

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



**Bc. Linda Vlčková**

Interakce vajíček a miracidii *Trichobilharzia regenti* s nosní sliznicí kachen

Interactions of the eggs and miracidia of *Trichobilharzia regenti* with the duck nasal mucosa

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Praha, 2018

## **Prohlášení**

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

V Praze, 13.08.2018

Podpis:.....

Linda Vlčková

## **Poděkování**

Největší díky patří mému školiteli Petru Horákovi za vedení, cenné rady, čas a trpělivost.

Děkuji kolegům z laborky za tipy a triky ohledně některých metod a za podporu, zejména „imuno-histo týmu“ – Janě, Honzovi, Tomášovi, Líba a Martinovi, dále Kačce za krátké nahlédnutí do tajů elektronové mikroskopie a také všem ostatním za příjemnou atmosféru. Děkuji také Tyně za přečtení některých pasáží a připomínky.

Děkuji dr. Gerykovi z ÚMG AV ČR, dr. Faldynovi z VÚVeL Brno a imunitnímu z katedry zoologie PřF UK za poskytnutí vzorků protilátek, dr. Jandovi za pomoc při měření na průtokovém cytometru, prof. Dykové za pár tipů do histologických začátků a dr. Vagnerové z 1. LF UK za rady při vyhodnocování histologických snímků.

A nakonec děkuji všem, kterým vděčím za neutuchající podporu i v době, kdy už to se mnou asi nebylo k vydržení – Lukášovi, rodině a přátelům.

## ABSTRAKT

*Trichobilharzia regenti* je ptačí nazální schistosoma, která má v prvních dnech života v definitivním hostiteli afinitu k nervové soustavě. Larvální stadia migrují centrální nervovou soustavou a dostávají se až do nosní sliznice nakažených vrubozobých ptáků, kde dospívají a množí se. Této fázi infekce byla zatím věnována menší pozornost. Dospělé motolice se nacházejí v nosní sliznici zhruba od 13. do 24. dne po infekci. Během této životní fáze prolézají oblastí bohatě prokrvené pojivové tkáně a kladou vajíčka, jejichž přítomnost byla zatím zaznamenána pouze ve tkáni. Ve tkáni dochází také k vývoji a (na rozdíl lidských schistosom) líhnutí miracidia. Přítomnost parazita vyvolává zánět a tkáň je infiltrována imunitními buňkami. Pomocí základních histologických barvení byly popsány lymfocyty, granulocyty, makrofágy, plasmatické buňky a obří vícejaderné buňky. Tato práce je zaměřená na detailnější popis buněčné imunitní odpovědi a histopatologických změn tkáně, což bylo prováděno pomocí histologických barvení a za použití protilátkových a lektinových sond.

Pomocí histologických barvení byli dospělí červi pozorováni častěji v lumenu cév, který obsahoval také zvýšená množství imunitních buněk oproti zdravým jedincům. Ve tkáni došlo k infiltraci velkého množství lymfocytů, kolem vajíček se ve shlucích hojně vyskytovaly makrofágy a v oblasti snůšek byly časté nekrotické oblasti s granulocyty. Snůšky vajíček byly pozorovány nejen ve tkáni, ale také v lumenu cév pozměněných reparačními procesy, které kolem vajíček vytvořily zcela novou tkáň bohatou na kolagenní vlákna; takto pozorované cévy zůstaly alespoň částečně průchodné. Pro účely imunohistochemického značení byly testovány protilátky specifické zejména k imunitním buňkám jiných živočišných druhů, neboť na trhu je zatím nedostatek protilátek specifických na kachní buňky. Při použití některých z nich bylo pozorováno velké množství KUL01 pozitivních buněk se segmentovanými jádry a pod bazální membránou epitelu se vyskytovaly CD4 pozitivní T lymfocyty. Lektinové sondy reagovaly s infiltrovanými buňkami nespecificky.

Práce prokázala, že působením parazita dochází k destrukci žilních pletení nosní sliznice a napadená tkáň je masivně infiltrována imunitními buňkami. Byla potvrzena přítomnost několika typů imunitních buněk a pozorovány změny v jejich lokalizaci kolem parazita v průběhu infekce. Poprvé byl popsán výskyt vajíček v poškozených cévách hostitelské tkáně a přítomnost T lymfocytů a KUL01 pozitivních buněk.

Klíčová slova: *Trichobilharzia regenti*, ptačí schistosomy, krevní motolice, definitivní hostitel, kachna domácí, Anatidae, nosní sliznice, histologie, imunohistochemie, lektiny.

## ABSTRACT

*Trichobilharzia regenti* is a nasal avian schistosome which has during the initial phase of infection an affinity to the nervous system. Larvae migrate through the central nervous system to the nasal mucosa of waterfowl, where they mature and reproduce. Until now this infection phase has been described only marginally. Adults are located in the nasal mucosa approximately from 13th to 24th day post infection. During this life phase, they migrate through the vascularized connective tissue and lay eggs, the presence of which has been detected in the tissue only. Maturation and hatching of miracidia occur in the tissue (unlike human schistosomes). The parasite causes inflammation, and the tissue is infiltrated with immune cells. Lymphocytes, granulocytes, macrophages, plasma cells and giant multi-nuclear cells were described by histological methods. The thesis is focused on a more detailed description of cellular immune response and histopathological changes of the tissue by means of histological stains, and antibody/lectin probes.

The flukes were observed more frequently in the blood vessel lumen, together with a higher number of immune cells compared to the healthy duck. Infiltration by a high number of lymphocytes occurred in the tissue, the macrophages were frequently observed in clusters around the eggs, along with many necrotic areas with granulocytes. Clustered eggs were found not only in the tissue, but also in the lumen of blood vessels altered by reparation giving rise to new tissue rich in collagen fibers around the eggs; those blood vessels remained at least partly unobstructed. For immunohistochemical detection, the antibodies specific to immune cells of other hosts were tested, because commercial to the duck cells are unavailable. We observed many KUL01 positive cells with lobular nuclei, and CD4 positive T lymphocytes occurred under the basal membrane of the nasal epithelium. Lectin probes reacted non-specifically with the infiltrated cells.

The study confirmed that the parasite presence causes a destruction of blood vessels in the nasal mucosa, and the affected tissue is massively infiltrated by immune cells. The presence of several types of immune cells was confirmed, and some changes in their location around the parasite were observed during the infection. For the first time, the presence of eggs in the damaged blood vessels in the host tissue was described, as well as the presence of T lymphocytes and KUL01 positive cells.

Key words: *Trichobilharzia regenti*, avian schistosomes, blood flukes, definitive host, domestic duck, Anatidae, nasal mucosa, histology, immunohistochemistry, lectins.

# OBSAH

ÚVOD.....	1
Cíle práce .....	3
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
1.1 Lidské schistosomy .....	4
1.1.1 Kožní infekce .....	5
1.1.2 Akutní fáze.....	6
1.1.3 Chronická fáze .....	8
1.1.4 Schistosomy ve sliznicích .....	10
1.2 Ptačí motolice <i>Trichobilharzia regenti</i> .....	13
1.2.1 Imunitní odpověď proti <i>T. regenti</i> v definitivním hostiteli .....	14
1.2.2 Imunitní odpověď proti <i>T. regenti</i> v náhodném savčím hostiteli .....	16
1.3 Nosní sliznice kachen a obrana proti patogenům.....	18
1.3.1 Stručný přehled specifík kachního imunitního systému.....	18
1.3.2 Obrana kachen proti infekci patogeny .....	20
2 METODIKA .....	22
2.1 Získ materiálu.....	22
2.1.1 Nákazy a pitvy kachen .....	22
2.2 Histologické zpracování a barvení vzorků .....	23
2.2.1 Fixace tkání .....	23
2.2.2 Příprava parafinových bločků .....	24
2.2.3 Použité barvicí metody.....	25
2.2.4 Zhodnocení přítomnosti <i>T. regenti</i> , imunitních buněk a patologických změn	34
2.3 Imunohistochemické zpracování tkáně na kryořezech.....	35
2.3.1 Zpracování tkáně a příprava vzorků.....	35
2.3.2 Značení buněk a tkání protilátkami.....	36
2.3.3 Značení vybraných markerů zánětu .....	38
2.4 Měření reaktivity protilátek pomocí průtokové cytometrie .....	42
2.4.1 Postup jednotlivých cytometrických pokusů.....	42
2.4.2 Analýza dat – gating strategy .....	46
2.5 Histochemické značení kryořezů lektiny .....	47
2.5.1 Zpracování tkáně a příprava vzorků.....	47
2.5.2 Značení lektiny.....	47
3 VÝSLEDKY PRÁCE .....	49
3.1 Makroskopické zhodnocení tkáně.....	49
3.2 Histologické zhodnocení tkáně .....	49
3.2.1 Použitá histologická barvení .....	50
3.2.2 Průběh zánětu v přítomnosti parazita.....	51
3.3 Imunohistochemické značení tkáně protilátkami .....	64

3.3.1	Použité protilátkové sondy .....	64
3.4	Měření signálu protilátek pomocí průtokové cytometrie .....	72
3.5	Histochemické značení tkáně lektiny .....	74
4	DISKUZE .....	75
4.1	Fixace tkáně .....	75
4.2	Histologická barvení .....	75
4.2.1	Hodnocení vzorků pomocí histologických barvení .....	75
4.2.2	Histologická barvení, která nebyla dále využita .....	82
4.3	Výběr protilátek pro imunohistochemická značení .....	83
4.3.1	Protilátky s opakovaně pozitivním signálem .....	83
4.3.2	Protilátky s nekonzistentními výsledky značení .....	84
4.3.3	Protilátky s negativními výsledky značení .....	85
4.4	Testování reaktivity protilátek pomocí průtokové cytometrie .....	86
4.5	Histochemická značení lektiny .....	87
	ZÁVĚR .....	89
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	91
	LITERATURA .....	93
	PŘÍLOHY .....	104

# ÚVOD

Schistosomy neboli česky krevničky řadíme mezi ploché červy (Platyhelminthes), konkrétně do třídy Trematoda. Jedná se o motolice, které v tropických oblastech světa negativně ovlivňují lidský život. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO; angl. World Health Organization) je na celém světě nakaženo schistosomózou (působenou zejména motolicemi *S. mansoni* a *S. haematobium*) přes 200 milionů lidí, z toho odhadem 20 až 56 milionů žen trpí genitální formou schistosomózy, která mimo jiné zvyšuje riziko nakažení virem HIV (WHO online).

V mírném pásu i na našem území pak můžeme nalézt schistosomy ptačí. Ptačí schistosomy mají v zásadě velmi podobný životní cyklus schistosomám lidským. Ten zahrnuje aktivní penetraci larválního stadia do hostitele a migraci krevním řečištěm, ve kterém patrně ve většině případů dochází také ke kopulaci dospělců a kladení vajec. V místě penetrace cercárie do kůže dochází k alergické reakci a tvorbě vyrážky známé pod pojmem cercáriová dermatitida (Cort, 1928) a právě rod *Trichobilharzia*, který je i experimentálním modelem v této diplomové práci, je s cercáriovou dermatitidou spojován nejčastěji (Horák *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 1997; Kolářová *et al.*, 2010). Původce cercáriové dermatitidy můžeme najít nejen v České republice (Aldhoun *et al.*, 2012), potažmo v Evropě (Kolářová *et al.*, 1999; Lawton *et al.*, 2014), ale i po celém světě (Ebbs *et al.*, 2016; Valdovinos & Balboa, 2008).

U *Trichobilharzia regenti*, jejíž životní strategii a vliv na hostitele v naší laboratoři již léta podrobně zkoumáme, byl popsán unikátní způsob migrace tělem hostitele – larvy putují nervovou soustavou až do oblasti čelních laloků (Chanová & Horák, 2007; Horák *et al.*, 1999; Lichtenbergová *et al.*, 2011), odkud již pravděpodobně krevní cestou (Chanová & Horák, 2007) doputují na místo definitivní lokalizace – do nosní sliznice, kde dospívají, kopulují a kladou vajíčka (Horák *et al.*, 1999). Ve sliznici byli červi i nakladená vajíčka pozorováni volně v tkáni, dospělci pak také v krevním řečišti (Chanová & Horák, 2007; Horák *et al.*, 1999; Horák *et al.*, 1998; Kolářová *et al.*, 2001). Dosud však není objasněno, proč například dochází k líhnutí miracidí již v tkáni či proč dospělí parazité zůstávají v nosní sliznici jen po dobu cca 12 dní, co se s nimi dále děje a zda jsou negativně ovlivněni imunitní odpovědí hostitele, nebo prostě nejsou „dlouhověcí“ jako jejich příbuzní – lidské schistosomy (Warren *et al.*, 1974).

Pro imunokompetentního člověka, resp. savce, nepředstavuje kontakt s cercáriemi ptačích schistosom vážné riziko, neboť je parazit zničen většinou již v kůži nedlouho po penetraci a s opakovanými infekcemi se šance na zachycení parazita v kůži zvyšuje (Kouřilová *et al.*, 2004b). Problém by mohl nastat u imunosuprimovaných jedinců či u menších savců, u kterých nemusí dojít ke zničení parazita v kůži, neboť nedochází k odpovídající imunitní reakci (Kouřilová *et al.*, 2004b). Bylo prokázáno, že parazit je i v savčím hostiteli schopen doputovat do míchy (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002), ojediněle byl zaznamenán také

v plicích u kachen (Horák *et al.*, 1999) a imunosuprimovaných myší (Lichtenbergová *et al.*, 2011). I u imunokompetentních zvířat může být migrace míchou doprovázena slabšími či vážnějšími neuromotorickými potížemi – ztrátou rovnováhy a koordinace končetin, a to jak u náhodného, tak u definitivního hostitele (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002; Lichtenbergová *et al.*, 2011).

Hostitelský organismus se brání patogenům aktivací imunitního systému. Jednotlivé složky imunity mají za cíl tyto patogeny lokalizovat, zlikvidovat a omezit styk s vlastními buňkami a jeho další působení v organismu. Tyto procesy však mohou vést až k trvalému poškození a modifikaci následkem reparací napadené tkáně hostitele.

Je známo, že helminti jsou schopni imunomodulace hostitelského organismu, což souvisí s dlouhověkostí parazita a jeho životními strategiemi, včetně přenosu na další hostitele. Obvykle je charakteristická stimulace Th2 polarizace imunitní odpovědi doprovázená aktivací regulačních T lymfocytů (Treg) a alternativně aktivovaných makrofágů (aMF). Během takového působení helmintů dochází k postupnému utlumování Th1/Th17 imunitní odpovědi, což zvyšuje šance parazita na přežití. Velkou roli hrají exkrečně-sekreční (ES) produkty, které interagují s hostitelskými imunitními buňkami a molekulami. Vliv mají také povrchové molekuly zejména tkáňových parazitů, a to při změně stadií či při migraci parazita tkání. Roli v modulaci imunitní odpovědi mohou hrát i produkty vyvíjejícího se vajíčka, např. proteázy (Hewitson *et al.*, 2009).

Obranou napadeného organismu proti *T. regenti* je tedy aktivace imunitní odpovědi, která nastupuje již při průniku kůží a pokračuje i v nervové soustavě. Imunitní reakce v místě definitivní lokalizace parazita jsou dosud málo popsány (Chanová & Horák, 2007; Kolářová *et al.*, 2001).

Kachna coby modelový organismus našeho výzkumu a definitivní hostitel studovaného parazita *T. regenti* není zdaleka tak komplexně prostudovaným organismem jako například běžně v laboratořích využívané kuře. Vývojová větev Anatidae se v evoluci odštěpila o 40 milionů let dříve než Galliformes, a proto kachny mají mnohem blíže k obojživelným plazům než ke kuřatům, což je podloženo i výskytem stejných tříd imunoglobulinů (Bertram *et al.*, 1996; Magor *et al.*, 1994). Lze tedy očekávat, že imunitní systém kachen se bude od lépe prostudovaného kuřecího lišit. Přestože popularita kachen na vědeckém poli vrostla v souvislosti s podezřením, že se může jednat o hlavního rezervoárového přenašeče viru ptačí chřipky, popř. dalších patogenů, které mají vliv na chov drůbeže pro spotřebu (Kim *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 1993), nástrojů pro studium jejich imunitních reakcí je na trhu stále poskrovnu.

Vzájemné interakce mezi hostitelem a parazitem je vhodné zkoumat v prostředí co nejlépe odpovídajícímu reálným podmínkám. Jako modelový organismus byla pro účely této práce zvolena kachna coby přirozený definitivní hostitel *T. regenti* a metody zachycující parazita v jeho přirozeném prostředí *in situ* – histologické a imunohistochemické techniky na řezových



preparátech napadené tkáně. Zvolené postupy, výsledky, zdary i nezdary bádání jsou popsány na následujících stranách této diplomové práce.

## **Cíle práce**

V předložené diplomové práci jsme si stanovili následující cíle:

1. Shrnout dostupnou literaturu o imunitní odpovědi hostitele při infekci schistosomami.
2. Popsat imunitní odpověď a histopatologické změny tkáně nosní sliznice kachny v průběhu infekce parazitem za pomoci klasických histologických barvení.
3. Prokázat konkrétní buněčné typy podílející se na imunitní odpovědi proti parazitovi pomocí protilátkových sond na řezových preparátech.
4. Pozorovat změny v cílové tkáni pomocí fluorescenčně značených lektinů.
5. Na základě výše uvedeného souhrnně charakterizovat patogenezi a změny v imunitní odpovědi v infikované tkáni od 14. do 26. dne po infekci.

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

*Trichobilharzia regenti* je ptačí krevní motolice. Cesta do místa její definitivní lokalizace v hostiteli začíná penetrací larválního stadia – cercárie – zpravidla do končetiny, při požití je schopná penetrace i do jícnu vrubozobého ptáka (Pech 2013). Cercárie při penetraci ztrácí ocásek a v kůži se transformuje v další larvální stadium zvané schistosomula, které je adaptováno na migraci tkání, příp. krevním řečištěm, a následně periferními nervy a centrální nervovou soustavou až do nosní sliznice. Zde parazit dospívá, kopuluje a klade vajíčka, která několik dní zrají – utváří se v nich miracidium, které poté při ponoření zobáku do vody vaječné obaly opouští a vydává se na svou další cestu ve vodním sloupci – za vodním plžem. V okamžiku opuštění skořápky je možné volná miracidia zachytit ještě v tkáni.

Parazit je v těle kachny cizorodým materiálem a v průběhu celé infekce vyvolává imunitní odpověď hostitele. My jsme se zaměřili na terminální fázi infekce, tedy období, kdy se již dospělí červi nacházejí v nosní sliznici a produkují vajíčka. Podobně jako u lidských schistosom zůstane i u ptáků část vajíček uvězněná v tkáni. Uvíznutá vajíčka a vaječná rezidua působí jako patogenní agens, které aktivuje imunitní mechanismy ptáka.

