírodě by se tak vodní ptáci mohli pozřením nakažených plžů infikovat efektivněji v porovnání s perkutánním způsobem nákazy volnými cercáriemi.

6.3 Alimentární infekce myši cercáriemi *T. szidati*

Většina schistosomul *T. szidati* opouští jícen alimentárně infikovaných myši i kachen mezi 12 a 24 hodinami od infekce. Pro schistosomuly *T. szidati* tedy nalezení krevních cév, kterými viscerální druhy schistosom migrují (Bourns a kol., 1973), v jícnu náhodného hostitele nepředstavuje problém. Po opuštění jícnu alimentárně nakažených myši se schistosomuly hromadí v plicích, ve kterých se stejně jako v plicích myši nakažených perkutánně objevují 2. den od nákazy (Chanová a Horák, 2007). Opuštění plic nakažených myši může být pro schistosomuly *T. szidati* problematické. V plicích myši se na rozdíl od plic kachen schistosomuly *T. szidati* vyskytují ve stěnách alveolů (Chanová a Horák, 2007). V plicích nakažených myši se proti schistosomulám nevytváří specifická imunitní odpověď (v malém množství jsou přítomny pouze lymfocyty v periferních částech plicních

laloků) a tento orgán tedy neslouží jako imunitní bariéra (Chanová a Horák, 2007). Je mnohem pravděpodobnější, že nalezení plicních žil, kterými by schistosomuly pokračovaly v migraci, je pro *T. szidati* obtížné. Svědčí o tom pouze ojedinělé nálezy červů v játrech myši z našich pokusů 2. den p.i. Dostupná data o výskytu schistosomul *T. szidati* v játrech perkutánně nakažených myši jsou v rozporu: Olivier (1953) zde nikdy červy nenalezl, ale Haas a Pietsch (1991) v játrech myši 2. – 5. den p.i. zaznamenali signál dokládající výskyt radioaktivně značených červů. Střevní obsah schistosomul nalezených 2. den p.i. v játrech myši nakažených alimentárně se lišil od střevního obsahu stejně starých schistosomul z plic. Schistosomuly se tedy asi živí nejen erythrocyty (Horák a Kolářová, 2000), ale také okolní tkáně. Je pozoruhodné, že schistosomuly nalezené v jícnu myši 2. den po infekci měly trávicí soustavu bez jakéhokoli obsahu.

6.4 Alimentární infekce myši cercáriemi *T. regenti*

Spíše vzácné nálezy schistosomul v míšních nervech a relativně malý počet červů nalezených v plicích alimentárně nakažených myši odpovídá situaci u alimentárně nakažených kachen. V míšních nervech myši nakažených alimentárně byly pozorovány pouze mrtvé schistosomuly. Jejich úhyn během prvních 24 hodin infekce pravděpodobně nebyl způsoben nedostatkem potravy. V přirozených hostitelích totiž byly živé schistosomuly s prázdnými střevy ojediněle pozorovány v jícnové sliznici i 2 dny po infekci. Konec migrace a úhyn schistosomul v míšních nervech náhodného hostitele tedy pravděpodobně souvisí s imunitní reakcí proti parazitovi. Na té se v nervové soustavě kromě neutrofilů podílí i aktivované makrofágy, mikroglie, astrocyty a CD3⁺ lymfocyty (Kouřilová a kol., 2004a, Lichtenbergová a kol., 2011). Úhyny schistosomul v periferních nervech alimentárně nakažených myši se liší od situace u perkutánně nakažených myši, jejichž periferními nervy schistosomuly *T. regenti* migrují do míchy úspěšně (Hrádková a Horák, 2002). Migrace schistosomul z jícnu do míchy tak možná probíhá jinou cestou, např. krevním řečištěm. Výskyt schistosomul v plicích perkutánně nakažených myši je však v současné době považován za ektopický (Lichtenbergová a kol., 2011). Je zajímavé, že přítomnost červů v plicích a míše alimentárně nakažených myši od 2. dne p.i. odpovídá výskytu schistosomul v těchto tkáních u perkutánně nakažených myši (Chanová a kol., 2007, Hrádková a Horák, 2002).

Výskyt pouze jedné (mrtvé) schistosomuly v mezižební svalovině je pravděpodobně ektopický. Tato schistosomula na roztlakovém preparátu myšního hrudního koše by bez značení červů pomocí CFSE byla pravděpodobně přehlédnuta. U infekcí myši nakažených alimentárně cercáriemi značenými pomocí CFSE se toto značení ukázalo jako přínosné také při hledání schistosomul na roztlakových preparátech jícnu a míchy. Tkáně těchto orgánů nejsou homogenní. Jícen může obsahovat části pozřené potravy i přes odstavení myši od potravy před nákazou. V nervové soustavě se zase mohou vytvářet krevní sraženiny připomínající mrtvé schistosomuly.

6.5 Subkutánní nákazy myši schistosomulami *T. regenti*

Subkutánně je možné nakazit laboratorní myši např. cercáriemi či schistosomulami *S. mansoni* transformovanými *in vitro*. Nákaza schistosomulami může být dokonce úspěšnější než nákaza subkutánně injikovanými cercáriemi (Vilar a Pinto, 2005). Neúspěch námi provedených subkutánních nákaz myši schistosomulami *T. regenti* transformovanými *in vivo* v kachně si lze vysvětlit tím, že parazit nebyl schopen nalézt migrační cestu do míchy náhodného hostitele. Dalším důvodem mohla být např. reakce imunitního systému myši s kachními antigeny na povrchu schistosomul (Sell a Dean, 1972, Smithers a kol., 1969).

6.6 Perkutánní nákazy myši cercáriemi *T. regenti*

Dočasná paralýza zadních končetin myši nakažených perkutánně během anestezie, a navíc pouze těch končetin, do kterých byla cercáriím umožněna penetrace, byla pozorována poprvé (2. a 3. den p.i.). Příčinou této paralýzy mohlo být poškození periferních nervů v době, kdy se většina schistosomul stále nachází v periferním nervovém systému myši (Hrádková a Horák, 2002). Paralýza zadních končetin byla u myši popsána až 10. den p.i. (u jedné myši se ale paralýza objevila 4. den p.i. a odezněla 7. den p.i., Horák a kol., 1999), resp. 6. den p.i. u imunodeficientní myši (kmen SCID, Kouřilová a kol., 2004a). Stejně jako u kachen se i u myši předpokládá, že paralýza končetin vzniká díky neuropatologickým změnám působeným schistosomulami, které migrují míchou hostitele (Lichtenbergová a kol., 2011). V případě silné infekce může být nicméně paralýza končetin způsobena zřejmě i poškozením periferních nervů.

6.7 Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži kachen opakovaně nakažených *T. regenti*

Ve vrchním epitelu jícnu 4x nakažených kachen se v blízkosti nekrotických ložisek, která pravděpodobně způsobili migrující červi, často vyskytoval buněčný infiltrát. Méně rozsáhlý infiltrát byl přítomný i na sliznici jícnu nenakažených ptáků. Infiltrace hlenových žláz a jejich vývodů leukocyty je v jícních běžná především u starších ptáků (Černý, 2005). V jícních 4x nakažených kachen (zejména poblíž nekrotických ložisek) byl ale nacházen rozsáhlejší buněčný infiltrát, a to i v případech, kdy červi na konkrétním histologickém řezu nebyli prokázáni. Je možné, že rychlou migrací povrchovým epitelem červi mohou unikat před obrannou reakcí imunitního systému. To se ale nezdá příliš pravděpodobné, protože horizontální migrace červů epitelovou vrstvou byla patrná i na histologických řezech jícnů (naivní kachny) penetrovaných cercáriemi *in vitro*.

Většina červů *T. regenti* opustila jícn kachen, které byly alimentárně primoinfikovány za účelem studia migrace tělem DH, kolem 24 hodin p.i. Po této době zůstalo v jícnu primoinfikovaných ptáků pouze několik červů. V jícnu 4x nakažených kachen nebyl imunitní systém hostitele schopný během prvních dvou dní infekce narušit tegument schistosomul. To je v kontrastu se situací v kůži kachen nakažených 4x, ve které byli mrtví červi v tomto období nacházeni. Pokud by slizniční

imunitní systém kachen nebyl schopný penetrující červy eliminovat, jednalo by se i přes nižší úspěšnost alimentární infekce v porovnání s infekcí perkutánní o epizootologicky významný fakt. Boulanger a kol. (1999), kteří se zabývali alimentárními nákazami koz cercáriemi *S. bovis*, navíc zjistili, že opakované alimentární nákazy vyústí v imunitní toleranci parazita. Opakované perkutánní nákazy naopak vedou k vytvoření získané imunity proti parazitovi (Boulanger a kol., 1999, cit. dle Lindberg a kol., 1995).

Prázdňé místo v okolí živých červů nalezených s nepoškozeným tegumentem na rozhraní vrstev *stratum germinativum* a *corium* kůže 4x infikovaných kachen 1. i 2. den p.i. mohlo být způsobené fixací tkáně nebo při krájení parafinových bločků na mikrotomu. Nelze ale vyloučit ani mechanické poškození okolní tkáně migrujícími schistosomulami nebo histolytické působení jejich sekrečních produktů acetabulárních žláz. Negativní vliv sekrečních produktů schistosomul na okolní tkáň dokládají námi pořízené fotografie histologických řezů kůže penetrované cercáriemi *in vitro*. Tyto řezy byly inkubovány s fluorescenčně značenými lektiny nebo protilátkami proti TrCB2. Schistosomuly jsou na nich fluorescenčním signálem obklopeny.

V kůži kachen infikovaných 4x perkutánně byla nacházena místa s nápadně silnějšími vrstvami *stratum corneum* a *s. germinativum*. Domníváme se, že se jednalo o hojící se nebo již zahojenou tkáň poškozenou penetrujícími cercáriemi. V blízkosti těchto míst se totiž často vyskytovaly mrtvé schistosomuly. Tito červi však pravděpodobně nepochází z poslední, ale spíše ze 2. či 3. infekce. Pokud by naopak tyto schistosomuly byly poškozeny během prvních 2 dní po 4. perkutánní infekci, rozdíl v životaschopnosti schistosomul v jícnu a kůži by mohl být vysvětlen např. zásahem různých typů specifických protilátek proti cercáriím/schistosomulám v těchto tkáních.

Sledováním změn koncentrace IgY v krvi kachen reinfikovaných pro naše pokusy došla L. Turjanicová (nepublikováno) k závěru, že se hladina IgY začala v krvi zvyšovat bez závislosti na věku nakažených kachen cca 10. den p.i. Nejvyšších hladin IgY bylo dosaženo cca 20 dní po první naze. Produkce IgA zasahujícího na sliznicích (Tizard, 2002) je oproti IgY, ptačímu homologu savčích IgG a IgE (Taylor a kol., 2009), až o 30 dní opožděná (Ng a Higgins, 1986) a je věkově závislá. Normálních hodnot dosahuje IgA až mezi 55. a 60. dnem po narození (Ng a Higgins, 1986). Cercárie se tedy ve sliznici jícnu alimentárně nakažených kachen (v našich pokusech byli nakažení ptáci usmrceni ve věku 45, resp. 46 dní) setkávaly s prostředím s nižší koncentrací IgA (Lillehoj a Trout, 1996). Je ale možné, že IgY mohl být spoluzodpovědný za eliminaci schistosomul v kůži reinfikovaných ptáků. Z hlediska poškození schistosomul protilátkami zprostředkovanou imunitní odpovědí by pak alimentární způsob nákazy nedospělých ptáků mohl pro *T. regenti* představovat menší riziko.

V kůži ani v jícnu nakažených ptáků nebyla buněčná imunitní odpověď doposud studována. Je však známo, že v kůži reinfikovaných náhodných hostitelů – myši – může dojít k eliminaci většiny migrujících červů (Kouřilová a kol., 2004b). Dá se ale předpokládat, že na obrannou reakci ptačího

imunitního systému bude *T. regenti* lépe adaptovaná a že počet eliminovaných schistosomul bude v kachní kůži menší.

6.8 Výskyt buněčného infiltrátu v jícnu a kůži myši opakovaně nakažených *T. szidati*

V jícních myši infikovaných *T. szidati* byly 1 den po 4. nákaze pozorovány schistosomuly jak neobklopené, tak obklopené buněčným infiltrátem přítomným v *lamina propria*. Leukocyty se na řezech vyskytovaly zejména v blízkosti červů nebo byly součástí granulomatózních lézí. Schistosomuly nalezené bez přítomnosti okolního infiltrátu mohly z jeho dosahu uniknout horizontálním migrováním epitelem podobně jako v jícních reinfikovaných kachen, neboť v *lamina propria* byly 1 den p.i. schistosomuly pozorovány jen zřídka.