## 1.1 Lidské schistosomy

Schistosomy, mezi které patří i „naše“ *T. regenti*, jsou dvouhostitelské motolice (třída Trematoda, kmen Platyhelminthes), jejichž mezihostitelem je plž a definitivním hostitelem teplokrevný obratlovec. Nejznámějšími a velmi dobře prozkoumanými lidskými schistosomami jsou *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni* a *S. japonicum*. Dospělci *S. haematobium* kladou vajíčka v cévách okolo močového měchýře. Vajíčka při penetraci cévní stěny způsobují krvácivé ranky. Při dlouhodobém působení parazita může dojít až ke karcinomu (Gelfant *et al.*, 1967; Fergusson, 1911) a vlivem lokalizace v urogenitálním traktu pak až k neplodnosti jak u žen (Elmahgoub, 1982), tak u mužů (Kini *et al.*, 2009). Dospělci *S. mansoni* a *S. japonicum* se vyskytují v cévách mezenteria, vajíčka způsobují obstrukce cév portálního žilního systému a jater, méně často způsobují komplikace také v plicích a dalších orgánech, přičemž nejzávažnější je neuroschistosomóza s přítomností granulomů v mozku a prodloužené míše (Ferrari *et al.*, 2008). Výskyt schistosom je vázán na sladkou vodu tropů, kde jsou vhodné podmínky pro přežití mezihostitele, a souvisí s horšími hygienickými návyky bez bezpečných zdrojů vody či s prací ve vodě (Afrika, Jižní Amerika, Asie) (WHO online).

Po proniknutí cercárií do kůže může dojít k výsevu svědivé makulopapulózní vyrážky, někdy nazývané také „swimmers itch“ nebo cercáriová dermatitida, kterou působí i cercárie ptačích schistosom (Cort, 1928; Fölster-Holst *et al.*, 2001; Horák & Kolářová, 2011). Migrující cercárie lidských schistosom mohou způsobit systémovou hypersenzitivní reakci známou jako horečka Katayama vykazující vysokou eosinofilii (de Jesus *et al.*, 2002), přítomnost parazitů

v plicích může vést ke tvorbě zánětlivých ložisek a pneumonii, infekci provází dominující Th1 imunitní odpověď (de Jesus *et al.*, 2002; Hogg *et al.*, 2003). Poté, co se červi dostanou do cév mezenteria a portálního systému, tj. 5. – 6. týden po infekci (p.i.), dochází k dominanci Th2 imunitní odpovědi; k polarizaci Th2 odpovědi možná dochází ještě před kladením vajíček, jak bylo popsáno u myši nakažených motolicí *S. mansoni* (Fraga *et al.*, 2010). Po 12. týdnu p.i. se stává infekce chronickou, může přetrvávat mnoho let a uvíznutá vajíčka působí další potíže – nejčastější je zvětšení jater a sleziny a jejich nedostatečnost, méně časté potom zbytnění tlustého střeva (megakolon) či jícnu, varixy, ascites v břišní dutině, střevní polypy, pneumonie, glomerulonefritida či důsledky ektopické lokalizace parazita/vajíček v centrální nervové soustavě (CNS) (Gryseels, 2012; Ross *et al.*, 2012). Závažná je pak kombinace schistosomózy s HIV. Vliv na přenos viru může mít pravděpodobná vyšší vnímavost CD4+ T lymfocytů způsobená přítomností chemokinů (CXCR4 a CCR5) na povrchu těchto lymfocytů a monocytů vlivem Th2 cytokinů interleukinu 4 (IL-4) a IL-10 (Secor *et al.*, 2003). Pro endemické oblasti je rizikovým faktorem přenosu HIV také kombinace s urogenitální formou schistosomózy u žen i u mužů (Feldmeier *et al.*, 1994; Leutscher *et al.*, 2005).

Vzhledem k zaměření diplomové práce se budeme zajímat přednostně o vzájemné interakce parazita a hostitele, zejména pak o imunitní odpověď hostitele vůči působení parazita.

Svou roli v úniku imunitnímu systému a následnému dlouhému přežívání v hostiteli sehrává hned několik faktorů: velikost parazita, která brání klasické fagocytóze, a speciální povrch těla u jednotlivých stadií, který může parazit odhazovat, může jej využívat k molekulárním mimikry, či záměrně indukovat imunitní odpověď pomocí vystavování imunomodulačních molekul.

### 1.1.1 Kožní infekce

Při průchodu cercárie kůží hostitele a následující transformaci na další larvální stadium (schistosomula) dochází k odhození ocásku a svlékání povrchového glykokalyxu. Průchod tkání zajišťuje cercárie jak aktivním pohybem, tak uvolňováním ES produktů z preacetabulárních a postacetabulárních žláz. Cercárie *S. mansoni* uvolňuje při průchodu kůží cercáriovou elastázu (serinovou proteázu), což je enzym degradující elastin (Salter *et al.*, 2000), a také protizánětlivý protein Sm16 (Sanin & Mountford, 2015), metaloproteázu, homolog dipeptidyl peptidázy IV, inhibitor serinové proteázy (serpin) a množství proteinů, z nichž je mnoho glykosylovaných (Curwen *et al.*, 2006). Proti cizorodému tělesu i produkovaným látkám se hostitelský organismus poměrně rychle brání. Během 3 hodin p.i. dochází k lokální vazodilataci a otoku, v rámci několika hodin p.i. se v místě infekce objevují infiltráty obsahující neutrofilů, u kterých bylo *in vitro* prokázáno, že se účastní destrukce schistosomuly společně s protilátkami, komplementem, mastocyty, kyslíkovými metabolity a leukotrieny (Moqbel *et al.*, 1990).

Průchod parazita kůží je důležitým stimulem pro rozvoj imunitní odpovědi proti parazitovi. Do 24 hodin od penetrace do kůže se objevují cytokiny a chemokiny: MIP-1 $\alpha$  (CCL3) a MIP-1 $\beta$

(CCL4), které atrahují monocyty, lymfocyty a dendritické buňky (DC) a podílí se na vzniku Th1 odpovědi a produkci cytokinů akutní fáze jako IL-1 $\beta$  a IL-6 (Hogg *et al.*, 2003). Ty stimulují antigen prezentující buňky (APC; keratinocyty, Langerhansovy buňky, makrofágy a DC) k expresi MHC II glykoproteinů, na kterých pak APC vystavují cizorodé fragmenty schistosom v lymfatických uzlinách a indukují dozrání naivních T lymfocytů v aktivní CD4+ formy. Podílí se rovněž na produkci IL-12 APC i dalšími buňkami a IL-18 keratinocyty (Hogg *et al.*, 2003). Kůže je pravděpodobně velmi důležitým zdrojem zejména cytokinu IL-12, který indukuje tvorbu Th1 lymfocytů; při pokusech s nijak neupravenými larvami se však hladina cytokinů snižovala poměrně rychle (Hogg *et al.*, 2003). V kůži můžeme najít také další prozánětlivé cytokiny, hlavně interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) a také IL-1ra a tumor-necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (He *et al.*, 2002).

Schistosomuly již při penetraci kůže účinně bojují proti odpovědi hostitele produkcí prostaglandinu D2 (PGD2), který indukuje hostitelské keratinocyty k další produkci PGD2 a IL-10. IL-10 snižuje lokálně produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, a tím i příliv lymfocytů (Angeli *et al.*, 2001). PGD2 má rovněž protizánětlivý efekt, potlačuje u DC tvorbu prozánětlivého cytokinu IL-12, který indukuje tvorbu Th1 lymfocytů (Faveeuw *et al.*, 2003). Kromě IL-10 indukují schistosomuly také produkci cytokinu IL-1Ra, které svou vazbou blokuje receptor pro IL-1 a prostřednictvím toho usnadňují parazitovi únik před imunitní odpovědí hostitele (He *et al.*, 2002). U cercárií a schistosomul *S. mansoni* byl v ES produktech objeven faktor (SMAF, 23 kDa), který indukuje apoptózu CD4+ buněk (Chen *et al.*, 2002). V kožní fázi byly mezi nákazami *S. mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium* pozorovány rozdíly v přítomnosti cytokinů (He *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Akutní fáze

Za akutní fázi označujeme dobu trvající cca 6 týdnů p.i., kdy v organismu dominuje Th1 imunitní odpověď proti migrujícím schistosomulám a nedospělým červům. Pro tuto fázi je typická vysoká eosinofilie, u některých pacientů je detekovaná leukocytóza v periferní krvi. Byly zjištěny také vysoké hladiny prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 a IL-6 (de Jesus *et al.*, 2002). V akutní fázi také dominují klasicky aktivované makrofágy, které patrně ovlivňuje přítomnost antigenů dospělých červů (Zhu *et al.*, 2014) a pro které je typická exprese prozánětlivých cytokinů, chemokinů a oxidu dusného (NO).

V plicích produkuje schistosomula prostaglandin E2, který indukuje buňky endotelu (konkrétně z kultur lidských a myších endotelových buněk) k produkci IL-6 a snižuje riziko zánětu v plicích, zatímco pokud myš neprodukuje IL-6, dochází ke zvýšení produkce eotaxinu (chemoatraktant atrahující eosinofily) a IL-5 a k infiltraci eosinofilů do plic, což ohrožuje parazita (Angeli *et al.*, 2001). Parazit rovněž produkuje molekuly, které snižují expresi E-selektinu a VCAM-1 (adhezivní molekula exprimovaná na povrchu aktivovaného endotelu,

na kterou se váží integriny buněk), díky čemuž nedojde k přichycení leukocytů na povrch kapilár a jejich průchodu do místa infekce (Trottein *et al.*, 1999).

Během 5. – 6. týdne p.i. dochází dle *in vivo* studií u myši k posunu od mírné Th1 k silné Th2 imunitní odpovědi. Tento přesmyk je zřejmě velmi důležitý pro hostitele i parazita. Při pokusech s myši, u kterých dominovala Th1 imunitní odpověď, docházelo ke klasické aktivaci makrofágů (kMF), které produkují indukibilní NO syntázu (iNOS). Docházelo ke tvorbě menších granulomů a vyšší mortalitě nakažených myši. Vliv Th2 odpovědi je tudíž pro přežití hostitele v následující chronické fázi klíčový. Nicméně pokud se NO v jaterním parenchymu při infekci nevyskytoval vůbec, docházelo k vážnému poškození jater. Je možné, že NO je součástí přirozené obrany a hraje ochrannou roli v prevenci jaterního poškození indukovaného TNF $\alpha$  a kyslíkovými radikály (Brunet *et al.*, 1999). U myši byl během infekce v některých orgánech pozorován nárůst karbonylovaných proteinů, které jsou známkou oxidativního poškození tkáně (de Oliveira *et al.*, 2013).

Vraťme se ale k přesmyku na Th2 odpověď. Mělo se za to, že k němu dochází až vlivem vaječných antigenů (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991); podle novějších výzkumů se však zdá, že Th2 odpověď navozuje již samotná přítomnost dospělců indukujících CD4+ T lymfocyty a bazofily k produkci IL-4, vajíčka jsou tedy již kladena do prostředí s převažující Th2 imunitní odpovědí (Fraga *et al.*, 2010). Th2 odpověď přetrvává (u myši i lidí) a je pro ni charakteristická mimojiné přítomnost cytokinů IL-4 a IL-13. Ty jsou významně zapojeny do vzniku jaterní fibrózy, neboť stimulují fibroblasty k tvorbě kolagenu (de Jesus *et al.*, 2004; Fallon *et al.*, 2000). Množství IFN $\gamma$ , který má antifibrogenní efekt a biosyntézu kolagenu inhibuje (de Jesus *et al.*, 2004), je regulováno přítomností cytokinu IL-10, který potlačuje expresi IFN $\gamma$  (King *et al.*, 1996; Sher *et al.*, 1991). Pokud je schistosomóza zaznamenána u člověka, jde ve většině případů již o Th2 imunitní odpověď trvající týdny až roky, jejíž intenzita se mezi jednotlivci liší (de Jesus *et al.*, 2004).

Pro Th2 odpověď je typická eosinofilie a mastocytóza a vysoké hladiny cytokinů, zejména IL-4, IL-13 a imunoglobulinu E (IgE) (Grzych *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 2014), jejichž zásadním zdrojem jsou T lymfocyty. Tyto cytokiny by mohly mít vliv i na přítomnost bazofilů (Schwartz *et al.*, 2014). V krvi je zastoupen také cytokin IL-5, který má ale vliv pouze na eosinofilii v krevním oběhu, nikoli na tvorbu samotného granulomu (Sher *et al.*, 1990).

K aktivaci bazofilů dochází vlivem vazby neznámějších vaječných antigenů schistosom IPSE/alfa-1 (IL-4 inducing principle form *S. mansoni*; imunogenní komponenta povrchu schistosom, která indukuje tvorbu granulomu) přes IgE na receptor pro IgE na povrchu bazofilů (Meyer *et al.*, 2015; Schramm *et al.*, 2007). Tato vazba bazofily aktivuje a stimuluje je k produkci protizánětlivých cytokinů IL-4 a IL-13 (Schramm *et al.*, 2007). Bazofily tak podporují či řídí další diferenciaci CD4+ buněk a stimulují syntézu IgE B lymfocyty, čímž

amplifikují Th2 odpověď. Bazofily rovněž zvyšují efektorové mechanismy Th2 odpovědi – podporují eosinofilii a podílí se na diferenciaci aMF.

Další vaječný antigen, tedy glykosylovaný protein omega-1, hraje roli při navozování Th2 imunitní odpovědi prostřednictvím DC a možná i dalších buněk (Everts *et al.*, 2009).

Během infekce se rovněž uplatňují imunoregulační mechanismy. Lidské dendritické buňky na svých TLR-2 (Toll-like receptor 2) vystavují fragmenty lysofosfatidylserinu, jež najdeme u dospělců a vajíček *S. mansoni*. Dochází k indukci regulačních T lymfocytů (Treg) (Layland *et al.*, 2007; van der Kleij *et al.*, 2002). Treg buňky (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) lze nalézt např. ve slezině, lymfatických uzlinách a granulomech v játrech (Baumgart *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2005). Treg produkují IL-10, který se podílí na utlumení efektorové odpovědi proti helmintům, potlačují akutní Th2 odpověď vyvolávanou vajíčky (Baumgart *et al.*, 2006), navozují chronickou fázi infekce (Herbert *et al.*, 2008) a přispívají ke kontrole imunopatologie při schistosomóze (Layland *et al.*, 2007).

Udržení vyvážené Th1 a Th2 odpovědi vede ke tvorbě protektivních granulomů kolem cizorodého materiálu – vajíček – a zároveň brání vzniku rozsáhlé patologie, kterou by dlouhodobé zánětlivé procesy Th1 polarizace působily.

### 1.1.3 Chronická fáze

Vlivem přetrvávající imunitní odpovědi na přítomnost stále nových vajíček v tkáních hostitele považujeme infekci od 12. týdne po nákaze za chronickou, dominuje jí stále Th2 odpověď a přetrvává dlouhé roky. Regulace imunitní odpovědi se účastní zejména Treg. Bylo popsáno, že u lidí nakažených schistosomózou jsou počty těchto buněk oproti zdravé populaci vyšší, ačkoliv lze pozorovat určité rozdíly u mladších a starších lidí (Nausch *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2005). Hlavním produkovaným cytokinem Treg je IL-10, který potlačuje aktivaci dendritických buněk, ty pak neprodukují IL-12 a dochází k inhibici tvorby Th1 buněk (McKee & Pearce, 2004).

Významnou měrou ovlivňují hostitelskou imunitní odpověď ES produkty vajíčka (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991). Indukují CD4<sup>+</sup> buňky a bazofily a prostřednictvím produkovaných cytokinů IL-4 a IL-13 vyvolávají odpověď aktivací makrofágů alternativní cestou; IL-10 nehraje v této aktivaci roli (Herbert *et al.*, 2004). Aktivaci aMF a udržení Th2 odpovědi podporuje pravděpodobně také dospělci regurgitovaný hemozoin vzniklý při trávení hemu (samice potřebují železité ionty pro vývoj vajíček) – přítomnost hemozoinu reprezentuje podle Truscott *et al.* (2013) nejen detoxifikační dráhu při samotném trávení hemu, ale i další způsob modulace hostitelské odpovědi parazitem.

Alternativně aktivované makrofágy, jejichž přítomnost je typická pro chronickou fázi schistosomózy a přítomnost vaječných antigenů (Zhu *et al.*, 2014), se podílí na reparačních mechanismech a opravách poškozené tkáně. Produkují množství protizánětlivých faktorů

zahrnujících arginázu-1 (Pesce *et al.*, 2009), PD-L2 (programmed cell death ligand 2) (Huber *et al.*, 2010) či Relm- $\alpha$ /Fizz1 (Resistin-like molecule alpha 1/found in inflammatory zone protein) (Nair *et al.*, 2009), které inhibují aktivitu či proliferaci T lymfocytů. Argináza-1 má vliv na různé děje, ale její hlavní úlohou je zřejmě potlačovat a regulovat granulomatózní zánět a fibrózu indukovanou Th2 odpovědí v játrech a střevech (Herbert *et al.*, 2004; Pesce *et al.*, 2009). Cytokiny IL-4 a IL-13 jsou klíčové pro rozvoj Th2 imunitní odpovědi, obecně lze říci, že IL-13 se podílí větší měrou na projektivní tvorbě kolagenu a rozvoji jaterní fibrózy, tedy na rozvoji chronické schistosomózy, IL-4 zase spíše zabraňuje vážnému poškození hostitelské tkáně během akutní schistosomózy (Fallon *et al.*, 2000).

Imunitní odpověď hostitelského organismu není schopná parazita zcela zlikvidovat, proto dochází alespoň k zabránění styku toxických molekul produkovaných vajíčky, např. výše zmíněného IPSE/alpha-1 (Abdulla *et al.*, 2011), s jaterním parenchymem či tkání stěny střeva. Granulomy jsou tvořeny CD4+ buňkami a makrofágy, ale také eosinofily, mastocyty a bazofily, obaleny jsou pak kolagenními vlákny (Burke *et al.*, 2009). Zajímavé je, že nepřítomnost eosinofilů v pokusném zvířeti neovlivní velikost granulomů a naopak, a to přestože se eosinofily běžně nachází v granulomech; je možné, že eosinofily a bazofily mají v granulomu zástupnou funkci (Schwartz *et al.*, 2014). Pozitivním jevem tohoto procesu je ochrana organismu hostitele před toxickými produkty vajíček. Zejména při silnější a dlouhodobé nákaze však může docházet k obstrukci cév portálního žilního systému, zvýšení tlaku krve a průměru cév, tvorbě ascitu v břišní dutině a tvorbě cévních novotvarů (Gryseels, 2012; Shariati *et al.*, 2011). Fibrotická játra pak nemohou plně zastávat svoji funkci protektivního detoxikačního orgánu.