Kůže myši penetrovaná cercáriemi při poslední (4) nákaze byla na rozdíl od nepenetrované kůže nápadně zarudlá, pravděpodobně vlivem histaminu působící permeabilizaci cév (Kouřilová a kol., 2004b). Oproti jícnu v ní byl pozorován buněčný infiltrát obklopující všechny červy ve větším rozsahu. Histamin je v kůži 4x nakažených myši produkován žírnými buňkami a basofily, a kromě zvýšené permeabilizace krevních cév způsobuje také otok tkáně (Kouřilová a kol., 2004b). Takovou tkáň by pak schistosomuly mohly snáze migrovat, což může naznačovat situace po penetraci kůže 4x nakažených myši. Schistosomuly migrovaly touto tkání spíše vertikálně, a ne nejprve horizontálně vrstvou *stratum corneum*, jak tomu bylo u kůže myši nakažené pouze 2x. Jelikož pro tento pokus byla úspěšně nakažena jen 1 myš, bylo by potřeba tyto domněnky ověřit nálezem více myši.

Kolem schistosomul migrujících kůži myši nakažených celkem 2x i 4x se vyskytoval rozsáhlý buněčný infiltrát. Tegument schistosomuly byl ale 1 den p.i. nepoškozený, což je v kontrastu s výsledky Kouřilové a kol. (2004a), kteří v kůži 5x infikovaných (14-denní intervaly) myši (kmen hr/hr a imunodeficientní kmen SCID) 1 den p.i. našli poškozené schistosomuly. Vysvětlením by mohl být různý počet opakovaných nálezů či rozdílná reakce použitých inbredních kmenů myši na parazita.

6.9 Penetrace kachní kůže cercáriemi *T. regenti in vitro*

Stejně jako cercárie *T. szidati* (Haas a van de Roemer, 1998) a *S. mansoni* (Haas a Haeberlein, 2009) i cercárie *T. regenti* někdy penetrují kachní kůži ve skupinách a snadněji ji tak narušují. Výskyt většiny červů ve vrstvě *stratum corneum* anebo pod ní během prvních 30 minut po penetraci svědčí pro dobrou adaptaci *T. regenti* na perkutánní cestu infekce. První schistosomuly se do kachní kůže, kde u ptáků končí nervová zakončení (Hemming a kol., 1994) a kde by tedy schistosomuly mohly vstupovat do nervové soustavy, dostávají již během prvních 30 minut p.p. *Corium* kachní kůže větší počet schistosomul invaduje 3 hodiny p.p., v případě myši kůže se v této vrstvě první schistosomuly vyskytují až 4 hodiny p.p. (Kouřilová a kol., 2004a). Pomalejší migrace savčí kůži může být způsobena odlišnou fyziologií a anatomií ptáků a savců. Na druhou stranu je ale např. koncentrace

ceramidů a cholesterolu, které u ptačích schistosom stimuluji vyprazdňování acetabulárních žláz (Haas a Haeberlein, 2009), v kůži savců a vodních ptáků srovnatelná (Horák a Kolářová, 2001). Koncentrace volných mastných kyselin, které sekreci acetabulárních žláz také stimuluji a působí jako dominantní penetrační stimul, je paradoxně vyšší v kůži savců v porovnání s kůží ptáků (Haas a Haeberlein, 2001). Rychlost migrace schistosomul kůží tedy nezávisí na stimulaci sekrece penetračních žláz, ale je ovlivněna jiným faktorem, např. imunitní odpovědí hostitele na parazita nebo orientací schistosomul v kůži hostitelů.

Zajímavé by bylo porovnat rychlost migrace neurotropní *T. regenti* a viscerální *T. szidati* ptačí kůží *in vivo* a pokusit se zjistit, kde *T. regenti* invaduje periferní nervy a jestli *T. szidati* vstupuje do krevního řečiště ve škáře nebo podkožním vazivu, jako např. *S. japonicum* (He a kol., 1990).

Vyprazdňování acetabulárních žláz během penetrace a časné fáze migrace bylo v této práci studováno *in vitro*. Inkubací cercárií s kachním jícnem nebo kůží 0,5, 1 nebo 3 hodiny bylo následně možné získat živé schistosomuly s vyprazdňovanými žlázami. Žlázy těchto schistosomul byly barveny alizarínem, apomorfinem a lithium-karmínem. Parafínové řezy zhotovené ze zmíněných tkání byly inkubovány s protilátkami proti TrCB2 nebo lektiny PNA a RCA-I. Bylo zjištěno, že míra vyprázdnění acetabulárních žláz u schistosomul z kůže odpovídá množství sekrečních produktů v okolí schistosomul; v případě schistosomul z jícnu je tento vztah méně patrný. Pořadí, v jakém jsou sekrety uvolňovány do okolí, se z pořízených fotografií barvených schistosomul z obou tkání zdá být stejné: nejprve dojde k vyprázdnění PA žláz, pak posteriorních CA žláz a nakonec anteriorních CA žláz. Právě toto pořadí by mohlo zaručovat aktivaci TrCB2 až ve chvíli dodání Ca^{2+} iontů z CA žláz (Ligasová a kol., 2011). Vápenaté ionty by mohly zajišťovat prostředí s optimálním pH (Ligasová a kol., 2011), neboť u jiné schistosomy (*S. japonicum*) byl prokázán výskyt calpainu, tedy cysteinové proteázy, jejíž aktivita je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů (Witkowski a kol., 2002), v penetračních žlázách (Kumagai a kol., 2004). U opačného pořadí vyprazdňování CA a PA žláz by ve vodním prostředí hrozilo odplavení iontů a neaktivování peptidázy, a tedy menší šance cercárií na úspěšnou penetraci. Mikeš a kol. (2005) se domnívají, že Ca^{2+} ionty mohou ve volném prostředí hrát roli „cross-linkerů“ způsobujících polymerizaci mukopolysacharidů vyloučených z PA žláz do lepivého polymeru. Podle autorů by tento polymer mohl usnadňovat přichycení cercárií k podkladu, resp. penetrované kůži. Tuto domněnku podporují námi pořízené fotografie cercárií, které hromadně penetrují kůži kachen v jednom místě. V takových případech jsou cercárie sekrety žláz obklopeny ze všech stran.

Za účelem detekce sekretovaného obsahu acetabulárních žláz byly v této práci inkubovány histologické řezy jícnu a kůže kachen, které byly penetrovány cercáriemi *T. regenti in vitro*, s fluorescenčně značenými lektiny RCA-I a PNA. Vazby jednotlivých lektinů přinesly rozdílné výsledky. Řezy tkáněmi se lišily dle síly signálu a doby od penetrace. Lektin PNA (váže se na PA žlázy cercárií), na rozdíl od lektinu RCA-I (váže se na CA i PA žlázy cercárií), reagoval silně na

řezech kůže i 1 hodinu p.p. To by za předpokladu, že produkty CA i PA žláz vydrží ve tkáni stejně dlouho, mohlo znamenat, že vyprazdňování PA žláz trvá déle než vyprazdňování CA žláz. Po tuto dobu se navíc katepsin B2 zdá být nepostradatelný při štěpení vrstvy *stratum corneum*. Tato vrstva představuje prostředí s optimální hodnotou pH pro TrCB2 (pH 6, Dolečková a kol., 2009, Ligasová a kol., 2011), takže ve vrchních vrstvách kůže, kterými bezprostředně po penetraci červi migrují, by pak TrCB2 mohl být proteolyticky aktivní i bez hypotetické úpravy okolního pH Ca²⁺ ionty.

6.10 Penetrace kachního jícnu cercářiemi *T. regenti in vitro*

Na rozdíl od kůže byly cercárie v jícnu kachen pozorovány v blízkosti jiných jedinců jen vzácně. Cercárie jsou při penetraci kůže atrahovány složkami narušené tkáně uvolňované do prostředí (Haas a van de Roemer, 1998). Je ale těžké si představit, že k podobnému jevu dochází i na sliznici jícnu, kde cercárie před přisednutím na tkáň hostitele nemají možnost volného pohybu jako ve vodním prostředí. Proto se domníváme, že cercárie pravděpodobně penetrují jícen v blízkosti místa přisednutí na sliznici.

Cercárie *T. regenti* setrvávají po penetraci až 3 hodiny ve vrchním epitelu sliznice jícnu a mají asi v 50 % připojené ocásky. Proces penetrace se u savčích a ptačích schistosom liší; energické pohyby ocásků cercárií *S. mansoni* podporují vstup červů do penetrované kůže, kdežto cercárie motolice *T. ocellata* pronikají do kůže již bez ocásků díky odstrkování se zadním koncem těla (Haas a van de Roemer, 1998). Je tedy možné, že rozdíl v rychlosti migrace a odhození ocásků cercárií *T. regenti* v jícnu ve srovnání s kůží souvisí s absencí pevného podkladu nebo nedostatkem signálů.

Barvení obsahu acetabulárních žláz schistosomul z jícnu kachen během ukázalo, že k vyprázdnění CA i PA žláz dochází u většiny schistosomul během prvních 30 minut od penetrace, což podporuje hypotézu, že se CA i PA žlázy vyprazdňují najednou (Mikeš a kol., 2005). Mikeš a kol. (2005) se dále domnívají, že k aktivaci sekrečních produktů dochází až mimo tělo cercárie. Pokud by cercárie vypustily veškerý obsah acetabulárních žláz do okolí se zahájením penetrace, bylo by sekrečních produktů nacházeno na histologických řezech větší množství. Je možné, že při průniku do epitelu vyprázdní cercárie své acetabulární žlázy, ale z penetrovaného místa měkkým hlenem migrují dál (viz obrázek 18). Pro tuto domněnku svědčí i nálezy nekrotických ložisek v epitelu jícnu opakovaně nakažených myší a kachen. Domníváme se, že se jedná o tkáň poškozenou průnikem cercárií/schistosomul. Na histologických řezech se však fluorescenčně značené lektiny PNA a RCA-I vázaly na penetrační žlázy uvnitř červů nacházených v jícnovém epitelu. Jak naznačují výsledky barvení žláz celých schistosomul, lektiny se mohly vázat na zbytkový obsah již prázdných žláz. Vyprázdnění obsahu žláz bezprostředně po penetraci a následnou rychlou horizontální migraci vrchním epitelem jícnu podporuje také značení protilátkami proti rekombinantnímu katepsinu B2. Katepsin B2 nebyl během žádného časového intervalu (30, 60 a 180 minut od penetrace) protilátkami detekován uvnitř PA žláz červů na parafinových řezech kachním jícnem a kůží penetrovaných

cerkáriemi. Signál přitom nebyl získán ani v okolí cercárií/schistosomul na řezech jícnem, na kterých bylo pozorováno pouze minimální vyprázdnění acetabulárních žláz. Na JB-4 Plus řezech cercáriemi se protilátky proti TrCB2 uvnitř PA žláz ale vázaly. Domníváme se, že tento rozdíl byl způsoben zaléváním do různých montovacích médií. K potvrzení této domněnky jsme však neměli dostatek pozitivního séra. Negativní vliv Bouinovy tekutiny na detekci TrCB2 uvnitř žláz červů na parafinových řezech byl vyloučen. Použitou fixací byly fixovány i cercárie montované do JB-4 Plus. Fixace vzorků Bouinovou tekutinou se nám navíc pro imunohistochemii osvědčila více než fixace 4% paraformaldehydem, který se v naší laboratoři pro imunohistochemii rutinně používá. Slabý signál mohl být způsobený nedostatečným odmaskováním antigenních epitopů TrCB2 během zahřívání řezů v Tris-EDTA pufru.