Schistosomy se dokáží aktivně bránit, resp. schovávat imunitní odpovědi hostitele. Syntetizují proteiny ovlivňující činnost komplementu, např. CRIT (complement C2 receptor inhibitory trispanning) vyvazující C2 z lidského séra (Inal & Sim, 2000), či SCIP-1 (schistosome complement inhibitory protein), což je povrchová forma paramyosinu vyvazující C9 (Deng *et al.*, 2003). Jako mimikry využívají motolice také dalších molekul, které váží na svůj tegument, např. MHC I a II glykoproteiny (Sher *et al.*, 1978), DAF (membránový protein, angl. decay-accelerating factor) běžně chráníci hostitelské buňky před poškozením komplementem (Fatima *et al.*, 1991) či antigeny erytrocytů A, B, H (Goldring *et al.*, 1976). Schistosomy jsou samy schopny syntetizovat významný Lewis X antigen (Mickum *et al.*, 2016; Srivatsan *et al.*, 1992). Lewis X antigen (častěji sialovaný) se nachází na povrchových glykoproteinech řady lidských i ptačích buněk včetně lymfocytů (Masteller *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1993). U *S. mansoni* byl Lewis X antigen nalezen na povrchových membránách, v tkáních, střevě i v proteinech sekretovaných střevem a ve vajíčkách (Robijn *et al.*, 2005; Vandam *et al.*, 1994). Bylo zjištěno, že i IPSE/alfa-1 N-glykan nese Lewis X motiv (Wuhrer *et al.*, 2006), u vajíček je dokonce spolu s fukosylovaným i nefukosylovaným LDN (glykan

LacdiNac) zastoupen v mnohem větším množství v porovnání s ostatními stadii (Nyame *et al.*, 2003; Robijn *et al.*, 2007; Robijn *et al.*, 2005). Parazit jej zjevně dokáže používat k tlumení hostitelské odpovědi (Velupillai *et al.*, 2000), Lewis X antigen indukuje vazbou na DC Th2 imunitní odpověď (Okano *et al.*, 2001), ovlivňuje činnost makrofágů (Trottein *et al.*, 1997), zprostředkovává vazbu na endotelové buňky, pomáhá při migraci tělem hostitele, má patrně ale mnoho dalších funkcí.

#### 1.1.4 Schistosomy ve sliznicích

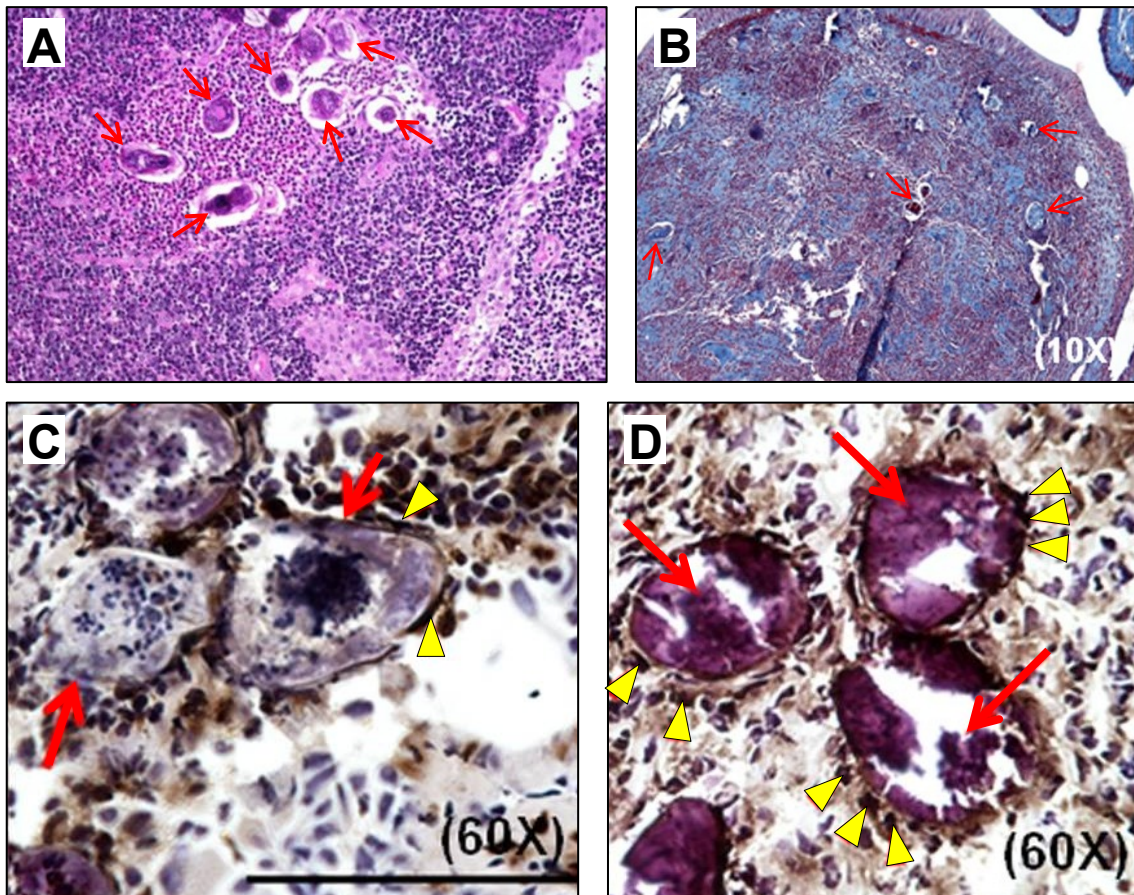
Oblasti mukózy a submukózy střeva (*S. mansoni*, *S. japonicum*), resp. močového měchýře (*S. haematobium*), kde se vyskytují vajíčka lidských schistosom, jsou nejpodobnější definitivní lokalizaci námi zkoumaného parazita *Trichobilharzia regenti* – nosní sliznici kachny, ve které tyto ptačí schistosomy migrují a kladou vajíčka.

##### 1.1.4.1 Močová schistosomóza

U pacientů s močovou schistosomózou (původce *S. haematobium*) dochází k tvorbě polypů v močovém měchýři, které ale nemusí působit bolesti ani hematurii, jako např. v případě ženy, u níž byl popsán nález při rutinní gynekologické prohlídce. Další testy u ženy odhalily zánětlivý polyp a přítomnost vajíček schistosomy, které byly obklopené eosinofilním infiltrátem a mitotickou tkání (Obr. 1 A). V takovýchto případech je důležitá cestovatelská anamnéza (Dessyn *et al.*, 2016). Tato krevnička je spojována s tropickými oblastmi, nicméně v posledních letech byly zaznamenány případy nálezů na Korsice. U postižených osob bylo zjištěno, že se koupaly v řece Cavu, kde byl nalezen i mezihostitelský plž *Bulinus truncatus* (Boissier *et al.*, 2016) a parazit se zde patrně vyskytuje trvale (Berry *et al.*, 2016). K typickým projevům (hematurie, bolesti a vajíčka v moči) opět nedocházelo u všech pacientů, často byla nákaza popsána u dítěte a poté prokázána asymptomatická forma i u starších členů rodiny (Berry *et al.*, 2014; Brunet *et al.*, 2015; Holtfreter *et al.*, 2014).

O mechanismech zánětu při močové schistosomóze je toho zatím známo poměrně málo oproti „populárnější“ *S. mansoni*. Chyběl totiž vhodný model, jelikož u myši nedochází k dospívání parazita. Tento problém se pokusili Fu *et al.* (2012) obejít injikací vajíček přímo do stěny močového měchýře. Došlo ke tvorbě granulomatózní odpovědi s infiltráty buněk bohatými zejména na eosinofily a neutrofilny, ale i lymfocyty, docházelo k enkapsulaci vajíček aktivovanými makrofágy (Obr. 1 C, D), dále byla popsána fibróza (Obr. 1 B), poruchy funkce, hematurie a eosinourie. V lymfatických uzlinách i v periferiích byla detekovaná Th2 polarizovaná imunitní odpověď, pro kterou jsou typické vysoké hladiny IL-4, IL-13, eotaxinu a zvyšovaly se také hladiny chemokinů, zato nebyly naměřeny signifikantní změny hladin Th1 a Th17 cytokinů, ani regulačních protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  (Fu *et al.*, 2012).



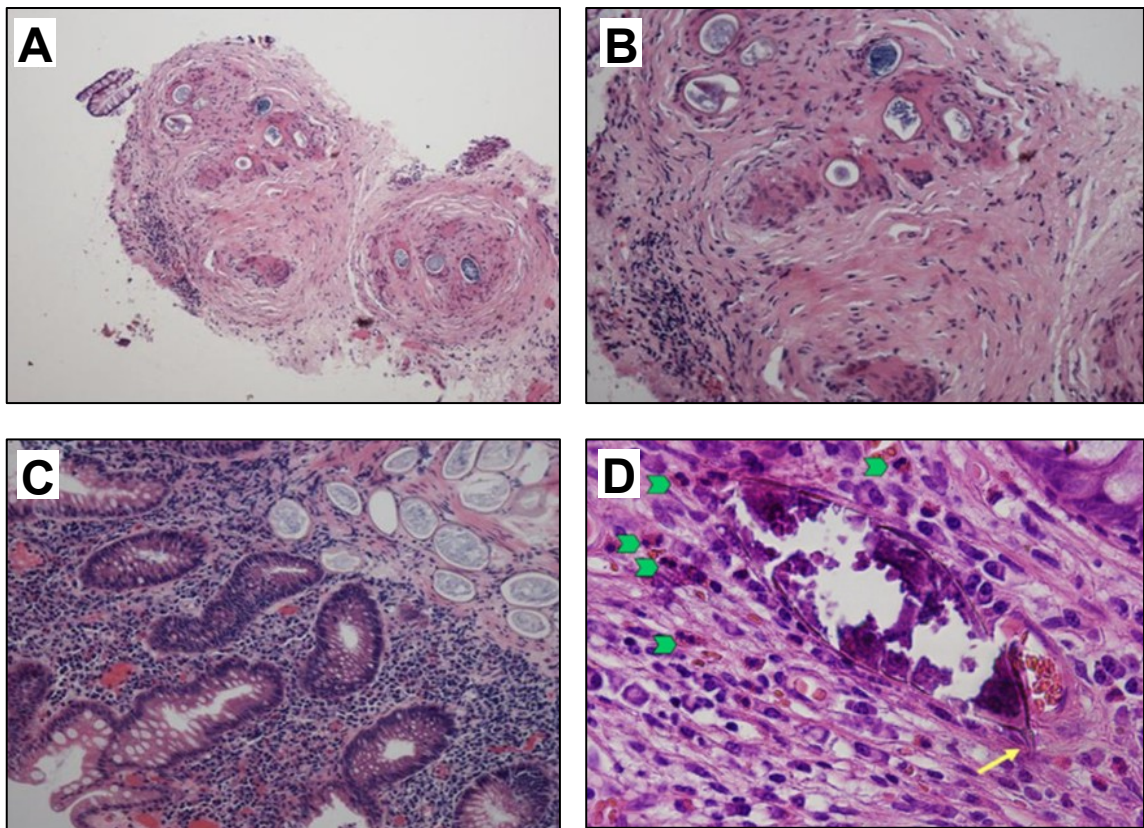


Obr. 1: **Histologicky zpracovaná tkáň stěny močového měchýře s vajíčky *S. haematobium* a buněčnými infiltráty.** (A) Histopatologický řez polypem z lidského močového měchýře s vajíčky *S. haematobium* a zánětlivou tkání. Hematoxylin eosin, zvětšeno 100x. (B, C, D) Vajíčka *S. haematobium* byla do tkáně močového měchýře myši injikována. (B) Rozvoj fibrozy ve stěně močového měchýře myši. Massonův trichrom. (C, D) Vajíčka jsou obklopena aktivovanými makrofágy (epiteloidní buňky), které jsou imunohistochemicky značeny protilátkou proti CD68 (hnědá; žluté šipky), a dalšími buňkami zánětu. Červená šipka – vajíčka parazita, žlutá šipka – aktivované makrofágy (epiteloidní buňky). Zdroje: A (Dessyn *et al.*, 2016); B, C, D (Fu *et al.*, 2012), upraveno.

#### 1.1.4.2 Střevní schistosomóza

U některých pacientů se střevní schistosomózou (původci *S. mansoni* a *S. japonicum*) dochází ke tvorbě střevních polypů. Tito pacienti trpí zpravidla bolestmi břicha, krví ve stolici či krvavým průjmem, souvisejícími obtížemi je obecné neprospívání v důsledku nedokonalého trávení potravy a příjmu živin. Infekce tak může mít v chudších, rozvojových oblastech světa neblahý vliv i na celou společnost. Následná kolonoskopie tedy může odhalit polypy, což jsou útvary ve střevní stěně, a v bioptickém materiálu po histologickém zpracování jsou pak pozorována vajíčka schistosom (Brandt, 2011; Cao *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 1983; Javid *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010; Rodriguez-Guardado *et al.*, 2010). V případě akutní střevní schistosomózy se v okolí živých vajíček objevují infiltráty eosinofilů (Obr. 2) (Lin *et al.*, 2010; Rodriguez-Guardado *et al.*, 2010), lymfocytů a plasmatických buněk (Cao *et al.*, 2010). U chronické formy pak byly v okolí kalcifikovaných vajíček pozorovány infiltráty lymfocytů

a plasmatických buněk a fibróza tkáně (Cao *et al.*, 2010). Histologicky zpracovaný bioptický materiál lidských střevních polypů zobrazují přiložené fotografie (Obr. 2).



Obr. 2: **Vajíčka lidských schistosom zachycená v bioptickém materiálu lidských střevních polypů.** Hematoxylin eosin. **(A, B)** Chronický zánět v mukóze rekta, s obsahem kalcifikovaných vajíček a fibroplasií, zvětšeno 100x, 200x; **(C)** Chronický zánět s vajíčky v submukóze, zvětšeno 200x; **(D)** Vajíčko *S. intercalatum* obklopeno eosinofily, zvětšeno 200x. Zelené šipky – eosinofily, žlutá šipka – trn vajíčka. Zdroje: A, B, C (Cao *et al.*, 2010); D (Rodriguez-Guardado *et al.*, 2010), upraveno.

## 1.2 Ptačí motolice *Trichobilharzia regenti*

Jak je uvedeno výše, ptačí schistosomy včetně *T. regenti* (Horák *et al.*, 1998) mají stejně jako ty lidské dvouhostitelský životní cyklus zahrnující jako mezihostitele vodního plže a jako definitivního hostitele vodního ptáka. V České republice potažmo v Evropě lze očekávat poměrně hojné zastoupení tohoto parazita. Larvální stadium – cercárie – opouští mezihostitelského plže a penetruje definitivního hostitele. Podobně však může vyhledat i jiného teplokrevného obratlovce – savce, např. člověka. V místě penetrace kůže dochází k reakci a tvorbě makulopapulózní vyrážky – cercáriové dermatitidy. V této souvislosti jsou nejskloňovanější právě cercárie ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* (Horák & Kolářová, 2011). Velkou část těla cercárie vyplňují žlázy – některé její ES produkty hrají roli i v pronikání do hostitele, další po transformaci na schistosomulu při migraci tkání a imunitní odpovědi hostitele, ale i v trávení pozřené potravy, např. katepsin B1 (střevo schistosomuly – trávení) a B2 (v penetračních žlázách cercárie) (Dolečková *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2005). V dřívějších pracích nebyla zjištěna elastázová aktivita (Dolečková *et al.*, 2007; Mikeš *et al.*, 2005) a bylo spekulováno, že „elastinolýtickou aktivitu“ zřejmě zastupuje katepsin B2 (Dolečková *et al.*, 2009). Nejnovější průzkumy využívající molekulárních metod však ukázaly, že gen pro elastázu je exprimován jak ve stadiu zárodečné koule, tak ve stadiu cercárie a přítomnost cercáriové elastázy byla prokázána i pomocí proteomických analýz ES produktů cercárie (L. Konečný 2018, nepublikováno).

V kůži dochází k transformaci cercárie *T. regenti* na další larvální stadium zvané schistosomula, která putuje nervovou soustavou – periferními nervy a centrální nervovou soustavou až do oblasti čelních meningů. Po dobu migrace míšním parenchymem se živí nervovou tkání (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002; Lichtenbergová *et al.*, 2011), zato schistosomuly migrující submeningeálním prostorem požírají infiltrované imunitní buňky (Křemářová 2017). V některých případech lze najít schistosomuly i v kožních kapilárách (Kouřilová *et al.*, 2004b), podle *in vitro* studií však krev/cévy nejsou pro schistosomula atraktivní, tento způsob migrace tak je pravděpodobně minoritní či náhodný (Hrádková & Horák, 2002), na rozdíl od lidské schistosomy (McKerrow & Salter, 2002).

Červi putují míchou až do oblasti čelních meningů, ne všem červům se ale podaří míšní kanál opustit a dokončit svůj vývoj. Někteří uvíznou v tkáni a jsou zničeni imunitním systémem (Horák *et al.*, 1999). V meningách byli červi detekováni kolem 12. a 13. dne po infekci (dpi), a to jak intra-, tak extravaskulárně, zato žádné poškození ani červi nebyli zaznamenáni v *bulbus olfactorius*, *nervus olfactorius* a *n. opticus*; střevo červů obsahovalo hnědá granula – červ se zde živí krevní potravou (Chanová & Horák, 2007). Na místo definitivní lokalizace červi migrují pravděpodobně krevní cestou.

V nosní sliznici se červi mohou vyskytovat od 13. dpi, dospívají, kopulují a kladou vajíčka (Horák *et al.*, 1999). Ke kladení vajíček dochází od 14. dpi, nejvyšší množství je jich v tkáni v 22. dpi. Dospělci, kteří nenesou viditelné znaky poškození, se ve sliznici vyskytují až do 24. dpi (Chanová & Horák, 2007), jejich další osud však není dosud znám. Ve sliznici byli červi i nakladená vajíčka pozorováni jak v krevním řečišti, tak – častěji – volně v tkáni (Chanová & Horák, 2007; Horák *et al.*, 1999; Horák *et al.*, 1998; Kolářová *et al.*, 2001). K líhnutí miracidii dochází rovnou v tkáni a do vodního prostředí se dostávají při kontaktu zobáku s vodou při např. pití či krmení (Horák *et al.*, 1998).

Pokusy na myších ukázaly, že je parazit i v savčím hostiteli schopen putovat do míchy a míchou až do prodloužené míchy a mozečku, nejpozději zde však hyne a nikdy nedojde k dospění parazita (Horák *et al.*, 1999). V některých případech je však migrace míchou doprovázena neuromotorickými potížemi patrně vlivem axonálního poškození – projevuje se ztrátou rovnováhy a koordinace končetin, a to jak u náhodného, tak u definitivního hostitele; v některých případech tyto obtíže samovolně odezní, jindy mohou vést až ke smrti hostitele (Horák *et al.*, 1999; Lichtenbergová *et al.*, 2011).

V následujících řádcích budou shrnuty dosavadní poznatky o interakcích mezi parazitem a definitivním hostitelem (model kachna domácí *Anas platyrhynchos* f. *domestica*) a mezi parazitem a náhodným hostitelem (model myš laboratorní *Mus musculus*). Většina prací zabývajících se histopatologií a imunologií infekce se soustředí na centrální nervovou soustavu u definitivního i náhodného hostitele. Tento zájem je logický, neboť parazit působí patrně nejvíce potíží právě při migraci míšním kanálem, čímž je *T. regenti* také unikátní (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002). Další ptačí schistosomou, která byla nalezena i v nervové soustavě, konkrétně v míše a pod meningy, je *Bilharziella polonica* (Prüter *et al.*, 2017). Nosní sliznice, ve které *T. regenti* dospívá a množí se, a kterou lze laboratorně sledovat nejlépe u nakažených kachen, je zatím málo prozkoumanou oblastí.