6.11 Proteolytická degradace mucinů katepsinem B2 motolice *T. regenti*

Katepsin B2 motolice *T. regenti* usnadňuje cercáriím penetraci kůže tím, že štěpí některé její proteinové komponenty (elastin, keratin a kolagen, Dolečková a kol., 2009). Ke zjištění, zda je tento enzym nezbytný i pro penetraci jícnu, byl TrCB2 inkubován s muciny typu I nebo III. Hlen chránící sliznice trávicí soustavy je tvořen převážně muciny (Tytgat a kol., 1993). Degradace mucinů katepsinem B2 byla zkoumána inkubací této peptidázy se substrátovými gely obsahujícími vždy jeden typ mucinu (dál jen gely). Abychom určili, zda došlo k degradaci glykoproteinů, bylo nutné muciny opticky zviditelnit barvením gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (dál jen Coomassie) nebo PAS reakce. Je zajímavé, že ačkoli se PAS reakce na detekci mucinových proužků v elektroforetických gelech běžně užívá (např. Dubray a Bezard, 1982), při použití tohoto druhu barvení mucinů obsažených v substrátových gelech jsme s ní měli horší výsledky než s barvením Coomassie. Barvení gelů PAS reakcí bylo nerovnoměrné. Slabší zbarvení některých oblastí gelů mohlo být způsobeno např. nedostatečnou oxidací polysacharidů kyselinou jodistou. Barvení pomocí Coomassie fungovalo nejlépe na gelech obsahujících 1 % mucinu. Gely s 0,1 % mucinu se barvily slaběji pravděpodobně kvůli tomu, že proteinová složka je v silně glykosylovaných mucinech těžko přístupná a zastoupena jen v malé míře.

Katepsin B2 *T. regenti* v našich pokusech nebyl schopný proteolyticky degradovat muciny typu I a III. Jeho aktivita proti myelinu a některým komponentám kůže, jejichž molekulová hmotnost je oproti mucinům až řádově menší, byla v minulosti již prokázána (Dolečková a kol., 2009). V této práci byla degradací myelinu ověřena funkčnost TrCB2. Myelin byl částečně degradován i katepsinem B2, který byl inhibovaný reverzibilním inhibitorem E-64. Právě reverzibilita inhibitoru mohla způsobit, že aktivní místo enzymu nebylo blokováno nepřetržitě a že v daný moment byla vždy část molekul enzymu proteolyticky aktivní.

Peptidázy často štěpí až samotné proteinové jádro molekuly mucinů deglykosylované jinými mucinázi (Dwarakanath a kol., 1995). Je možné, že mimo přílišnou velikost mucinů a jejich

glykosylaci nedošlo k interakci aktivního místa TrCB2 s těmito molekulami také díky nevyhovujícímu pH: cysteinová peptidáza nematoda *Passalurus ambiguus* dokáže muciny stejného typu, který byl použit i v naší práci, degradovat v prostředí kyselého pH, peptidázy *Syphacia muris* naopak v prostředí alkalického pH (Vadlejch a kol., 2010). Proteolytickou aktivitu TrCB2 proti mucinům by proto bylo nutné ověřit např. inkubacemi substrátových gelů za jiných hodnot pH než je optimum TrCB2 – pH 6 (Dolečková a kol., 2009).

Na rozdíl od výše zmíněných nematodů, pro které je hlen trávicí soustavy hostitele pravděpodobně nutričně významný (Vadlejch a kol., 2010), chybí evoluční tlak na tvorbu mucinů u *T. regenti*. I přes to je ale *T. regenti* schopná invadovat jícen DH a migrovat až do nazální sliznice.

7. ZÁVĚR

V této práci byla studována počáteční fáze migrace motolic *T. regenti* a *T. szidati* v alimentárně nakažených definitivních a náhodných hostitelích, a to zejména prohlížením orgánů nakažených hostitelů, a dále histologickými a základními biochemickými metodami. Nashromážděné poznatky o alimentárních nákazách definitivních a náhodných hostitelů byla porovnávána s již známými nebo nově získanými daty o percutánních nákazách těchto hostitelů. Diplomová práce přinesla následující významné výsledky:

- Penetrace kůže kachen cercáriemi *T. regenti in vitro* může probíhat ve skupině a dochází během ní k intenzivnímu vyprazdňování acetabulárních žláz. Cercárie ihned po penetraci odhazují ocásky a během prvních 30 minut po penetraci migrují horizontálně s povrchem vrstvou *stratum corneum* nebo na rozmezí vrstev *s. corneum* a *s. germinativum*. Sekrece produktů acetabulárních žláz (vč. TrCB2) migrujícími schistosomulami trvá alespoň 1 hodinu od zahájení penetrace. Migrace kůží definitivních hostitelů je oproti kůži náhodných hostitelů rychlejší, neboť první schistosomuly invadují *corium* již 30 minut od penetrace.
- Invaze jícnu kachen cercáriemi *T. regenti in vitro* je doprovázena sekrecí jen minimálního množství produktů acetabulárních žláz (vč. katepsinu B2). Cercárie zůstávají ve vrchním epitelu minimálně 3 hodiny a asi polovina z nich si během této doby ponechává neodhozené ocásky.
- Z jícnu do centrální nervové soustavy alimentárně nakažených kachen a náhodných hostitelů (myší) může *T. regenti* migrovat míšními nervy; jiné cesty, např. krevním řečištěm, však nelze vyloučit. V míšních nervech alimentárně infikovaných myší byly na rozdíl od kachen nalezeny pouze mrtvé schistosomuly, což však neznamenal likvidaci vlastní infekce. V alimentárně nakažených myších byly některé schistosomuly schopné 5. den po infekci proniknout až do mozku. U kachen byly první schistosomuly byly v prodloužené míše kachen nacházeny již 2 dny po infekci.
- Viscerální schistosoma *T. szidati* je v kachnách nakažených alimentárně cercáriemi i hepatopankreaty infikovaných plžů, a také v myších infikovaných alimentárně cercáriemi schopná migrace krevními cévami do plic, ve kterých se u obou zvířat schistosomuly objevují 2. den po infekci.

- Dočasná paralýza myší infikovaných perkutánně cercáriemi *T. regenti* je způsobována nejen poškozením míchy migrujícími schistosomulami, jak se doposud uvádělo, ale zřejmě i poškozením periferních nervů. Tkáň periferního nervového systému může schistosomulám motolice *T. regenti* pravděpodobně sloužit jako zdroj potravy.
- V kůži 4x nakažených kachen je imunitní systém schopný eliminovat schistosomuly *T. regenti*. Zneškodnění červů v kůži nastupuje po více jak dvou dnech od začátku penetrace, během kterých zůstává tegument schistosomul neporušený. V kůži myší nebyly pozorovány mrtvé schistosomuly, přestože se v jejich blízkosti buněčný infiltrát vyskytoval již po prvním dni od druhé nákaze.
- Migrující cercárie/schistosomuly *T. regenti* za sebou zanechávaly nekrotické léze v epitelu jícnu 4x nakažených kachen a myší. V jícnu nakažených myší se navíc 1 den po poslední infekci vyskytovaly i hemorhagie. Buněčný imunitní systém DH (zejména granulocyty) proti schistosomulám zasahuje v *lamina propria* již jeden den po infekci. V tuto dobu jsou červi ale stále naživu.
- Při alimentární nákaze musí cercárie penetrující jícen překonat ochranný hlen, který je tvořen muciny. Inkubace rekombinantního katepsinu B2 motolice *T. regenti* nepotvrdily, že by tato peptidáza byla schopna proteolyticky degradovat muciny typu I a III. Invaze jícnu tedy může probíhat spíše mechanicky nebo za účasti více enzymů.