### **1.2.1 Imunitní odpověď proti *T. regenti* v definitivním hostiteli**

Kachna je pro sledování postupu infekce vhodným modelovým organismem – je jedním z definitivních hostitelů *T. regenti* a je možné ji poměrně snadno chovat v laboratorních podmínkách. Již při vstupu parazita do hostitele, který je možný jak běžně kůži, tak i stěnou jícnu, je možné pozorovat imunitní odpověď organismu, ta však dosud nebyla příliš prozkoumaná. Pech (2013) ve své diplomové práci publikuje fotografiemi histologických řezů kůže kachny po penetraci, ale popisuje jen vágně přítomnost makrofágů a lymfocytů v okolí parazita.

### 1.2.1.1 Migrace centrální nervovou soustavou

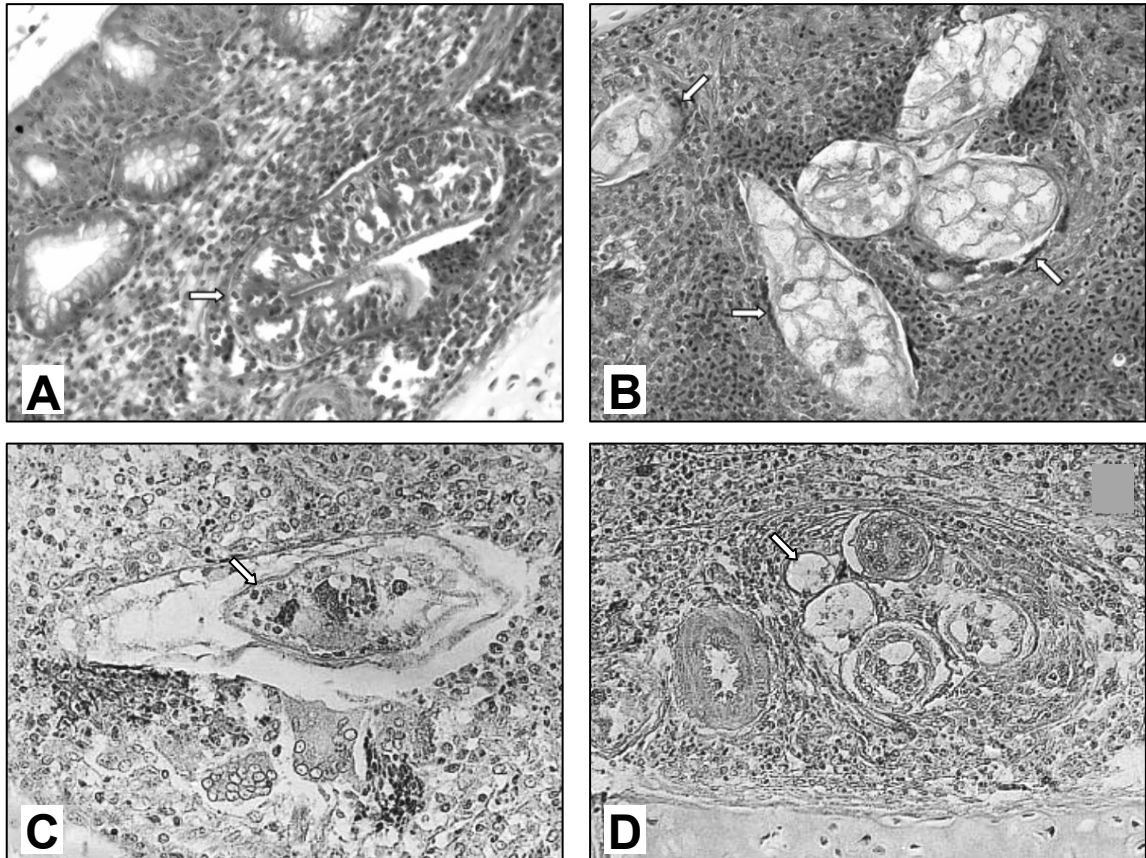
V centrální nervové soustavě – v míše a meningách, kde se parazit během své migrace vyskytuje, byly pozorovány převládající nahluoučené eosinofily a heterofily, méně četné pak plasmatické buňky, histiocyty, lymfocyty a makrofágy, v některých případech i spongiózní hmota s výše zmíněnými buňkami včetně monocytů. Přítomnost buněk se v určitých částech míchy mírně liší (Kolářová *et al.*, 2001). Rovněž byla pozorovaná perivaskulární eosinofilie a infiltráty buněk kolem centrálního kanálu. Poblíž parazita vykazovaly některé neurony známky nekrotických změn. V oblasti *bulbus olfactorius* se kolem parazita vyskytovaly infiltráty eosinofilů, heterofilů, plasmatických buněk a lymfocytů. Nebylo pozorováno poškození parazitů v průběhu pasáže CNS ani významné poškození nervové tkáně (Kolářová *et al.*, 2001).

Schistosomuly se při migraci míšním kanálem nejčastěji vyskytují v bílé hmotě obsahující axony a v menším množství případů byly nalezeny v submeningeálním prostoru a šedé hmotě (Bulantová *et al.*, 2016). K aktivaci astrocytů a reparaci poškozené tkáně po migraci parazita pak dochází kolem 10. dpi (Krčmářová 2017). S poškozením míchy během migrace červa pravděpodobně souvisí neuromotorické obtíže, které byly u infikovaných ptáků opakovaně pozorovány (jedná se o poruchy rovnováhy a orientace a paralýzy končetin) (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002).

### 1.2.1.2 Terminální fáze infekce v nosní sliznici

Terminální fáze infekce byla zatím zkoumána pouze histologickými metodami (Obr. 3). V nosní sliznici se dospělci nacházeli intra- i extravaskulárně, vajíčka však pouze ve sliznici (Kolářová *et al.*, 2001), v době mezi 14. a 27. dpi byla infekce doprovázena také až 700  $\mu\text{m}$  velkými hemoragiemi (Chanová & Horák, 2007). Po celou dobu byly kolem vajíček pozorovány infiltráty lymfocytů, od 22. dpi tvořily lymfocyty, eosinofily a heterofily kolem vajíček granulomatózní útvary. Stejně buněčné složení bylo popsáno kolem volných miracidíí, která se líhnou přímo v tkáni (Chanová & Horák, 2007), a u samotných skořápek (Kolářová *et al.*, 2001). Kolářová (2001) popisuje také přítomnost histiocyty, plasmatických buněk a obřích vícejaderných buněk.

Co se týče protilátek, do 15. dne po infekci, kdy dochází k prvnímu kladení vajíček, se zvyšuje hladina sérového IgM, poté klesá (Turjanicová *et al.*, 2015). S pozdější fází infekce je spojená zvýšená produkce IgY, jehož hladina se začala zvedat kolem 10. dne po infekci a kulminovala 30 dní po infekci. V rámci testovaných skupin sestávajících z domácích a divokých kachen se přítomnost protilátek výrazněji nelišila. Jediný rozdíl byl pozorovaný u IgY u různě starých kachen a stejné doby infekce (Turjanicová *et al.*, 2015).



Obr. 3: **Lokalizace stadií *T. regenti* v nosní sliznici kachny.** Hematoxylin eosin. **(A)** Dospělý červ (15 dpi), zvětšeno 400x; **(B)** nezralá vajíčka (15 dpi), zvětšeno 400x; **(C)** vajíčko s plně vyvinutým miracidie (23 dpi) obklopené eosinofily, heterofily, histiocyty, mononukleárními buňkami, obřími vícejadernými buňkami, menším množstvím plasmatických buněk a lymfocytů, zvětšeno 330x; **(D)** granulom s kolagenními vlákny kolem vajíček poblíž chrupavky (23 dpi), zvětšeno 210x. Šipka – parazit. Zdroje: A, B (Chanová & Horák, 2007); C, D (Kolářová *et al.*, 2001), upraveno.

### 1.2.2 Imunitní odpověď proti *T. regenti* v náhodném savčím hostiteli

Cerkárie *T. regenti* je schopná kromě definitivního hostitele penetrovat i kůži savců. Transformovaná schistosomula zde vyvolává imunitní reakci a uniká do nervové soustavy. Parazit v náhodném savčím hostiteli sice nepřežívá do dospělosti, ale dokáže i několik dní migrovat nervovou soustavou, což může stejně jako u hostitele definitivního vést k neuromotorickým obtížím. Jako modelový organismus nákazy náhodného hostitele sloužily myši, imunokompetentní kmen BALB/c a imunodeficientní kmen SCID.

#### 1.2.2.1 Kůže – vstupní brána infekce

Pro cercáriovou dermatitidu působenou ptačími schistosomami je charakteristický časný typ hypersenzitivní reakce a v pozdní fázi kutánní zánět, vznik edému působením činnosti makrofágů a žírných buněk, které produkují histamin. Docházelo k atrakci neutrofilů, eosinofilů, dalších makrofágů a žírných buněk a menšího množství CD4+ lymfocytů.

U myši měla primoinfekce lehčí průběh. V průběhu několika hodin po penetraci do kůže nastoupil zánět, který byl doprovázen uvolněním cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-12p40 (Kouřilová

*et al.*, 2004a), které ovlivňují diferenciaci Th17 buněk (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007), a byla pozorována smíšená Th1/Th2 odpověď. Při opakované infekci docházelo k přílivu většího množství buněk a ke tvorbě abscesů a nekróze (Kouřilová *et al.*, 2004a). U reinfekcí prováděných 4x v rozmezí 10 dní byla již pozorována Th2 polarizovaná cytokinová odpověď s dominující produkcí IL-4 a IL-5 a zvýšená tvorba sérových imunoglobulinů IgM, IgG1 a IgE. Díky produkci IgE docházelo k degranulaci žírných buněk a basofilů s vylitím histaminu a produkcí IL-4 (Kouřilová *et al.*, 2004a; Lichtenbergová *et al.*, 2008). Po opakovaných infekcích došlo v séru k nárůstu antigenně specifických IgG1 protilátek a poklesu IgG2 – což poukazuje na dominanci Th2 odpovědi (Kouřilová *et al.*, 2004a; Lichtenbergová *et al.*, 2008). Zato infekce u imunodeficientních myší (SCID) reakci v kůži nevyvolala (Kouřilová *et al.*, 2004b).

U *T. regenti* je zatím potvrzeno, že dokáže doputovat do míchy, nejpozději v prodloužené míše či mozečku však nakonec hyne (Horák *et al.*, 1999). *T. regenti* byla také zaznamenaná v plicích, ale pouze v minoritním počtu případů u imunodeficientních myší (SCID) (Lichtenbergová *et al.*, 2011). Do plic mohou migrovat také *Trichobilharzia szidati* a *Bilharziella polonica*, kde sice hynou, ale přesto působí poškození (Horák & Kolářová, 2000).

#### **1.2.2.2 Migrace centrální nervovou soustavou**

*Trichobilharzia regenti* vstupuje do CNS periferními nervy napojujícími se na míšní kořeny (Lichtenbergová *et al.*, 2011). V časně fázi infekce 3. dpi nebyly v okolí parazita pozorovány žádné buněčné infiltráty, imunitní buňky se objevily až 6. dpi (Kouřilová *et al.*, 2004b). Histologicky byly kolem červů v bílé hmotě popsány infiltráty s lymfocyty, neutrofilů, eosinofilů, plasmatickými buňkami a histiocyty (Kolářová *et al.*, 2001; Kouřilová *et al.*, 2004b; Lichtenbergová *et al.*, 2011). Imunohistochemicky byly dále detekovány CD3+ lymfocyty a aktivované mikroglie (Lichtenbergová *et al.*, 2011). V průběhu infekce docházelo k destrukci parazitů, hlavní roli patrně sehrávají makrofágy a mikroglie detekované ve velkých množstvích kolem mrtvých červů (Kouřilová *et al.*, 2004b; Lichtenbergová *et al.*, 2011). Podél migračních kanálů s parazitem byly detekovány aktivované astrocyty, které se účastní oprav poškozené tkáně a tvorby gliové jizvy. Tyto infekce i přes pozorovaná poškození obvykle nevedly k paralýze (Lichtenbergová *et al.*, 2011).

U imunodeficientních myší (SCID) docházelo při migraci schistosomuly CNS ke slabší imunitní odpovědi i menšímu poškození. V bílé hmotě míchy iniciovaly schistosomuly příliv makrofágů a aktivaci mikroglie, byly pozorovány poškozené axony (Lichtenbergová *et al.*, 2011). Ke tvorbě lézí kolem parazita a následnému zničení parazita však docházelo podstatně později než v případě imunokompetentních myší, což poukazuje i na vliv CD3+ lymfocytů u imunokompetentních myší. Opakovaná infekce vedla k těžké paraplegii, snad v důsledku poškození axonů (Lichtenbergová *et al.*, 2011).

Rozsah poškození axonů se u imunokompetentních a imunodeficientních myší nelišilo, docházelo k reparaci a tvorbě gliových jizev. Poškození tkáně není podle Lichtenbergová *et al.* (2011) způsobeno imunitní odpovědí hostitele, nýbrž mechanicky působením parazita, dochází zřejmě i k požírání tkáně. Trávení myelinu zřejmě zajišťuje katepsin B1 obsažený ve střevě migrující schistosomuly (Dvorak *et al.*, 2005).

V současné době (2018) probíhá výzkum, který by měl u nakažených myší popsat dynamiku cytokinů v CNS, vliv infekce na periferní imunitní odpověď a vliv oxidu dusnatého na vývoj nákazy v CNS *in vivo*. Zatím bylo zjištěno, že po stimulaci *in vitro* kultur astrocytů a mikroglíí živými schistosomulami dochází ke zvýšené produkci cytokinu IL-6 astrocyty. Pokud byly tyto kultury stimulovány homogenátem schistosomul nebo rekombinantními katepsiny B1.1 a B2, byly naměřeny zvýšené hladiny nejen IL-6, ale také TNF- $\alpha$  v kultuře astrocytů a NO v obou kulturách. Nebyl pozorován žádný efekt na produkci IL-10 a TGF- $\beta$ 1 (Macháček *et al.*, 2016).

### 1.3 Nosní sliznice kachen a obrana proti patogenům

Nosní sliznice je první bariérou před vstupem patogenů do organismu dýchacími cestami. V mucinózních žlázkách se tvoří ochranná vrstva hlenu, povrch i samotnou tkáň chrání humorální a buněčná imunita a v případě napadení dochází k rychlé zánětlivé reakci.

#### 1.3.1 Stručný přehled specifík kachního imunitního systému

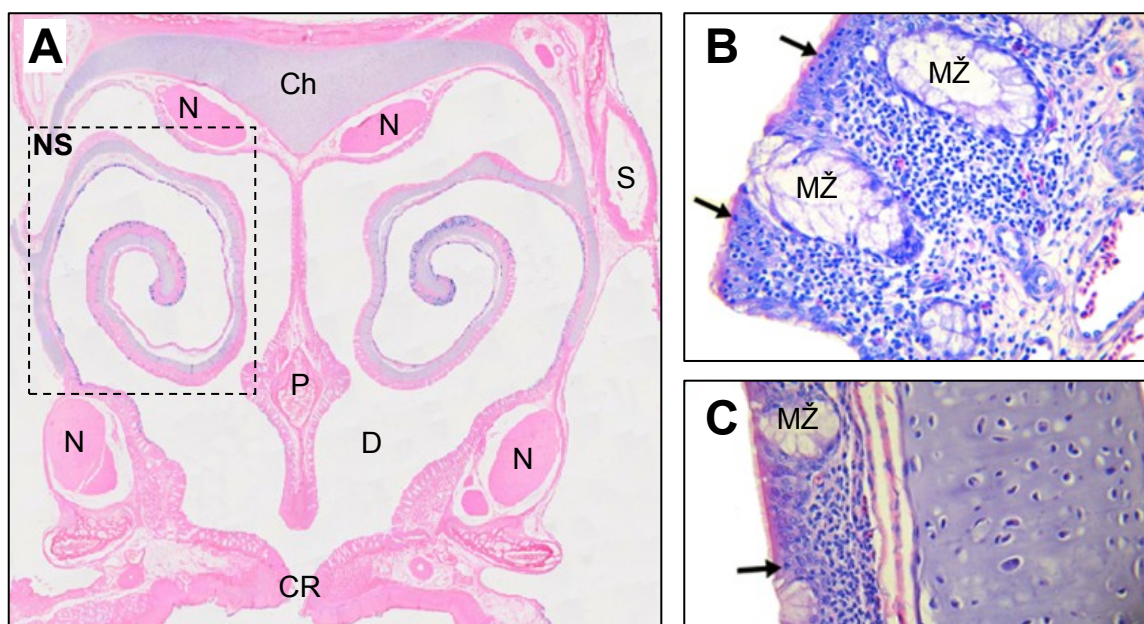
Kachny mají s detailněji prozkoumanými kuřaty mnohé společné, ale jejich imunitní soustava i mechanismy imunitní odpovědi vykazují také jistá specifika. Některé rozdíly mezi ptáky a savci, a také mezi kachnami a ostatními ptáky, jsou shrnuty v této kapitole.

Typickým imunitním orgánem ptáků je Fabriciova burza (Glick *et al.*, 1956) zajišťující vývoj B lymfocytů. Co se týče buněk, funkčními homology savčích neutrofilů jsou heterofily, jejichž granula jsou oproti savčím neutrofilům eosinofilnější (Brooks *et al.*, 1996). Podle výzkumů se zdá, že kachní imunitní buňky obecně disponují jen velmi málo epitopy, které by byly shodné s jinými živočišnými druhy. Např. nesdílejí stejné motivy epitopů na povrchu lymfocytů CD4 a CD8, a to ani s lidmi, ani s kuřaty (Kothlow *et al.*, 2005). Na druhou stranu se ukazuje, že některé epitopy jsou přeci jen konzervovanější a mohou být rozpoznány specifickými protilátkami proti buňkám jiných živočišných druhů (Bertram *et al.*, 1996; Jeurissen & Janse, 1998), je jich však zatím známo jen omezené množství.

Pro kachny jsou pak typické lymfatické uzliny, které u častěji zkoumaného kuřete zcela chybí (Lundqvist *et al.*, 2006), a přítomnost dvou izoform IgY (Lundqvist *et al.*, 2006). Diverzifikace imunoglobulinů probíhá u savců celý život, zato u ptáků dojde k vývoji B buněk již během prvních dvou týdnů imunitního vývoje a po zbytek života pak zůstává výbava stejná (řádově jde o  $10^6$  variant Ig) (McCormack *et al.*, 1991).