Cílem předložené práce bylo získání poznatků o alimentárních nákazách ptačích a savčích hostitelů motolicemi *T. regenti* a *T. szidati*, a upozornit na jejich veterinární, popř. medicínský, význam. Úspěšné alimentární nákazy myší a kachen ukazují, že motolice *Trichobilharzia* spp. jsou schopné invaze a průniku trávicí soustavou hostitele, a následného pokračování v migraci. Sekreční produkty acetabulárních žláz (vč. katepsinu B2 motolice *T. regenti*) při invazi jícnu zřejmě nehrají velkou úlohu a k narušení stěny jícnu dochází spíše mechanicky pohyby hlavového orgánu. V jícnu alimentárně nakažených hostitelů není imunitní systém schopný červy destruovat. Migrace ptačích schistosom je v imunizovaných kachnách oproti kachnám primoinfikovaným pomalejší a méně úspěšná (Ellis a kol., 1975), přesto může být alimentární způsob nákazy DH v přírodě významnější, než se doposud myslelo. Zejména v případě neuropatogení motolice *T. regenti* by proto bylo vhodné přehodnotit riziko infekce hospodářských či domácích zvířat (např. psů) v místech, kde tato zvířata pijí vodu.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WPW, Sminia T (1994): The role of oxygen radicals in schistosomicidal activities of hemocytes of the pond snail *Lymnea stagnalis*. Parasitology 109:479-485

Andrade ZA (2009): Schistosomiasis and liver fibrosis. Parasite Immunology 31:656-663

Arnouts S (2009): Optimising immunity in broiler production – part one. International Poultry Production 17(1): 11-13

Bang BG, Bang FB (1968): Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chicken. American Journal of Pathology 53:735-751

Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T (2013): Human schistosomiasis: clinical perspective. Journal of Advanced Research, *epub*

Bartels T, Meyer W, Neurand K (1991): Comparative investigations of surface pH of bird skin. Journal of Ornithology 132:279-284

Basch PF (1981): Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. Journal of Parasitology 67:179-185

Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J (1980): Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. Journal of Immunology 125:2626-2632

Bhide SA, Wasekar KV, Koushik SA (2001): Peyer's patches are precocious to the appendix in human development. Developmental Immunology 8(2):159-166

Blažová K, Horák P (2005): *Trichobilharzia regenti*: the developmental differences in natural and abnormal hosts. Parasitology International 54(3):167-172

Bockman DE, Cooper MD (1973): Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. American Journal of Anatomy 136:455-478

Boulanger D, Schneider D, Sidikou F, Capron A, Chippaux J-P, Sellin B (1999): The oral route as a potential way of transmission of *Schistosoma bovis* in goats. *Journal of Parasitology* 85(3):464-467

Boumsell L, Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russel MW (2008): Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. Consensus Draft – Bulletin of the World Health Organization.

Bourns TKR, Ellis JC, Rau ME (1973): Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck host. *Canadian Journal of Zoology* 51: 1021-1030

Carlstedt I, Sheenan JK (1989): Structure and macromolecular structure of cervical mucus glycoproteins. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 43:289-316

Carman PS, Ernst PB, Rosenthal KL, Clark DA, Befus AD, Bienenstock J (1986): Intraepithelial leukocytes contain a unique subpopulation of NK-like cytotoxic cells active in the defense of gut epithelium to enteric murine coronavirus. *Journal of Immunology* 136(5):1548-1553

Cerutti A a Rescigno M (2008): The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28:740-750

Cesta M (2006): Normal structure, function and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic Pathology* 34:599-608

Černý H (2005): Anatomie domácích ptáků. Brno: Metoda

DeBuysscher E, Kennedy J, Mendicino J (1984): Synthesis of mucin glycoproteins by epithelial cells isolated from swine trachea by specific proteolysis. *In Vitro* 20(5):433-446

Doenhoff M, Musallam R, Bain J, McGregor A (1978): Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunology* 35:771-778

Doenhoff MJ, Hassounah O, Murare H, Bain J, Lucas S (1986): The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection of parasite survival? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80:503-514

Dolečková K, Kašný M, Mikeš L, Cartwright J, Jedelský P, Schneider EL, Dvořák J, Mountford AP, Craik CS, Horák P (2009): The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology* 39:201-211

Dorsey CH a Stirewalt MA (1977): *Schistosoma mansoni*: Localization of calcium-detecting reagents in electron-lucent areas of specific preacetabular gland granules. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 54:165-173

Dubray G, Bezard G (1982): A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119:325–329

Dwarakanath AD, Campbell BJ, Tsai MH (1995): Faecal mucinase activity assessed in inflammatory bowel disease using ¹⁴C threonine labelled mucin substrate. *Gut* 37:58-62

Ellis JC, Bourns TKR, Rau ME (1975): Migration, development, and condition of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in homologous challenge infections. *Canadian Journal of Zoology* 53:1803-1811

Elstein M (1978): Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. *British Medical Bulletin* 34:83-88

Flajnik MJ, Miller KM, DuPasquier L (2003): Evolution of the immune systems. *Fundamental immunology* (5th ed). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins:519-570

Geldhof P, Claerebout E, Knox DP, Agnessens J, Vercruysse J (2000): Proteinases released *in vitro* by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology* 121:639-647

Giver H, Johansen MV, Christensen NO, Bøgh H, Nansen P (1999): Peroral infection of pigs with *Schistosoma japonicum* cercariae. *Veterinary Parasitology* 83:161-165

Gordon RM, Griffiths RB (1951): Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 45: 227-243

Gormley PD, Powell-Richards AO, Azuara-Blanco A, Donoso LA, Dua HS (1998): Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated-lymphoid-tissue after exposure to retinal-S-antigen. *International Ophthalmology* 22:77-80

Grabe K, Haas W (2004): Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. *Parasitology Research* 93(2):111-3

Haas W a Haerberlein S (2009): Penetration of cercariae into the human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. *Parasitology Research* 105(4):1061-1066

Haas W a van der Roemer (1998): Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. *Parasitology Research* 84(10):787-795

Haas W, Pietsch U (1991): Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitology Research* 77:642-644

Haberl B, Kalbe M, Fuchs H, Ströbel M, Schmalfuss G, Haas W (1995): *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* – miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. *International Journal for Parasitology* 25:551-560

Hasnain SZ, McGuckin MA, Grecis RK, Thornton DJ (2012): Serine protease(s) secreted by the nematode *Trichuris muris* degrade the mucus barrier. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6(10):1856 *epub*

He Y-X, Yu Q-F, Yu P, Mao C-S, Hu Y-Q (1990): Penetration of *Schistosoma japonicum* cercariae into host skin. *Chinese Medical Journal* 103(1):34-44

Hemming FJ, Pays L, Soubeyran A, Larruat C, Saxod R (1994): Development of sensory innervation in chick skin: comparison of nerve fibre and chondroitin sulphate distributions *in vivo* and *in vitro*. *Cell and Tissue Research* 277(3):519-529

Herbert DR a kol. (2004): Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20(5):623-35

Horák P a Kolářová L (2011): Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology* 56(4):779-790

Horák P, Dvořák J, Kolářová L, Trefil L (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous system. *Parasitology* 119:577-581

Horák P, Grubhoffer L, Mikeš L, Tichá M (1997): Lectins of *Trichobilharzia szidati* cercariae. *Parasite* 1:27-35

Horák P, Kolářová L (2000): Survival of bird schistosomes in mammalian lungs. *International Journal for Parasitology* 30:65-68

Horák P, Kolářová L (2001): Bird schistosomes: do they die in mammalian skin? *TRENDS in Parasitology* 17(2):66-69

Horák P, Kolářová L, Adema CM (2002): Biology of the Schistosome Genus *Trichobilharzia*. *Advance in Parasitology* 52:155-233

Horák P, Kovář L, Kolářová L, Nebesářová J (1998): Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116:139-147

Howe L, Wiggins R, Soothill PW (1999): Mucinase and sialidase activity of the vaginal flora: implications for the pathogenesis of preterm labour. *International Journal of STD and AIDS* 10:442-447

Hrádková K, Horák P (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* 76:137-141

Chai JY, Lillehoj HS (1988): Isolation and functional characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumor target cells. *Immunology* 63:111-117

Chamot E, Toscani L, Rougemont A (1998): Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemman at Geneva, Switzerland. *Epidemiology and Infection* 120(3):305-314

Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NQ, Gum JR, Kim YS (1994): Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 107:28-36

Chanová M, Horák P (2007): Terminal phase of bird schistosomiasis caused by *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) in ducks (*Anas platyrhynchos* f. *Domestica*). *Folia Parasitologica* 54:105-107

Chanová M, Vuong S, Horák P (2007): *Trichobilharzia szidati*: the lung phase of migration within avian and mammalian hosts. *Parasitology Research* 100:1243-1247

Cheever AW (1968): A quantitative post-mortem study of Schistosomiasis mansoni in man. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17:38-64

Cheever AW (1987): Comparison of pathological changes in mammalian hosts infected with *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82(4):39-45

Cheever AW, Kamel IA, EI WI AM, Mosimann JE, Danner R, Sippel JE (1978): *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in Egypt. III. Extrahepatic pathology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:55-75

Jouet D, Ferté H, Depaquit J, Rudolfová J, Latour P, Zanella D, Laktenbach ML, Léger N (2008): *Trichobilharzia* spp. In natural conditions in Annecy Lake, France. *Parasitological Research* 103:51-58

Jung C, Hugot J-P, Barreau F (2010): Peyer's Patches: The immune sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation* 2010, *epub*

Kalbe M, Haberl B, Haas W (1997): Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research* 83(8):806-812

Kassuku A, Nansen P, Christensen NO (1985): A comparison of the efficiency of the percutaneous and per-oral routes of infection in caprine *Schistosoma bovis* infections. *Journal of Helminthology* 59(1):23-28

Kiyono H, Fukuyama S (2004): NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology* 4:699-710

Kolářová L, Horák P, Čada F (2001): Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti*. *Parasitology Research* 87:644-650

Kolářová L, Horák P, Skírnisson K (2010): Methodical approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis. *Journal of Helminthology* 84:327-335

Kouřilová P, Hogg KG, Kolářová L, Mountford AP (2004b): Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *Journal of Immunology* 172:3766-3774

Kouřilová P, Syrůček M, Kolářová L (2004a): The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research* 93:8-16

Kumagai T, Maruyama H, Hato M, Ohmae H, Osada Y, Kanazawa T, Ohta N (2005): *Schistosoma japonicum*: localization of calpain in the penetration glands and secretions of cercariae. *Experimental Parasitology* 109(1):53-57

Kuper CF, De Heer E, van Loveren H, Vos JG (2002): Immune system. In *Handbook of Toxicologic Pathology*. New York: Academic Press:585-644

Lehker MW, Sweeney D (1999): Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections* 75:231-238

Ligasová A, Bulantová J, Šebesta O, Kašný M, Koberna K, Mikeš L (2011): Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* – ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. *Parasites and Vectors* 4:162

Lichtenbergová L, Horák P (2012): Pathogenicity of *Trichobilharzia* spp. for vertebrates. *Journal for Parasitology Research*, *epub*

Lichtenbergová L, Lassmann H, Jones MK, Kolářová L, Horák P (2011): *Trichobilharzia regenti*: host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Experimental Parasitology* 128:328-335

Lillehoj HS, Trout JM (1994): CD8+ T cell coccidia interactions. *Parasitology Today* 10:10-14

Lillehoj HS, Trout JM (1996): Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 9(3):349-360

MacDonald TT (2003): The mucosal immune system. *Parasite Immunology* 25:235-246

Mikeš L, Zídková L, Kašný M, Dvořák J, Horák P (2005): *In vitro* stimulation of penetration gland emptying by *Trychobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology Research* 96:230-241