Součástí periferního lymfatického systému je také „soustava“ shluků i jednotlivých buněk rozptýlených v podslizniční vrstvě orgánů a v některých žlázách. V této tkáni dochází ke zpracování a prezentaci antigenů a produkci lokálních protilátek (sekreční formy IgM a IgA) a cytokinů. Jde o poměrně rychlý systém ochrany samotné sliznice před invazí patogeny. Čichové ústrojí obratlovců je nejen sensorickým orgánem, ale i výkonným obranným systémem proti infekci. Nosní lymfoidní imunita (angl. nasal-associated lymphoid tissue; NALT) je součástí slizniční imunity a je u savců a ptáků jedním z nejdůležitějších způsobů obrany proti patogenům, neboť stojí prakticky v první linii obrany proti inhalovaným antigenům. U kachen se v kaudální oblasti nosní dutiny nachází dva páry lymfoidních uskupení – jeden pár se nachází na dorzální straně choanální rýhy a druhý na obou stranách nosní přepážky. Navíc můžeme najít i difúzní lymfatickou tkáň v nosní stěně a skořepách (Obr. 4 B, C). NALT nejspíš hraje ústřední roli v aktivaci imunitní odpovědi např. proti inhalovaným antigenům (Kang *et al.*, 2014). U kuřat jsou lymfoidní noduly tvořeny B lymfocyty obklopenými CD4+ lymfocyty; CD8+ buňky jsou situovány v epitelu a v *lamina propria* sliznice nosní dutiny. V NALT jsou pak přítomny převážně IgY+ buňky, méně IgM+ buňky a ojediněle IgA+ buňky. Minimálně v nosní sliznici tedy může hrát IgY větší roli než IgA, který dominuje na sliznicích u savců (Ohshima & Hiramatsu, 2000).



Obr. 4: Řezy kachní nosní dutinou a sliznicí obklopující nosní dutinu. Hematoxylin eosin. (A) Řez nosní dutinou kachny v oblasti *concha nasalis media*. NS – nosní skořepa (*concha nasalis*) s centrální chrupavkou, N – nervy, P – nosní přepážka, D – nosní dutina, CR – choanální rýha, S – slzovod, Ch – hyalinní chrupavka. (B, C) Povrch skořep pokrývá jednoduchý i cylindrický epitel s řasinkami. Difúzní lymfoidní folikuly (šipka) jsou rozmístěny náhodně pod řasinkovým epitelem mezi nebo pod mucinózními žlázami (MŽ) skořepy (40x). Šipka – folikul asociovaný s epitelem. Zdroj: (Kang *et al.*, 2014), upraveno.

### 1.3.2 Obrana kachen proti infekci patogeny

Na rozpoznání patogenů se u kachen podílí např. receptory RIG-I-like (angl. retinoic acid-inducible gene-I-like receptor) (Barber *et al.*, 2010) a TLR, které aktivují DC, indukují expresi cytokinů, chemokinů, NO a později se podílí na nastolení Th1 odpovědi (Barton & Medzhitov, 2002). U ptáků nebyla polarizace dlouho prozkoumána, avšak zdá se, že funguje podobně jako u savců. Degen *et al.* (2005) provedli sérii pokusů na kuřatech, kde zkoumali zvýšení hladin cytokinů ve slezině a lymfatické tkáni ilea při infekci paramyxovirem a škrkavkou *Ascaridia galli*. U první skupiny infikované virem zjistili po 24 hodinách zvýšenou hladinu IFN $\gamma$  a sníženou hladinu IL-13, což dle očekávání odpovídá Th1 polarizované odpovědi. U druhé skupiny infikované škrkavkou zjistili 14. dpi zvýšenou hladinu cytokinů IL-4 a IL-13 a naopak sníženou expresi IFN $\gamma$ , což dle očekávání odpovídá Th2 polarizované odpovědi (Degen *et al.*, 2005). Pozorovaná Th2 imunitní odpověď při helmintóze koreluje s již známým faktem, že při napadení sliznice helminty dochází typicky k polarizaci Th2 imunitní odpovědi (Weinstock *et al.*, 2005). Krom toho může u kuřat docházet také k diferenciaci Th17, neboť byly po stimulaci kůže kuřat fytohemaglutininem detekovány cytokiny spojené s činností Th17: IL-6 a TGF $\beta$ , který má vliv na vznik Th17 (pomocné lymfocyty) i Treg a je tak důležitý pro udržení imunologické tolerance, a prozánětlivý IL-1 $\beta$  (Vinkler *et al.*, 2014).

Do místa zánětu se velmi rychle dostávají heterofily (jejich počty stoupají během 12 hodin, kdy dosahují maxima) a makrofágy (přetrvávají po mnoho dní). Rovněž stoupají počty lymfocytů a bazofilů, kterých je však oproti heterofilům a makrofágům výrazně méně (Klasing, 1991). Heterofily jsou významnými fagocyty a stojí v první linii obrany proti mikrobům, přičemž velký význam mají v dýchací soustavě. Na obraně proti patogenům se podílí schopností fagocytovat, degranulovat a navozovat oxidativní vzplanutí, oproti savcům však s nižší intenzitou. Heterofily obsahují několik typů granulí s elastázou,  $\beta$ -defenziny, katepsinem, lysozymem, kyselou fosfatázou atd., zato oproti neutrofilům neobsahují myeloperoxidázu, alkalickou fosfatázu a katalázu (Genovese *et al.*, 2013; Harmon, 1998). Heterofily jsou po vylíhnutí kuřat nezralé a svou funkci začínají plně zastávat až v prvních týdnech po vylíhnutí, do té doby nejsou dostatečně účinné, nereagují na cytokiny tak, jako heterofily u starších ptáků, a mladí ptáci jsou tak náchylnější k infekcím (Kogut *et al.*, 2002; Lowry *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998; Zulkifli & Siegel, 1994).

Mastocyty neboli žírné buňky se běžně nachází ve sliznicích a pojivu, a to i u kachen (Valsala *et al.*, 1986), a účastní se odpovědi proti virům i parazitům. Jejich přítomnost koreluje s množstvím tryptázy v tkáni (Wang *et al.*, 2008), kterou obsahují ve svých granulích spolu s histaminem, heparinem a dalšími enzymaticky aktivními látkami, které brání srážení krve, podílejí se na vzniku alergické reakce či přímo působí na navázané patogeny.

Studium kachen je často spojené s výzkumem ptačí chřipky. U drůbeže způsobuje ptačí chřipka úhyny a dlouhodobě se řeší vývoj vhodných vakcín (Kang *et al.*, 2012). Do 24 hodin po expozici napadá virus makrofágy, heterofily a buňky endotelu. Právě makrofágy a heterofily jej pak roznáší po těle. Kachny jsou přirozeným rezervoárem ptačí chřipky a typicky u nich nedochází k rozvoji projevů infekce či ke smrti (Kida *et al.*, 1980; Sharp *et al.*, 1993). Jedním z prvních míst, kde se u drůbeže nákaza projevuje, je nosní sliznice. V nosní sliznici, konkrétně u poláka chocholačky (*Aythya fuligula*), se objevují heterofily zejména v *lamina propria* a hlubších částech epitelu. Některé buňky epitelu jsou degenerovány. Nicméně velká poškození či léze jsou i u tohoto vrubozobého ptáka spíše ojedinělé (Brojer *et al.*, 2009). Co se týče markerů zánětu, hladina iNOS stoupá při nákaze ptačí chřipkou či v přítomnosti IFN $\gamma$  u kuřat i u kachen a koreluje s výskytem NO (Burggraaf *et al.*, 2011).

## 2 METODIKA

### 2.1 Zisk materiálu

V této práci posloužily jako modelový organismus motolice vodních ptáků *Trichobilharzia regenti*, jejichž cyklus máme v naší laboratoři zavedený. K jeho udržení slouží mezihostitelský plž *Radix lagotis* a definitivní hostitel kachna domácí *Anas platyrhynchos* f. *domestica*. Pro účely této diplomové práce posloužily vzorky nosní skořepy se sliznicí a nosnou chrupavkou (*concha nasalis*) kachny napadené uvedeným parazitem a obsahující životní stadia: dospělce, vajíčka a vyvinutá miracidia. Pro účely některých pokusů byly použity také tenké roztěry krve kuřete či kachny a otisky lymfatických orgánů (sleziny a Fabriciovy burzy).

Během práce na diplomovém projektu bylo využito následující množství zvířat: 2 zdravé myši kmene BALB/c pro získání negativního myšního séra, 3 zdravá kuřata na krevní roztěry a 28 kachen (zdravé i nakažené *T. regenti* v různých fázích infekce) na krevní roztěry, otisky tkání a zejména k dalšímu zpracování nosní sliznice. Součástí výčtu jsou zvířata využitá jak pro optimalizaci metod, tak k samotným dílčím pokusům.

#### 2.1.1 Nákazy a pitvy kachen

Nakažení plži byli vyjmuti z chovných nádrží a umístěni do kádinek s odstátou vodou pod zdroj světla po dobu cca 60 minut. Z plžů se začaly uvolňovat cercárie. Poté byli plži vráceni do akvária a voda s cercáriemi slita do odměrné baňky s vysokým hrdlem. Na hrdlo byl opět nasměrován zdroj světla, zbytek baňky byl obalen alobalem. Jelikož jsou cercárie pozitivně fototaktické, začaly se na základě světelné stimulace shromažďovat u hladiny, odkud byly odebírány.

Sedmidenní kachna byla fixována k nádobě pomocí speciálně upraveného víka a její nohy byly umístěny do kádinky s vodou obsahující infekční dávku čítající cca 1000 cercárií. Kachna byla obalena alobalem proti prochladnutí a zanechána na bezpečném místě po dobu 45 minut. Po uplynutí této doby byla kachna vyjmuta z nádoby s vodou, okroužkována a navrácena zpět do chovů (Meuleman *et al.*, 1984).

Délka infekce závisela na studované fázi infekce. Infekce byla rozdělena do čtyř fází, ve kterých je již možné v nosní sliznici zachytit dospělé a posléze i vajíčka a miracidia: kachny byly usmrcovány dekapitací 14., 16., 22. a 26. dpi. Z kachny byly vypitvány obě nosní skořepy se sliznicí (*concha nasalis*) a zpracovány podle způsobu dalšího použití.

Pro mnohé postupy byl potřeba fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline; PBS): do nádoby o objemu 1 l bylo odváženo 8 g chloridu sodného (NaCl), 0,2 g chloridu draselného (KCl), 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 0,92 g hydrogen fosforečnanu

sodného  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a bylo doplněno do 1 l destilovanou vodou. Poté bylo změřeno pH a případně upraveno na hodnotu 7,4. Roztok PBS byl autoklávován a poté uchováván v lednici.

## 2.2 Histologické zpracování a barvení vzorků

Nosní sliznice byla zalévána do parafínu, z bločků byly následně na mikrotomu krájeny 5  $\mu\text{m}$  tlusté řezy. Řezy byly napnuty na hladině vlažné vody a potom sesbírány na podložní skla. Po přilnutí byly řezy skladovány na suchém místě nebo rovnou dále zpracovávány pro histologická barvení. Barvení bylo prováděno téměř po celou dobu v digestoři, neboť některé roztoky obsahují těkavé a zdraví nebezpečné látky (fenol, formaldehyd, metanol atd.). Vzorky byly prohlíženy pod mikroskopem (OLYMPUS BX51), získané fotografie byly zpracovávány v programech QuickPHOTO MICRO 3.0 (PROMICRA) a Zoner Photo Studio 14 (ZONER SOFTWARE).

### 2.2.1 Fixace tkání

Pro histologické zpracování tkání byl nejprve srovnáván efekt následujících fixází: 4% formaldehydu a Bouinova roztoku (SIGMA-ALDRICH), které jsou v naší laboratoři běžně používány. V obou případech byly vzorky tkáně fixovány 24 až 48 hodin při pokojové teplotě a poté bylo postupováno, jak je uvedeno níže (kapitola 2.2.2). V případě Bouinova roztoku byla tkáň po fixaci promývána 70 % etanolem (bod 1 v kapitole 2.2.2) navíc ještě 6 x po 1 hodině a přes noc.

Po neuspokojivých výsledcích byla na základě doporučení vyzkoušena a dále využívána pouze Davidsonova fixáž.

#### 2.2.1.1 Modifikovaná Davidsonova fixáž DAFA

DAFA je vhodná pro fixaci vzorků obsahujících různě tuhé tkáně, např. pro zpracování měkkých i se schránkami, kostí či vzorků obsahujících jak chrupavku, tak i měkkou sliznici, jako v našem případě.

Příprava zásobního roztoku:

- 110 ml glycerolu  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
- 220 ml 40% formaldehyd  $\text{CH}_2\text{O}$
- 330 ml 96% etanolu (EtOH)
- 340 ml destilované vody

Pro přípravu pracovního roztoku bylo použito 9 dílů zásobního roztoku a 1 díl kyseliny octové.

Tkáň byla fixována 24 hodin, maximálně však 48 hodin, neboť při delší době fixace tkáň vlivem formaldehydu křehne.

Vzorky je poté možné uchovávat v 70% EtOH do dalšího zpracování.

## 2.2.2 Příprava parafinových bločků

Po 24 hodinové fixaci v DAFA (a případném uchovávání v 70 % etanolu) bylo postupováno následovně:

1. Propláchnutí: 70% EtOH            3 x 15 minut
2. Odvodnění:
  - 70% EtOH                            3 x 30 minut
  - 96% EtOH                            3 x 30 minut
  - 100% EtOH                           3 x 30 minut
3. Projasnění: xylen                    2 x 15 minut
4. Prosyncení: xylen-parafin        15 minut
5. Parafin I:            56 °C                    1 hodina
6. Parafin II:           56 °C                    cca 12 hodin (přes noc)
7. Parafin III:         56 °C                    1 hodina
8. Zalití vzorků do bločku parafinem.

Etanol byl připraven použitím denaturovaného 96% etanolu ředěného buď destilovanou vodou v odpovídajícím poměru, nebo přidáním vyžíhané, bezvodé modré skalice (síran měďnatý  $\text{CuSO}_4$ ), která z etanolu vyváže molekuly vody za vzniku téměř 100% etanolu.

Práce s xylenem probíhala v digestoři. Xylen-parafin byl připravený předem rozpuštěním paraplastu (Surgipath Paraplast, SIGMA-ALDRICH) v xylenu za dosažení nasyceného roztoku. Při prosyncování vzorku parafinem byl vzorek umístěn do nádoby s alespoň desetinásobkem objemu parafinu, než je objem samotného vzorku. Pro vytvoření bločků byla použita silikonová forma. Při nalévání parafinu a práci se samotným vzorkem je vhodné vyvarovat se tvorbě bublinek vzduchu, které poté znesnadňují krájení – rozpuštěný parafin byl nalit do nahřátých formiček, poté byl vložen vzorek a takto připravené bločky byly ještě zanechány po dobu cca 15 minut v termoboxu v 56 °C. Jelikož je nosní skořepa stočená, je nutné také kontrolovat, zda se nenachází bublinky vzduchu uvnitř, a to po celou dobu zpracování od fixace po zalití do bločků.

Bloček byl zanechán alespoň 3 hodiny při pokojové teplotě ke ztuhnutí, většinou však déle. Krájení některých bločků probíhalo po jejich zchlazení cca 1 hodinu v -20 °C.

Na rotačním mikrotomu (SHANDON FINESSE) byly bločky krájeny na 5  $\mu\text{m}$  řezy, napnuty na hladině vody zahřáté cca na 37 °C a poté sbírány na podložní skla.

### 2.2.3 Použité barvicí metody

Veškerá barvení byla prováděna v digestoři. U všech barvicích metod bylo postupováno následovně:

1. Odparafinování:

Xylen I	10 minut
Xylen II	10 minut
2. Zavodnění:

100% EtOH	2-5 minuty
96% EtOH	2-5 minuty
70% EtOH	2-5 minuty
3. **Barvení** – postup se liší u jednotlivých barvení (seznam viz Tab. 1) a bude uvedeno níže
4. Odvodnění:

70% EtOH	1 minuta
96% EtOH	1 minuta
100% EtOH	1 minuta
5. Projasnění:

Xylen I	30 s
Xylen II	30 s

Tab. 1: Přehled použitých histologických barvení a základních struktur, které jimi byly barveny.

Název	struktury	strana
Hematoxylin a eosin	široké spektrum	26
Massonův trichromů I	kolagen	27
Massonův trichromů II	kolagen	28
Diff Quick	krevní elementy	29
Toluidinová modř	žírné buňky	30
Ziehl-Neelsen	skořápky schistosom	31
Alciánová modř	žírné buňky	32
Periodic Acid Schiff	polysacharidy	32
Giemsa	krevní elementy i tkáně	33
Orcein	elastická vlákna	33
Pruská modř	průkaz železa	33

### 2.2.3.1 Hematoxylin a eosin

Barvení kombinací barviv hematoxylinu a eosinu patří mezi barvení přehledná a je stále rutinně využíváno i v diagnostických laboratořích pro rozlišení různých tkání a morfologických změn např. při nádorovém bujení. Hematoxylin má tmavě fialovou barvu a značí nukleové kyseliny, tedy zejména jádra. Eosin je výrazně růžový a nespecificky značí proteiny.

#### Roztoky

##### *Ehrlichův kyselý hematoxylin*

- 2 g hematoxylinu  $C_{16}H_{14}O_6$
- 100 ml 96% EtOH
- 100 ml destilované vody
- 10 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$  (95%)
- 100 ml glycerínu  $C_3H_8O_3$
- 3 g síranu hlinito-draselného  $AlK(SO_4)_2$
- 0,4 g jodičnanu sodného  $NaIO_3$

Hematoxylin byl rozpuštěn v 96% etanolu za stálého míchání ve vodní lázni na zahřáté plotýnce (cca 80 °C). Po zchlazení byl roztok smíchán s destilovanou vodou, glycerínem, kyselinou octovou, jodičnanem sodným (oxidační činidlo) a nasycen síranem hlinito-draselným (mořidlo, které zvyšuje afinitu barvy ke tkáni). Přefiltrovaný roztok poté týden oxidoval v tmavé či zatemnělé nádobě.

##### *Eosin Y*

- 1 g eosinu Y  $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$
- 100 ml 96% EtOH

Rozpuštěním 1 g eosinu v 100 ml 96% EtOH vznikl cca 1% zásobní roztok. Pracovní roztok byl vytvořen naředěním 70% etanolem do 0,1% eosinu a přidáním kapky ledové kyseliny octové.

#### Postup barvení po zavodnění

1. Hematoxylin 5 minut
2. Promytí vodovodní vodou – diferenciací a kontrola pod mikroskopem (oxiduje na hematein, což se projevuje zvýšením kontrastu a modro fialovým zbarvením)
3. Eosin Y 15 s až 1 minuta (dle stáří barvy)

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).



### 2.2.3.2 Massonův trichrom I

Massonovy trichromy patří rovněž mezi přehledná barvení a jsou používány při vyšetřování kolagenního vaziva. Jsou používány tři typy barvení podle toho, jakou barvou kolagen značí: žlutý, modrý a zelený.

Pomocí následujícího postupu bylo možné v tkáni pozorovat modro zelený kolagen, fialovo-černá jádra a červenou cytoplazmu (červeně barví také svalová vlákna).

#### Roztoky

##### *Wiegertův železitý hematoxylin*

Roztok A (stabilní 1 rok):

- 1 g hematoxylinu  $C_{16}H_{14}O_6$
- 100 ml 96% EtOH

Roztok B (stabilní 1 rok):

- 0,6 g chloridu železitého  $FeCl_3$
- 0,75 ml kyseliny chlorovodíkové HCl
- 95 ml destilované vody

Roztoky byly připravovány za varu, kyseliny byly přidány po zchladnutí. Poté, co byly oba roztoky smíchány a přefiltrovány, byla barva stabilní po dobu min. 3 měsíců.