Modha J, Redman CA, Tronhill JA, Kusel JR (1998): Schistosomes: unanswered questions on the basic biology of the host-parasite relationship. *Parasitology Today* 14:396-401

Ng PL, Higgins DA (1986): Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*) I. Preliminary characterization and ontogeny. *Immunology* 58:323-327

Ohshima K, Hiramatsu K (2000): Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chicken. *Histology and Histopathology* 15:713-720

Oleaga A a Ramajo V (2004): Efficiency of the oral, intramuscular and subcutaneous routes for the experimental infection of hamster and sheep with *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology* 124:43-53

Olivier L (1953): Observations on the migration of avian schistosomes in mammals previously unexposed to cercariae. *Journal of Parasitology* 39(3):237-243

Pabst R (1987): The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anatomy and Embryology* 176:135-144

Robertson AM, Wright DP (1997): Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. Canadian Journal of Gastroenterology 11:361-366

Rollinson D, Southgate VR, Vercruyse J, Moore PJ (1990): Observations on natural experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. Acta Tropica 47:101-114

Rothwell L, Gramzinski RA, Rose ME, Kaiser P (1995): Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. Parasite Immunology 17:525-533

Rudolfová J, Hampl V, Bayssade-Dufour C, Lockyer AE, Littlewood DT, Horák P (2005): Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnea stagnalis* as the intermediate host. Parasitology Research 95:79-89.

Sell KW, Dean DA (1972): Surface antigens on *Schistosoma mansoni*. I. Demonstration of host antigens on schistosomula and adult worms using the mixed antiglobulin test. Clinical and Experimental Immunology 12:315-324

Shekels LL, Hunninghake DA, Tisdale AS, Gipson IK, Kieliszewski M, Kozak CA, Ho SB (1998): Cloning and characterization of mouse intestinal MUC3 mucin: 3' sequence contains epidermal-growth-factor-like domains. Biochemical Journal 330:1301-1308

Simmons CP, Clare S, Dougan G (2001): Understanding mucosal responsiveness: lessons from enteric bacterial pathogens. Seminars in Immunology 13(3):201-209

Smithers SR, Terry RJ, Hockley DJ (1969): Host antigens in schistosomiasis. Proceedings of the Royal Society 171:483-494

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J (2006): Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infectious Diseases 6:411-25

Stewart-Tull DE, Ollar RA, Scobie TS (1986): Studies on the *Vibrio cholerae* mucinase complex. 1. Enzymic activities associated with the complex. Journal of Medical Microbiology 2:325-333

- Stirewalt MA, Kruidenier FJ (1961):** Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Experimental Parasitology* 11:191-211
- Strous V, Gilmore MS, Elkins RC, Sachdev GP (1992):** Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27:57-92
- Tagliabue A, Befus D, Clark DA, Bienenstock J (1982):** Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *Journal of Experimental Medicine* 155:1785-1796
- Taylor AI, Fabiane SM, Sutton BJ, Calvert RA (2009):** The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48:558-562
- Theodoropoulos G, Hicks SJ, Corfield AP, Miller BG, Carrington SD (2001):** The role of mucins in host – parasite interactions: Part II – helminth parasites. *Trends in Parasitology* 17(3):130-135
- Tizzard I (2002):** The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11:2-14
- Trout JM, Lillehoj HS (1995):** *Eimeria acervulina*: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poultry Science* 74:1117-1125
- Tumer JD, Narang P, Coles MC, Mountford AP (2012):** Blood flukes exploit Peyer’s patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host. *Plos Pathogens* 8(12), *epub*
- Tytgat KMAJ, Dekker J, Büller HA (1993):** Mucins in inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 5:1991-127
- Vadlejch J, Lytvynets A, Jankovská I, Langrová I (2010):** Peptidases of pinworms *Syphacia muris* and *Passalurus ambiguus*. *Experimental Parasitology* 126:156-160
- Van Klinken BJ-W, Dekker J, Büller HA, de Bolòs C, Einrhand AWC (1997):** Biosynthesis of mucins (MUC2-6) along the longitudinal axis of the human gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology* 273:296-302

Vilar MM, Pinto RM (2005): Reappraisal of experimental infections with cercariae and schistosomula of a brazilian strain of *Schistosoma mansoni* in mice. *Brazilian Journal of Biology* 65(4):729-733

Wang T, Fang Z-M, Lei J-H, Guan F, Liu W-Q, Bartlett A, Whitfield P, Li Y-L (2012): Delayed tail loss during the invasion of mouse skin by cercariae of *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 139:244-247

Weston SA, Parish CR (1990): New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of Immunological Methods* 133(1):87-97

Wiggins R, Hicks SJ, Millar MR, Corfield AP (2001): Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sexually Transmitted Infections* 77:402-408

Witkowski JM, Zmuda-Trzebiatowska E, Swiercz JM, Cichorek M, Ciepluch H, Lewandowski K, Bryl E, Hellmann A (2002): Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 100:1802-1809

Yan Z, Wang JB, Gong SS, Huang X (2003): Cell proliferation in the endolymphatic sac *in situ* after the rat Waldeyer ring equivalent immunostimulation. *Laryngoscope* 113:1609-1614

Yang J, Zhao J, Yang Y, Zhang L, Yang X, Zhu X, Ji M, Su Ch (2007): *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4+ CD25+ T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* 120(1):8-18

Zopf D, Roth S (1996): Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347:1017-1021

Seznam sekundárních citací:

Croitoru K, Bienenstock J (1994): Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue. Handbook of Mucosal Immunology. San Diego: Academic Press:141-151

Forstner JF, Forstner GG (1994): Gastrointestinal mucus. Physiology of the Gastrointestinal Tract. New York: Raven:1255-1283

Kelsall B, Strober W (1999): Gut-associated lymphoid tissue: antigen handling and T-lymphocyte responses. Mucosal Immunity. San Diego: Academic Press:293-317

King AS, McLelland J (1975): Lymphatic system. Outlines of avian anatomy. London: Bailliere Tindall:103-105

Lindberg RJ, J Mokrad, Johansen V, Christensen NO, Nansen P (1995): Tissue response of goats to single or repeated low-level doses and to a massive challenge dose of *Schistosoma bovis*. Research in Veterinary Science 58:56-60

Lundqvist ML, Middleton DL, Radford C, Warr GW, Magor KE (2006): Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. Developmental and Comparative Immunology 30:93-100