##### *Kyselý etanol 70%*

- 100 ml 70% EtOH
- 1 ml ledové kyseliny octové

##### *Biebrich scarlet*

- 0,5 g Biebrich scarlet  $C_{22}H_{16}N_4O_7S_2$
- 1 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$
- 99 ml destilované vody

Roztok byl připravován při teplotě cca 80 °C a zůstal stabilní po dobu 3 měsíců.

##### *Roztok kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové*

- 100 ml destilované vody
- 2,5 g kys. fosfowolframové  $H_3[P(W_3O_{10})_4] \cdot H_2O$
- 2,5 g kys. fosfomolybdenové  $H_3Mo_{12}O_{40}P \cdot H_2O$

##### *Fast green FCF = brilantní modř FCF = triarylmetan*

- 2,5 g fast green FCF  $C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$
- 2,5 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$
- 97,5 ml destilované vody

Roztok byl připravován při teplotě cca 80 °C a zůstal stabilní po dobu 5 let.

#### *1% ledová kyselina octová*

- 99 ml destilované vody
- 1 ml ledové kyseliny octové  $\text{CH}_3\text{COOH}$

#### **Postup barvení po zavodnění**

1. Wiegertův hematoxylin 3 - 10 minut (dle stáří)
2. Oplach kohoutkovou vodou
3. Diferenciace kyselým etanolem s kontrolou pod mikroskopem
4. Oprání kohoutkovou vodou (dle potřeby)
5. Oprání destilovanou vodou
6. Biebrich scarlet 2 - 5 minut
7. Oplach destilovanou vodou
8. Roztok kys. fosfowolframové a fosfomolybdenové 1 minuta
9. Oplach destilovanou vodou
10. Fast green FCF 2 minuty
11. 1% ledová kyselina octová 1 minuta

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).

#### **2.2.3.3 Massonův trichrom II**

Pomocí následujícího postupu je možné v tkáni pozorovat modrý kolagen, fialovo-černá jádra buněk a v různé intenzitě růžovo-červenou cytoplazmu (růžově barví i svaly).

#### **Roztoky**

##### *Fuchsin-ponceau*

Roztok A:

- 1 g kyselého fuchsinu  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$
- 100 ml destilované vody
- 1 ml ledové kyseliny octové  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Roztok B:

- 1 g ponceau 2R = ponceau de xylydine  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$
- 100 ml destilované vody
- 1 g kyseliny fosfowolframové  $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 2ml ledové kyseliny octové  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Roztoky byly připravovány za varu, kyseliny byly přidány po zchladnutí poté, co byly oba roztoky smíchány a přefiltrovány.

### *Anilinová modř*

- 2,5 g anilinové modři  $C_{32}H_{25}N_3O_9S_3Na_2$
- 100 ml destilované vody
- 2 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$

Prášek anilinové modři byl rozpouštěn za tepla, kyselina byla přidána po zchladnutí. V literatuře či u výrobců se můžeme setkat s různými ekvivalenty názvu aniline blue jako china blue, metyl blue či aniline blue WS, někdy lze také nalézt, že anilin blue je kombinací metyl blue a water blue.

Poznámka: Pro zlepšení kontrastu, resp. posílení vazby mezi molekulami barviva a sledovanou tkání se někdy doporučuje refixace (angl. mordanting) použitím Bouinovy tekutiny, a to zejména u postupů zahrnujících světlou zeleň (Light Green SF yellowish) namísto anilinové modři. Po rehydrataci (xylen, sestupná alkoholová řada) se řezy inkubují 1 hodinu v 56 °C v Bouinově roztoku, poté se vypírají destilovanou vodou do odmytí žluté barvy. Následuje stejný postup.

### **Postup barvení po zavodnění**

1. Wiegertův hematoxylin 3 - 10 minut (dle stáří)
2. Oplach kohoutkovou vodou
3. Diferenciace kyselým etanolem s kontrolou pod mikroskopem
4. Opraní kohoutkovou vodou (dle potřeby)
5. Opraní destilovanou vodou
6. Fuchsin-ponceau 5 minut
7. Oplach 1% kys. octovou

Poznámka: Někdy se uvádí proložení těchto kroků promytím v  $dH_2O$  – je nutné vyzkoušet a případně optimalizovat časy. My jsme tento krok vypustili, neboť pravděpodobně vlivem změny pH způsoboval vymytí modři.

8. Anilinová modř 5 - 10 minut (lepší déle)
9. Oplach destilovanou vodou
10. Dif. v 1% kyselině octové 1 minuta (dle potřeby)
11. Oplach destilovanou vodou

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).

### **2.2.3.4 Diff Quick**

Differential Quick Stain Kit je komerčně dostupné modifikované Giemsa-Romanowski barvení vhodné zejména na roztěrové preparáty. Postup je jednoduchý a rychlý, sestává ze tří cca 30 sekundových kroků následujících po usušení vzorku.

## Roztoky

- *roztok A* – fixáž: obsahuje metan a triarylmetan (fast green FCF = brilantní modř FCF)
- *roztok B* – modrý, eosinofilní: xanthenové barvivo
- *roztok C* – červený, bazofilní: thiazinové barvivo (toluidinová a methylénová modř), pufr

Podle serveru IHCWORLD.com lze barvit také parafinové řezy a vynechat roztok A (metanol). My jsme tento krok zařadili.

### Postup barvení po zavodnění

1. Diff Quick roztok A 30 sekund
2. Diff Quick roztok B 30 sekund
3. Diff Quick roztok C 30 sekund
4. Oplach destilovanou vodou

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).

### 2.2.3.5 Toluidinová modř

Žírné buňky/mastocyty bývají za běžných fyziologických podmínek rozprostřeny v pojivové tkáni, toluidinová modř metachromaticky obarví granula díky obsahu heparinu.

## Roztoky

*Toluidinová modř – zásobní roztok 1%*

- 1 g toluidinové modři  $C_{15}H_{16}ClN_3S$
- 100 ml 70% EtOH

*Chlorid sodný 1%*

- 0,5 g chloridu sodného NaCl
- 50 ml destilované vody

Bylo třeba u roztoku NaCl změřit pH a případně je upravit na 2,3.

Pracovní roztok byl připravován smícháním 5 ml zásobního roztoku toluidinové modři a 45 ml 1% NaCl. V ideálním případě je vhodné připravovat roztok 1% NaCl potažmo pracovní roztok toluidinové modři vždy čerstvý, neboť zvýšení pH při delší době uchovávání způsobí, že jsou výsledky barvení méně kontrastní (IHCWORLD.com).

### Postup barvení po zavodnění

1. Toluidinová modř (prac. roztok) 30 s – 2 min (dle stáří roztoku a zalévacího media)
2. Oplach destilovanou vodou 3x

### 3. Okamžitá dehydratace

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).

#### 2.2.3.6 Ziehl-Neelsen

##### Roztoky

*Wiegertův železitý hematoxylin viz 2.2.3.2*

*Karbol-fuchsin 1%*

- 1 g bazického fuchsinu  $C_{20}H_{20}ClN_3$
- 10 ml 100% EtOH
- 90 ml destilované vody
- 5 g krystalického fenolu  $C_6H_5OH$

Krystalický fuchsin byl zahříván v destilované vodě v EtOH do rozpuštění. Po zchlazení byl přidán fenol a roztok byl přefiltrován do tmavé nádoby nebo alespoň uchováván na tmavém místě, stabilní by měl být po dobu 1 roku.

*Kyselý EtOH viz 2.2.4.2*

*Methylénová modř*

- 1 g methylénové modři  $C_{16}H_{18}N_3Cl$
- 20 ml 96% EtOH
- 80 ml destilované vody
- 1 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$

Methylénová modř byla rozpuštěna zahřátím roztoku EtOH a destilované vody. Po zchlazení byl přidán 1 ml ledové kyseliny octové. Roztok je stabilní po dobu 2 měsíců.

##### Postup barvení po zavodnění

1. Oplach destilovanou vodou
2. Wiegertův hematoxylin 10 minut
3. Oplach kohoutkovou vodou
4. Diferenciace kyselým etanolem s kontrolou pod mikroskopem
5. Vyprat kohoutkovou vodou (dle potřeby) a destilovanou vodou
6. Karbol-fuchsin 2 hodiny v kyvetě v 37 °C
7. Diferenciace kyselým EtOH do narůžovělé barvy vzorku
8. Vyprat kohoutkovou vodou (dle potřeby) a destilovanou vodou
9. Methylénová modř 5 minut
10. Vyprat v kohoutkové vodě 2 – 3 minuty

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny nakažené *T. regenti* (22. dpi).

### 2.2.3.7 Alciánová modř

#### *Alciánová modř*

- 100 ml 3% ledová kyselina octová CH<sub>3</sub>COOH (pH 2,5)
- 1g Alcian blue 8GX C<sub>56</sub>H<sub>68</sub>C<sub>14</sub>CuN<sub>16</sub>S<sub>4</sub>

#### **Postup barvení po zavodnění**

1. Oplach destilovanou vodou
2. Roztok Alciánové modři 1-2 hod/30 min
3. Oplach destilovanou vodou

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny nakažené *T. regenti* (22. dpi).

K dobarvení jader byla většinou doporučována jádrová červeň na různě dlouhou dobu za různé teploty: 20 min, 5 min v 37 °C či 30 sekund v mikrovlnné troubě. My jsme použili Wiegertův železitý hematoxylin.

### 2.2.3.8 Periodic Acid Schiff (PAS)

PAS reakce slouží k důkazu polysacharidů (glykogen, škrob, celulóza, kalóza), glykosaminoglykanů/mukopolysacharidů (kys. hyaluronová, chondroitin sulfát), proteoglykanů, glykoproteinů (tyreoglobulin, kolagen), glykolipidů.

#### **Roztoky**

##### *Kyselina jodistá (HIO<sub>4</sub>, angl. Periodic acid)*

- 0,1 g kys. jodisté HIO<sub>4</sub>
- 50 ml destilované vody

##### *Schiffovo činidlo*

Bylo použito komerčně dostupné Schiffovo činidlo (MERC), lze jej však také připravit následovně: 200 ml destilované vody se vaří za stálého míchání s 1 g bazického fuchsinu, po ochlazení na 50 °C je roztok přefiltrován a doplněn 20 ml HCl, po ochlazení na 25 °C jsou přidány 2 g disiřičnanu sodného či draselného. Roztok se nechá odležet 24 hodin na tmavém místě v uzavřené nádobě. Poté jsou přidány ještě 2 g aktivního uhlí, roztok je zfiltrován – má mít čirou či nažloutlou barvu, ne růžovou; skladování je doporučeno v lednici.

*Gillův hematoxylin* – využili jsme již připraveného roztoku

#### **Postup barvení po zavodnění**

1. Oxidace kys. jodistou 5 minut
2. Oplach destilovanou vodou
3. Schiffovo činidlo 15 minut → světle růžové
4. Vyprat kohoutkovou vodou 5 minut → tmavě růžové
5. Dobarvení Gillovým hematoxylinem 1 – 5 minut

6. Vyprat kohoutkovou vodou 5 minut
7. Po uschnutí montovat do DPX

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny nakažené *T. regenti* (22. dpi).

#### 2.2.3.9 Giemsa

Byl použit komerčně dostupný roztok tohoto polychromatického barviva. Obsahoval kombinaci methylenové modři (azur B) a eosinu v glycerolu a metanolu (Giemsa stain – modified, SIGMA-ALDRICH), díky čemuž lze jedním roztokem obarvit odlišně různé buněčné struktury – acidofilní složky růžovo-červeně, neutrální fialově a bazofilní modře.

#### Postup barvení po zavodnění

1. Oplach destilovanou vodou
2. Giemsa 4 hodiny v 37 °C
3. Oplach destilovanou vodou
4. 1% kys. octová 30 sekund

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny nakažené *T. regenti* (22. dpi).

#### 2.2.3.10 Orcein

Pomocí orceinu lze obarvit elastická vlákna.

Příprava roztoku *orceinu*: 2 g orceinu  $C_{28}H_{24}N_2O_7$  byly za tepla rozpuštěny v 45 ml ledové kyseliny octové  $CH_3COOH$ , poté bylo přidáno 55 ml destilované vody a roztok byl zchlazen.

#### Postup barvení po zavodnění

1. Opláchnutí řezů destilovanou vodou
2. Orcein 30 – 60 minut v 38 °C
3. Oplach destilovanou vodou
4. Diferenciace 70% kyselým EtOH
5. Poté je možné dobarvit Mayerovým či Harrisovým hematoxylinem

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi).

#### 2.2.3.11 Pruská modř

Barvicí metoda se využívá k detekci hemosiderinu (zásobní formy železa) ve tkáni, na roztěrech krve a kostní dřeni. Hemosiderin je obarven jasně modře, jádra červeně a cytoplazma růžově. Jako pozitivní kontrola byla použita myší slezina.

#### Roztoky

##### *Pruská modř*

Roztok A: 20% vodný roztok kyseliny chlorovodíkové

- 20 ml kyseliny chlorovodíkové HCl

- 80 ml destilované vody

Roztok B: 10% vodný roztok žluté krevní soli

- 10 g žluté krevní soli (ferrokyanid draselný, hexakynoželeznatan draselný)  
 $K_4Fe(CN)_6 \cdot H_2O$
- 100 ml destilované vody

Pracovní roztok pruské modři byl připraven smícháním obou roztoků v poměru 1 : 1 těsně před použitím.

*Jádrová červeně*

- 0,1 g jádrové červeně  $C_{14}H_8NNaO_7S$
- 5 g síranu hlinitého  $Al_2(SO_4)_3$
- 100 ml destilované vody

#### **Postup barvení po zavodnění**

1. Opláchnutí řezů v destilované vodě
2. Pracovní roztok pruské modři 20 minut
3. Jádrová červeně 5 minut
4. Promytí destilovanou vodou

Touto metodou byly obarveny vzorky nosní sliznice kachny zdravé i nakažené *T. regenti* (14., 16., 22., 26. dpi) a myši sleziny pro pozitivní kontrolu.

#### **2.2.4 Zhodnocení přítomnosti *T. regenti*, imunitních buněk a patologických změn**

Pro posouzení změn ve tkáni nosní sliznice v průběhu infekce bylo v určených intervalech (14., 16., 22. a 26. dpi) sledováno několik ukazatelů – vývojová stadia parazita, infiltrované buňky a patologické změny hostitelské tkáně, k jejichž identifikaci nám pomohla výše uvedená histologická barvení. Vše bylo porovnáváno s neinfikovanou kontrolou.

Sledovali jsme:

- Přítomnost dospělců a vajíček ve tkáni a cévách, stupeň vyvinutí miracidia
- Destrukci vajíček
- Poškození cévního řečiště
- Hemozoin ve tkáni v okolí vajíček
- Infiltráty zánětlivých buněk a jejich výskyt ve tkáni a kolem parazita: granulocyty, žírné buňky, lymfocyty a makrofágy
- Tvorbu kolagenních vláken v okolí vajíček



## 2.3 Imunohistochemické zpracování tkáně na kryořezech

Pomocí imunohistochemických metod lze ve vzorku tkáně prokázat přítomnost antigenů na základě interakce se specifickými protilátkovými sondami. Byly vytvořeny mražené vzorky v kryoprotektivním médiu. Řezy tkáně byly poté značeny buď „jednokrokově“ protilátkou, která již obsahovala fluorescenční značku, nebo „dvoukrokově“ neznačenou primární protilátkou, na kterou byla poté navázána sekundární protilátka konjugovaná fluorescenční značkou. Výhodou mražených vzorků je snazší příprava, při které nedochází k vystavování vzorků zbytečně dalším látkám, které by mohly znesnadňovat barvení. U fluorescenčního barvení je výhodná možnost značení několika protilátkovými sondami najednou.

Vzorky byly prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS BX51), získané fotografie byly zpracovávány v programech QuickPHOTO MICRO 3.0 (PROMICRA) a Gimp.

### 2.3.1 Zpracování tkáně a příprava vzorků

#### 2.3.1.1 Použité roztoky

##### *Čerstvý roztok paraformaldehydu (4%)*

Roztok byl připraven rozpuštěním 4 g paraformaldehydu (PFA) ve 100 ml destilované vody za stálého míchání při 60 °C. Roztok je možné skladovat v lednici v 4 °C, doporučuje se maximálně 2 týdny, nebo v mrazáku v -20 °C po delší časový úsek; v našem případě byl skladován nejdéle 2 týdny při 4 °C. Teplota a doba fixace se zdá být závislá na zvyklostech dané laboratoře. Nám se osvědčilo fixovat tkáň přes noc a ne déle než 24 hodin při pokojové teplotě.

##### *Fosfátový pufr (PBS) (viz 2.1.1)*

##### *Sacharóza o různé koncentraci*

Mezi fixací a mražením je nutné vzorky převést přes sacharózovou řadu do kryoprezervativního média, které zamezí popraskání vzorku při zmražení. Roztoky sacharózy byly připraveny rozpuštěním příslušného množství sacharózy (LACH-NER) v PBS. Tento přechod jsme provedli s roztoky sacharózy: 4%, 15% a 30% sacharóza při pokojové teplotě.

Mražení vzorků bez aplikace roztoků sacharózy se neosvědčilo.

##### *Kryoprezervativní médium (OCT)*

Kryoprezervativní médium – Tissue Freezing Medium (LEICA BIOSYSTEMS)

#### 2.3.1.2 Příprava kryobločku s tkání

Z usmrcené kachny je vyjmuta nosní skořepa (*concha nasalis*) se sliznicí a následuje postup:

1. den:

1. Fixace 4% PFA v pokojové teplotě přes noc na třepače

2. den:

- |                  |   |
|------------------|---|
| 1. PBS           | 3x15 minut  |
| 2. 4% sacharóza  | 15 minut  |
| 3. 4% sacharóza  | do klesnutí tkáně – tj. doba, za kterou dojde k prosycení vzorku sacharózou |
| 4. 15% sacharóza | do klesnutí tkáně   |
| 5. 30% sacharóza | do klesnutí tkáně   |

2. nebo 3. den:

1. Zalít čistým OCT 1 h v pokojové teplotě, zmizí bublinky vzduchu; tento krok může být ještě jednou opakován, aby došlo k prosycení kryoprotektivním médiem, nebylo to ale potřeba
2. Do -80 °C

Vzorky byly zalévány do malých bločků o velikosti cca 1 x 1 x 2 cm a uchovávány v -80 °C v zip-sáčkách bez přístupu vzduchu. Kryoprezervativní médium je velmi náchylné na vyschnutí, proto i značení vzorků bylo prováděno co nejdříve po krájení, aby se předešlo případné degradaci antigenních epitopů a autofluorescenci tkáně.

Krájení bylo prováděno na kryomikrotomu (LEICA BIOSYSTEMS CM3050S) při teplotě -22 °C na řezy o tloušťce 10 µm. Tato tloušťka byla vhodná jak pro pohodlné krájení, tak pro pozorování buněk. Řezy přilnuly na skla X-tra (LEICA BIOSYSTEMS) za pokojové teploty, a poté byly uloženy opět do -80 °C v pouzdře v zip-sáčku.

## 2.3.2 Značení buněk a tkání protilátkami

### 2.3.2.1 Použité roztoky

*Blokovací a inkubační pufr BIP (100 ml)*

- 1 g hovězího sérového albuminu (Bovine Serum Albumin; BSA)
- 0,1 ml Triton-X-100
- dolít do 100 ml PBS

Blokovací a inkubační pufr byl použit k blokování a k ředění primárních i sekundárních protilátek.

*Tris Base Solution (TBS)*

- 0,605 g Tris base (0,05 M)
- 0,876 g NaCl (0,15 M)

Roztok byl připraven ve 100 ml destilované vody a pH bylo upraveno na 7,6 v 25 °C.

*Použité (primární) protilátky jsou uvedeny v příložené tabulce (Tab. 2, str. 40-41)*

*Použité sekundární protilátky:*

- Donkey anti-mouse IgG (H+L), konj. AlexaFluor® 488 (INVITROGEN, A-21202)
- Goat anti-mouse IgG (H+L) konj. AlexaFluor® 568 (INVITROGEN, A-11004)  
– pouze při pilotních testovacích pokusech

### **2.3.2.2 Postup značení**

Skříčka se vzorky byla vyjmuta z -80 °C, nechána 10 až 20 minut při pokojové teplotě a orámována hydrofobním perem (NovoPen NCL-PEN, LEICA BIOSYSTEMS). Vzorky na sklíčkách byly zpracovávány do několika dnů, maximálně týdnů po nakrájení. Při delším skladování mohou vzorky vysychat a epitopy ztrácet antigenicitu, což může vést k falešně negativním výsledkům. Pokusy byly prováděny ve vlhké komůrce bez přístupu světla.

1. Rehydratace PBS 3x10 minut
2. (Permeabilizace: 0,1% Triton-X-100 v PBS 10 minut)
3. Blokování (viz. níže) 60 minut při pokojové teplotě
4. (Odkrývání epitopů: 1% sacharóza cca 20 hodin)
5. Primární protilátka v BIP inkubace přes noc ve 4 °C
6. Promytí PBS 6x5 minut
7. Sekundární protilátka v BIP inkubace 60 minut při pokojové teplotě
8. Promytí PBS 6x5 minut
9. Montování – Vestashield s DAPI (VECTOR LABS)

### **Poznámky k jednotlivým krokům**

Vzhledem k tomu, že do poslední chvíle nebyla metoda pro jednotlivé protilátky uspokojivě optimalizována, jsou zde uvedeny prakticky veškeré kroky a obměny, nikoli jediný funkční postup.

*1. Rehydratace PBS:* zavodnění vzorku, bez obměn

*2/3. Blokování a permeabilizace:* u tohoto kroku došlo k rozsáhlým změnám. Byla vyzkoušena celá řada blokovacích roztoků z běžně dostupných zdrojů, od klasického 1% BSA v PBS, který se poměrně běžně a úspěšně v laboratořích používá, až po vysokoprocenní roztoky obsahující negativní séra hovězí či kozí (Normal Goat Serum; NGS) v různých kombinacích v PBS i TBS. Zde jsou uvedeny všechny použité roztoky:

- 1% BSA v PBS
- 2% BSA v PBS
- 5% BSA v PBS
- 2% BSA + 2% NGS v PBS
- 2% NGS v PBS

- 5% NGS v PBS
- 10% NGS v PBS
- 2% BSA + 2% NGS v TBS
- 2% NGS v TBS
- 5% NGS v TBS
- 10% NGS v TBS
- BIP (obsahuje 1% BSA)
- 5% mléko (Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD)

Od kroku s permeabilizací bylo nakonec upuštěno a zastoupil jej BIP, který obsahuje detergent. V případě blokování ostatními roztoky byl použit 0,1% Triton-X-100.

4. *Odkrývání epitopů:* Tento krok byl zařazen pouze 1x v době, kdy se nám naopak nedařilo pozorovat žádný signál.

5. *Primární protilátka v BIP:* U většiny protilátek bylo použito ředění 1:100 (což odpovídá koncentraci 5 až 10 µg/ml), v některých případech 1:50 a 1:200. Protilátky proti kuřecím buňkám (viz Tab. 2, str. 40 – 41) byly aplikovány i na roztěry kuřecí krve, všechny protilátky byly v rámci testování aplikovány i na roztěry kachní krve, některé pak i na otisky sleziny a Fabriciovy burzy a na řezy nosní sliznicí kachen.

7. *Sekundární protilátka v BIP:* Ředění sekundární protilátky bylo zpravidla 1:200 (koncentrace 10 µg/ml), zkoušeno bylo i ředění 1:400 až 1:1000.

### **Negativní kontroly**

U negativních kontrol bylo provedeno místo kroku 5. Primární protilátka v BIP následující:

- a) vzorek jsme inkubovali pouze s BIP a poté opět postupovali dle protokolu
- b) vzorek jsme inkubovali s negativním myším sérem, jelikož veškeré primární protilátky byly myšího původu, a poté opět postupovali dle protokolu

### **Pozitivní kontroly**

Jako pozitivní kontroly byly použity vzorky inkubované s protilátkou proti CD4 T lymfocytům a KUL01.

## **2.3.3 Značení vybraných markerů zánětu**

Pomocí následujících dvou značení by mělo být možné detekovat oxidované a nitrosylované proteiny.

### **2.3.3.1 Nitrosylované proteiny**

Vlivem oxidu dusnatého dochází k nitrosylaci proteinů, resp. tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu. Přítomnost nitrotyrosinu na proteinech je vhodným markerem zánětlivého procesu s produkcí NO. Ke značení byla použita monoklonální protilátka proti 3-nitrotyrosinu.

Postup byl obdobný, jak je uvedeno v kapitole 2.3.2.2. Ředění protilátky 1:200 (mouse mAb anti-nitrotyrosine antibody, ABCAM ab7048).

### 2.3.3.2 Oxidované proteiny

K tomuto účelu byl použit kit (Cell Biolabs, STA-310) obsahující dinitrofenylhydrazin (DNPH), který způsobí derivatizaci sledovaných karbonylovaných proteinů (ty vznikají vlivem oxidace popř. glykace proteinů) za vzniku dinitrofenolu; a takto upravený vzorek byl poté inkubován s protilátkou proti dinitrofenolu.

*Derivatizační roztok:* 0,1% DNPH ve 2M HCl v PBS

*Primární protilátka proti DNP:* v poměru 1:200 v PBS (specifikace viz Tab. 2, str. 40-41)

*Sekundární protilátka:* Goat anti-rabbit IgG (H+L), konj. Alexa Fluor ® (INVITROGEN, A-11034) v poměru 1:200 v PBS

#### **Postup:**

1. Rehydratace PBS 3x10 minut
2. Permeabilizace PBS-T 10 minut, zbytek odsát
3. Blokování: BIP 60 minut při pokojové teplotě
4. Derivatizace roztokem DNPH 1 hodina při pokojové teplotě
5. Primární protilátka proti DNP v PBS inkubace přes noc ve 4 °C
6. Promytí PBS 6x5 minut
7. Sekundární protilátka v BIP inkubace 60 minut při pokojové teplotě
8. Promytí PBS 6x5 minut
9. Montování – Vestashield s DAPI (VECTOR LABS)

Tab. 2: Seznam všech testovaných protilátek.

Protilátka/ antigen	Klon	Speci- fita	Původ	Značí dle výrobce	Značení u kachen
<b>BAFF-R /CD268</b>	2C4	H	Santa Cruz Biotech, sc-365410	B lymfocyty	<b>B lymfocyty</b> (Kothlow <i>et al.</i> , 2005)
<b>Bu-1-RPE</b>	AV20	C	VÚVeL Brno (Southern Biotech)	B lymfocyty, monocyty/makrofágy	nic (Bean, Reaiche, Bertram, Lowenthal a Jilbert; Kothlow, Kaspers a Shultz podle Schat <i>et al.</i> , 2014)
<b>CD3</b>	CT3	C	UMG AV (supernatant, zdroj: Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty	nic (Jeurissen & Janse, 1998)
<b>CD3-ε</b>	UCH-T1	H	Santa Cruz Biotech, sc- 1179	T lymfocyty	v případě konzervované domény <b>T lymfocyty</b> (Bertram <i>et al.</i> , 1996; Brojer <i>et al.</i> , 2012; Kothlow <i>et al.</i> , 2005)
<b>CD4</b>	DuCD4-2	D	BioRad, MCA2478	T lymfocyty	<b>T lymfocyty</b> (Kothlow <i>et al.</i> , 2005)
<b>CD45-APC</b>	LT40	C	VÚVeL Brno (Southern Biotech)	všechny leukocyty	<b>leukocyty</b> (Bean, Reaiche, Lowenthal a Jilbert podle Schat <i>et al.</i> , 2014)
<b>CD45-RPE</b>	LT40	C	Southern Biotech, 8270-09 (ZOO)	všechny leukocyty	<b>leukocyty</b> (Bean, Reaiche, Lowenthal a Jilbert podle Schat <i>et al.</i> , 2014)
<b>CD4-FITC</b>	CT4	C	VÚVeL Brno (Southern Biotech)	T lymfocyty	nic (Bean, Reaiche, Bertram, Lowenthal a Jilbert; Kothlow, Kaspers a Shultz podle Schat <i>et al.</i> , 2014)
<b>CD51/61</b>	23C6	H	ZOO (BioLegend, 304410)	osteoklasty, endotel, makrofágy, kr. destičky	neznámo
<b>CD8β</b>	EP42	C	ZOO (Lsbio, C188705)	T lymfocyty (CD8+)	neznámo
<b>CD8-SPRD</b>	CT8	C	VÚVeL Brno (Southern Biotech)	thymocyty, monocyty (CD8+)	neznámo
<b>αCD11c/CD18</b>	-	C	UMG AV (Čihák Uni. Mnichov)	adhezivní povrchové glykoproteiny řady buněk - Tc, B lymfocyty, Mo/MF, mikroglie	neznámo
<b>αCD28</b>	2-4	C	UMG AV (Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty	<b>T lymfocyty</b> (Kothlow <i>et al.</i> , 2005)
<b>αCD4</b>	2-6	C	UMG AV (supernatant, Vainio Uni Turku)	T lymfocyty (CD3+)	neznámo
<b>αCD69</b>	-	C	UMG AV (supernatant, Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty, NK	neznámo
<b>αCD8</b>	-	C	UMG AV (ascites, dr. Vainio Uni. Turku)	T lymfocyty (CD8+)	neznámo

(pokračování a popis tabulky na další straně)

Protilátka/ antigen	Klon	Speci- fita	Původ	Značí dle výrobce	Značení u kachen
<b>COL10A1</b>	X-AC9	A	Santa Cruz Biotech, sc-59954	kolagen α1 typ X	<b>kolagen typu 1</b>
<b>K1</b>	-	C	UMG AV (prof. Kaspers Mnichov)	kuřecí makrofágy	<b>monocyty/makrofágy</b> (Kothlow <i>et al.</i> , 2005)
<b>KUL01</b>	KUL01	C	UMG AV (dr. Maast Brusel)	Mo/MF, DC	neznámo
<b>KUL01-FITC</b>	KUL01	C	ZOO (Southern Biotech, 8420 – 02)	Mo/MF, DC	neznámo
<b>M1</b>	-	D	UMG AV (supernatant z TK, dr. Mason, USA)	kachní makrofágy	<b>makrofágy</b>
<b>M2</b>	-	D	UMG AV (supernatant z TK, dr. Mason, USA)	kachní makrofágy	<b>makrofágy</b>
<b>Mast Cell Tryptase</b>	G3	H	Santa Cruz Biotech, sc-33676	žírné buňky	neznámo, mohla by rovněž <b>tryptázu MC</b>
<b>MF marker</b>	MAC387	H	Santa Cruz Biotech, sc-66204	makrofágy	neznámo
<b>TRC1</b>	-	C	UMG AV (supernatant, zdroj: Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty (TCR1 subpopulace)	nic (Jeurissen & Janse, 1998)
<b>TRC2</b>	-	C	UMG AV (ascites, Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty (TCR2 subpopulace)	nic (Jeurissen & Janse, 1998)
<b>TRC3</b>	-	C	UMG AV (supernatant, zdroj: Čihák Uni. Mnichov)	T lymfocyty (TCR3 subpopulace)	nic (Jeurissen & Janse, 1998)
-	LD16	C	UMG AV	neznámo	neznámo
-	125LO16	C	UMG AV (supernatant, prof. Hála Innsbruck)	aktivované kuřecí lymfocyty	neznámo
<b>dinitrophenol (DNP)</b>	-	-	Cell Biolabs, STA-310 (protilátka součástí ELISA kitu)	oxidované proteiny	<b>oxidované proteiny</b>
<b>nitrotyrosine (3-NT)</b>	HM.11	-	Abcam, ab7048	nitrosylované proteiny (3-nitrotyrosin)	<b>nitrosylované proteiny</b> (3-nitrotyrosin)

Všechny protilátky jsou z myšího hostitele, kromě protilátky proti DNP, která je z králíka. U žlutě vyznačených protilátek byla možná reakce s kachními buňkami či tkáněmi a byly použity na tkáňových řezech.

Použité zkratky | Specifita: A – ptáci; D – kachna; H – člověk; C – kuře. Vzorky některých protilátek jsme získali z jiných pracovišť – původ: UMG AV – Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze, Odd. virové a buněčné genetiky (starší protilátky z různých zdrojů); VÚVeL Brno – Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, Odd. imunologie; ZOO – Katedra zoologie PŘF UK Praha, Lab. evoluční a ekologické imunologie. Značí: DC – dendritické buňky; MF – monocyty/makrofágy; NK – NK buňky, přirození zabíječi; TCR – receptory T buněk.

## 2.4 Měření reaktivity protilátek pomocí průtokové cytometrie

Některé protilátky byly testovány také pomocí průtokové cytometrie, neboť byly k tomuto účelu doporučeny výrobcem či takto byly již využity v publikovaných výzkumech. Pro účely metody jsme vybrali jen některé, níže uvedené, protilátky a využili jsme nastavení softwaru u cytometru podle kolegů, kteří pomocí cytometrie analyzovali kuřecí krev (Bílková *et al.*, 2017).

Tuto metodu jsme zkoušeli třikrát na různém vstupním materiálu.

1. pokus: Kachní krev mražená v kryoprotektivním roztoku

2. pokus:

a) Kachní krev plná čerstvá

b) Leukocyty získané z kachní krve pomocí Histopaque gradientu

3. pokus: Slezina homogenizovaná přes sítko

Použité roztoky:

*Heparin (SIGMA-ALDRICH)*

*Fosfátový pufr (PBS) (viz 2.1.2)*

*10% dimethylsulfoxid (10% DMSO) v PBS*

*10% DMSO s 10% BSA v PBS*

### 2.4.1 Postup jednotlivých cytometrických pokusů

Vzorky byly zpracovávány za minimálního přístupu světla. Všechny vzorky byly měřeny na cytometru CytoFLEX S (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA) pomocí softwaru CytExpert (Beckman Coulter) a vzorky 3. pokusu byly poté zpracovávány také v programu FlowJo®10.4.2 (FlowJo, LLC).

#### 2.4.1.1 1. pokus

Pomocí inzulinové injekční stříkačky bylo odebráno cca 180 ml kachní krve (2 díly), která byla okamžitě smíchána s heparinem (1 díl). Do cca 250 ml roztoku krve s heparinem bylo přidáno 25 ml 10% DMSO a takto upravené vzorky byly uchovávány v -80 °C po dobu 1 měsíce. Následující postup je doplněn tabulkou (Tab. 3), která poskytuje přehled použitých protilátek a ředění u jednotlivých vzorků a kontrol.

Po rozmrazení roztoku krve s heparinem a DMSO byly vytvořeny 4 vzorky o objemu 50 µl, které byly dále zpracovávány na ledu:

1. inkubace: Ke každému vzorku obsahujícímu 50 µl roztoku krve s heparinem a 10% DMSO byla přidána buď protilátka, myší sérum, nebo PBS (podle Tab. 3) na 20 minut.
2. Poté byl každý vzorek promyt 1400 µl PBS, vortexován a centrifugován 5 minut při 400 g a teplotě 20 °C. Supernatant byl vylit a s peletem byl postup



promytí opakován. Po druhém promytí bylo ve zkumavce ponecháno cca 100 µl PBS s buňkami z peletu.

3. 2. inkubace: Každý vzorek byl inkubován se sekundární protilátkou nebo PBS (podle Tab. 3) 20 minut.
4. Byl opakován postup z bodu 2 a po druhém promytí bylo k peletu přidáno 500 µl PBS.
5. Měření probíhalo na průtokovém cytometru a bylo naměřeno cca 10 000 událostí.

Tab. 3: Přehled protilátek a roztoků, které byly aplikovány k jednotlivým vzorkům kachní krve při prvním pokusu.

Číslo vzorku	1. inkubace/primární protilátka, ředění	2. inkubace/sekundární protilátka, ředění
1	proti kachním CD4, 1:100 (BioRad, MCA2478)	Donkey anti-mouse IgG, 1:200 (INVITROGEN, A-21202)
2	proti kuřecím CD45, 1:100 (Southern Biotech, 8270-09)	* (Primární protilátka je konjugovaná s fluorescenční značkou.)
3	K1 – myší sérum	Donkey anti-mouse IgG, 1:200 (INVITROGEN, A-21202)
4	K2 – *	*

K1, K2 – negativní kontroly; \* – vzorek byl v tomto kroku inkubován pouze s PBS.

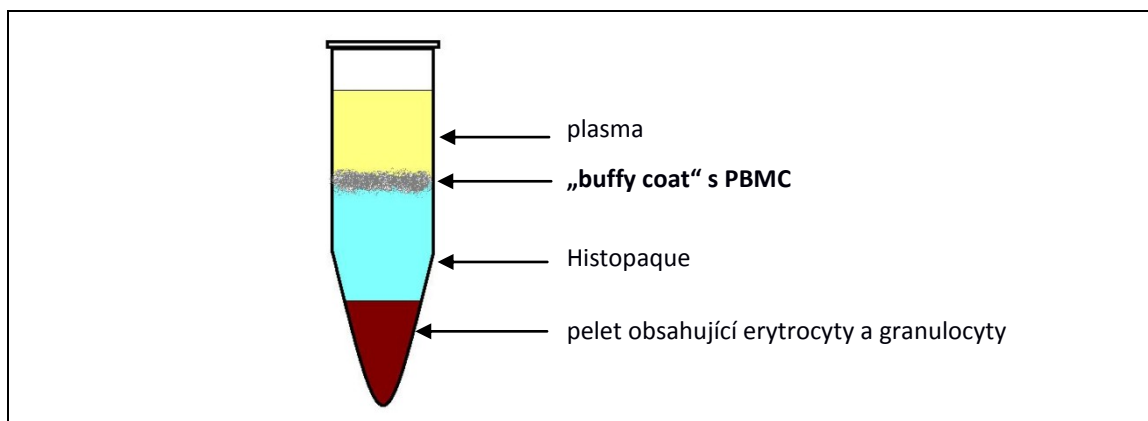
#### 2.4.1.2 2. pokus

Kachní krev byla odebrána pomocí inzulinové injekční stříkačky a okamžitě smíchána s heparinem v poměru 3 díly krve ku 1 dílu heparinu, získali jsme cca 500 µl roztoku. Následující postup je doplněn tabulkou (Tab. 4), která poskytuje přehled použitých protilátek a ředění u jednotlivých vzorků a kontrol.

U celé krve (typ vzorku „**CK**“, viz Tab. 4), která byla zpracovávána cca do 10 minut od odebrání, bylo postupováno jako u prvního pokusu (kapitola 2.4.1.1) vyjma přidání DMSO a mražení; centrifugace probíhala při 20 °C.

U části vzorků byly leukocyty nejprve separovány gradientovou centrifugací (typ vzorku „**HL**“, viz Tab. 4) s využitím Histopaque (SIGMA-ALDRICH), a to pomocí následujícího postupu:

1. Na 500 µl separačního média Histopaque bylo opatrně napipetováno 500 ml roztoku krve s heparinem.
2. Vzorky byly centrifugovány 20 minut při 800 g a teplotě 20 °C.
3. Roztok se rozdělil na frakce (Obr. 5): plasma, špatně viditelný „buffy coat“ s lymfocyty a monocyty (PBMC; angl. peripheral blood mononuclear cell), Histopaque, pelet s erytrocyty a pravděpodobně granulocyty. Vrstva s plasmou byla odpipetována tak, aby nedošlo k narušení „buffy coat“, ten byl poté opatrně přenesen do nové zkumavky a naředěn PBS.



Obr. 5: Schéma krve rozdělené na frakce po centrifugaci přes separační médium Histopaque. PBMC – lymfocyty a monocyty (angl. peripheral blood mononuclear cell).

V případě suspenze obsahující jen „buffy coat“ byl postup následovný:

1. 1. inkubace: Vzorek „buffy coat“ v PBS o objemu 50  $\mu$ l byl inkubován s protilátkou nebo PBS (podle Tab. 4) po dobu 20 minut při pokojové teplotě.
2. Poté byl každý vzorek promyt 1400  $\mu$ l PBS, vortexován a centrifugován 5 minut při 400 g a teplotě 20 °C. Supernatant byl vylit a s peletem byl postup promytí opakován. Poté bylo ve zkumavce necháno cca 50  $\mu$ l roztoku.
3. 2. inkubace: Vzorek byl inkubován se sekundární protilátkou nebo PBS (podle Tab. 4) 20 minut při pokojové teplotě.
4. Opakovali jsme postup z bodu 2 a po druhém stočení bylo k peletu přidáno 500  $\mu$ l PBS. Podle potřeby jsme roztok ředili i při měření.
5. Měření probíhalo na průtokovém cytometru a bylo naměřeno 10 000 událostí.

Tab. 4: Přehled protilátek a roztoků, které byly aplikovány k jednotlivým vzorkům kachní krve při druhém pokusu.

Číslo vzorku	Typ vzorku	1. inkubace/primární protilátka	2. inkubace/sekundární protilátka
1A	CK (KUL01)	KUL01 proti kuřecím Mo/MF, 1:100 (Southern Biotech, 8420 – 02)	* (Primární protilátka je konjugovaná s fluorescenční značkou.)
1B	HL (KUL01)		
2A	CK (K1)	*	Goat anti-mouse IgM $\mu$ chain, 1:200 (INVITROGEN, A-21042)
2B	HL (K1)		
3A	CK (K2)	*	Donkey anti-mouse IgG, 1:200 (INVITROGEN, A-21202)
3B	HL (K2)		
4A	CK (K3)	*	*
4B	HL (K3)		

CK – celá krev; HL – leukocyty oddělené pomocí Histopaque. K – negativní kontroly (K1 a K2 obsahují pouze sekundární protilátku, K3 neobsahuje žádnou protilátku). \* – vzorek byl v tomto kroku inkubován pouze s PBS; Mo/MF – monocyty/makrofágy.

### 2.4.1.3 3. pokus

Čerstvá slezina byla po vyjmutí z kachny nakažené *T. regenti* 26. dpi udržována po nezbytně dlouhou dobu na ledu v malém množství PBS. Cca 1/3 tkáně byla natrhána pinzetou a skalpelem, homogenizována pomocí plastové paličky (angl. plastic/pellet pestle) v 1,5 ml zkumavce. Homogenát byl poté přelit přes sítko (EASYstrainer, 70 $\mu$ m, GREINER BIO-ONE) do 50 ml zkumavky a doplněn PBS do 20 ml. Přítomnost buněk byla zkontrolována pod mikroskopem. Následující postup je doplněn tabulkou (Tab. 5), která poskytuje přehled použitých protilátek a ředění u jednotlivých vzorků a kontrol.

Pro účely tohoto pokusu byla použita sekundární protilátka: Donkey anti-mouse IgG, 1:200 (INVITROGEN, A-21202). Jako kontroly byly použity vzorek bez značení, vzorek pouze se sekundární protilátkou a vzorek, který byl 20 minut zahříván na 60 °C značený markerem k posouzení stavu buněk (živé/mrtvé) (viz Tab. 5 – vzorky č. 1-3).

Postup:

1. Pro jednotlivá značení (vzorky) bylo použito 50  $\mu$ l suspenze homogenátu odebraného do 1,5 ml zkumavky.
2. Suspenze byla doplněna 500  $\mu$ l PBS, 2x promyta a centrifugována 5 minut při 400 g za 4 °C. Supernatant byl vylit.
3. 1. inkubace: K některým vzorkům byla přidána primární protilátka, resp. konjugovaná protilátka v PBS, v případě kontrol potom pouze PBS bez primární protilátky o objemu 200  $\mu$ l (podle Tab. 5). Vzorky byly inkubovány 30 minut v 4 °C.
4. Každý vzorek byl 2x promyt PBS, centrifugován 5 minut při 400 g a 4 °C. Supernatant byl vylit.
5. 2. inkubace: K některým vzorkům byla přidána sekundární protilátka a značka pro detekci mrtvých buněk (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, INVITROGEN, L34957; dále zkráceno na L/D) (podle Tab. 5). Vzorky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě.
6. Každý vzorek byl 3x promyt PBS, centrifugován 5 minut při 400 g a 4 °C. Supernatant byl vylit. Pro účely měření bylo k peletu přidáno 100  $\mu$ l PBS a vzorek byl před měřením vortexován.
7. Měření probíhalo na průtokovém cytometru. Nejdříve byly změřeny kompenzační kontroly (Tab. 5 – vzorek 3 a 8). Poté bylo pokračováno se samotnými vzorky a u každého bylo naměřeno zpravidla 50 000 událostí

Tab. 5: Přehled protilátek a roztoků, které byly aplikovány k jednotlivým vzorkům kachní sleziny při třetím pokusu.

Číslo vzorku	Vzorek	1. inkubace		2. inkubace	
		Primární protilátka (IAb)	Sekundární protilátka (IIAb)	L/D	
1	K – bez protilátek	✘	✘	✘	
2	K – IIAb	✘	✓	✘	
3*	K – zahřívání 60 °C	✘	✘	✓	
4	IAb: <b>proti kachním CD4</b> , 1:100 (BioRad, MCA2478)	✓	✓	✓	
5	IAb: <b>proti kuřecím CD28</b> , 1:50 (UMG AV ČR)	✓	✓	✓	
6	IAb: <b>proti lidským CD3ε</b> , 1:100 (Santa Cruz Biotech, sc-1179)	✓	✓	✓	
7	IAb: <b>proti lidským BAFF-R</b> , 1:100 (Santa Cruz Biotech, sc-365410)	✓	✓	✓	
8*	IAb: <b>proti kachním CD4</b> , 1:100 (BioRad, MCA2478)	✓	✓	✘	
9	IAb: <b>KUL01 proti kuřecím Mo/MF</b> , 1:100 (Southern Biotech, 8420 – 02)	✓	✘	✓	

Pro kompenzaci zde posloužily vzorky 3\* a 8\*. K – kontroly, IIAb – sekundární protilátka. ✘ – vzorek byl v tomto kroku inkubován pouze s PBS; ✓ – vzorek byl v tomto kroku inkubován s příslušnou protilátkou. Bližší informace o použitých protilátkách lze nalézt v tabulce na str. 40 – 41 (Tab. 2).

## 2.4.2 Analýza dat – gating strategy

Vyhodnocování proběhlo jen u výsledků pokusu č. 3 (kapitola 2.4.1.3) pomocí programu FlowJo<sup>®</sup>10.4.2. Výsledků bylo dosaženo pomocí vhodného vybírání dat („gating strategy“). Nejdříve byly změřeny kompenzační kontroly (Tab. 5 – vzorky č. 3 a 8), což jsou vzorky označené jen jedním fluorochromem. Kompenzace slouží ke korekci případné emise do jiného kanálu. L/D obsahuje molekulu, která se váže na intracelulární i membránově vázané aminy u mrtvých buněk a fluorochrom „Aqua“ excituje při 405 nm. Oproti tomu fluorochrom použité sekundární protilátky excituje při 488 nm. Tato kontrola ukázala buňky emitující jen žádoucí signál v daném spektru a potvrdila, že nedochází k výraznému překryvu signálů obou použitých fluorescenčních značek. Poté byly měřeny ostré vzorky. Prvním krokem následné „gating strategy“ bylo vynesení dat z měření buněk dle velikosti a granularity, poté byly vybrány jen jednotlivé buňky (singlety), u kterých bylo poté pozorováno rozdělení na grafu s vynesenu velikostí buněk (osa x) ku síle fluorescenčního signálu (osa y) při excitaci při 488 nm. Byla vybrána pozitivní populace buněk, u které byl v posledním kroku posuzován stav buněk (živé/mrtvé) sledováním L/D signálu.

## 2.5 Histochemické značení kryořezů lektiny

Při histochemickém značení byly využívány roztoky obsahující lektiny, které by se měly vázat na předpokládané sacharidy. Pro zamezení chybnému vyhodnocení falešně pozitivního výsledku, tedy nespecifické vazby protein-protein, bylo potřeba vytvořit kontrolu: nejprve byl lektin inkubován s kompetitivním inhibítorem (neznačeným sacharidem) a až poté byl roztok aplikován na zkoumaný vzorek.

Podle toho, který monosacharid je specificky vázán, dělíme lektiny do pěti skupin na lektiny s afinitou k D-manóze, L-fukóze, D-galaktóze/N-acetyl-D-galaktosaminu, kyselině sialové a N-acetyl-D-glukosaminu. Vybrali jsme pro naše pokusy lektiny tak, aby zastupovaly vazbu na široké spektrum sacharidů.

### 2.5.1 Zpracování tkáně a příprava vzorků

Tkáň byla zpracována stejně, jak je uvedeno v kapitole 2.3.1.

### 2.5.2 Značení lektiny

Značení bylo prováděno celou dobu ve vlhké komůrce, aby se zamezilo vyschnutí vzorku. To by mohlo způsobit nespecifické vazby lektinů na pozadí. Vybrané lektiny byly ředěny v PBS na výslednou koncentraci 10 µg/ml. Jako kontroly posloužily vzorky, u kterých byly aplikovány lektiny s již navázaným sacharidem: k roztoku lektinu byl přidán kompetitivní inhibítor, tedy sacharidový motiv, na který se lektin specificky váže, a to na 30 minut v 4 °C a až poté byla s tímto roztokem inkubována sledovaná tkáň.

Použité lektiny a jejich kompetitivní inhibitory jsou popsány v tabulce (Tab. 6). Z uvedených lektinů byla provedena kontrola jen u třech vybraných, které vykazovaly zajímavý signál na řezech kachní nosní sliznicí.

#### 2.5.2.1 Postup značení lektiny

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| 1. Promytí PBS                          | 3x5 minut                         |
| 2. Blokování 1% BSA v PBS               | 30 minut                          |
| 3. Inkubace:                            | přes noc v 4 °C nebo 1 hodinu R/T |
| 3.1. s lektinem v PBS                   |                                   |
| 3.2. s lektinem s navázaným inhibítorem | v PBS                             |
| 4. Promytí PBS                          | 3x5 minut                         |
| 5. Montování – Vectashield s DAPI       | cca 30 minut                      |

Tab. 6: Seznam použitých lektinů (VECTOR LABS) s jejich inhibitory.

Lektin (zdroj); koncentrace	Zkratka	Kód výrobce	Inhibitor	Použití
<b>Lektiny se specifitou k Man a Glc</b>				
Concanavalin A ( <i>Canavalia ensiformis</i> ); 25 mg/ml	ConA	FL-1001	MetMan/MetGlc	kNS
Pisum sativum agglutinin ( <i>Pisum sativum</i> ); 5 mg/ml	PSA	FL-1051	MetMan/MetGlc	kNS
<b>Lektiny se specifitou ke Gal a GalNAc</b>				
Peanut agglutinin ( <i>Arachis hypogaea</i> ); 5 mg/ml	PNA	FL-1071	Gal	kNS, K
Soybean agglutinin ( <i>Glycine max</i> ); 2 mg/ml	SBA	FL-1011	GalNAc	kNS
Ricinus communis agglutinin ( <i>Ricinus communis</i> ); 5 mg/ml	RCA I	FL-1081	Gal, Lac	kNS, K, S, FB
<b>Lektiny se specifitou k Fuc</b>				
Ulex europeaeus agglutinin ( <i>Ulex europeaeus</i> ); 2 mg/ml	UEA I	FL-1061	Fuc	kNS
Lotus tetragonobolus agglutinin ( <i>Lotus tetragonobolus</i> ); 2 mg/ml	LTL	FL-1321	Fuc	kNS, K, S, FB
<b>Lektiny se specifitou k GlcNAc</b>				
Wheat germ agglutinin ( <i>Triticum vulgare</i> ); 5 mg/ml	WGA	FL-1021	oligo GlcNAc	kNS

Lektiny byly ředěny na koncentraci 10 µg/ml v PBS. Kontrola s kompetitivním inhibitem byla provedena jen u žlutě zvýrazněných lektinů (použitý inhibitor zvýrazněn tučně).

Zkratky použití: kNS – kryožez nosní sliznicí; K – krevní roztěr; S – slezina (otisk i kryožez); FB – otisk Fabriciovy burzy.

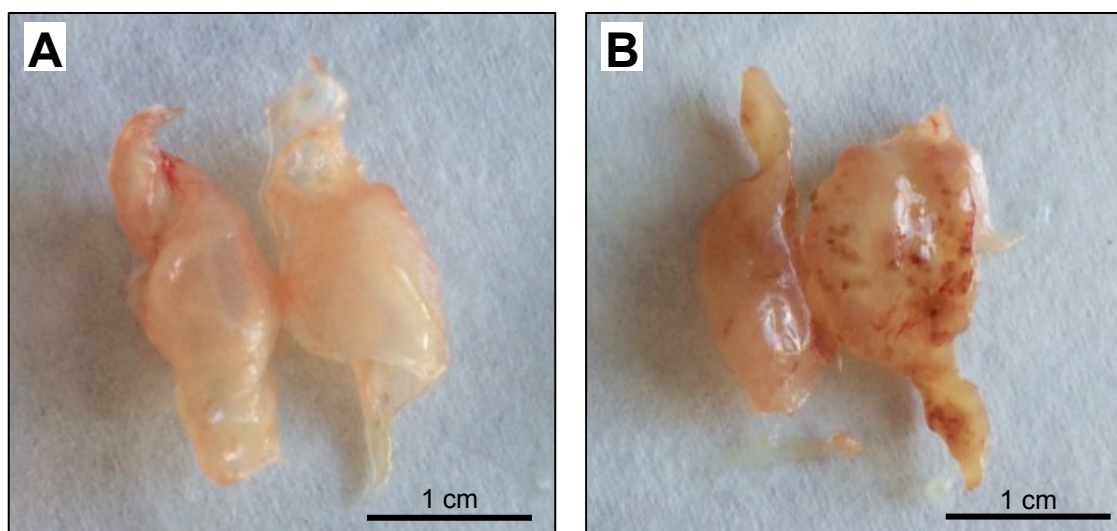
Zkratky sacharidů: Fuc – L-fukóza; Gal – D-galaktóza; GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin; Glc – D-glukóza; GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin; Lac – α-laktóza; Man – D-manóza; MetMan – α-D-metylmanopyranosid; MetGlc – α-D-methylglukopyranosid; NeuNAc – kyselina N-acetylneuraminová.

Zdroj: [www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com).

## 3 VÝSLEDKY PRÁCE

### 3.1 Makroskopické zhodnocení tkáně

Nakažené i kontrolní nenakažené kachny byly v určených intervalech usmrcovány dekapitací a z nosní dutiny byly vyjmuty obě nosní skořepky. Již při makroskopickém zhodnocení byly patrné rozdíly mezi zdravou a infikovanou tkání. Skořepky zdravé kachny byly růžové, s tenkou vrstvou pojivové tkáně kolem chrupavky (Obr. 6 A). Skořepky kachny nakažené *T. regenti* obsahovaly četné starší i novější krevní sraženiny (petechie), patrný byl otok a tvorba většího množství hlenu (Obr. 6 B). Většina vyjmutých skořep měla na délku v průměru kolem 2 cm, se stářím zvířete rostla i velikost skořepky. Ve třech případech došlo k ochrnutí nakažené kachny a jejímu předčasnému usmrcení (14., 15. a 20. dpi). U těchto kachen byly nosní skořepky výrazně menší než skořepky kachen odpovídajícího věku, u kterých k ochrnutí nedošlo. Tato pozorování nejsou doložena měřeními.



Obr. 6: Porovnání nosních skořep zdravé kachny a kachny infikované *T. regenti* (22. dpi). V obou případech se jedná o kachny staré 29 dní: (A) zdravá kachna; (B) kachna nakažená *T. regenti* 22. dpi.

### 3.2 Histologické zhodnocení tkáně

K histologickému hodnocení tkáně nosní sliznice byly využity následující počty kachen nakažených *T. regenti* a usmrcených po určitém počtu dnů po infekci (dpi): 1 kachna 14. dpi, 2 kachny 16. dpi, 4 kachny 22. dpi a 2 kachny 26. dpi.

Nejdříve bylo potřeba nalézt vhodný způsob fixace tkáně. Fixace 4% formaldehydem byla nevhodná, neboť při krájení docházelo k praskání a drobení vzorků. Rovněž nevhodná byla fixace Bouinovým roztokem, kdy u takto fixovaných vzorků docházelo k rozpadu tkáně v oblasti krevních sraženin, což bylo zejména v okolí vajíček nežádoucí. Fixází volby se nakonec stala modifikovaná Davidsonova fixáž. Fixované vzorky působily na řezu kompaktním

dojmem. Vzorky byly zalévány do parafínu. Při krájení na mikrotomu bylo dosahováno lepších výsledků při použití vzorků, které byly chlazené cca 1 hodinu v -20 °C, a nástrojů odkládaných na led, a to zejména v letních měsících.

Před barvením bylo třeba řezy na sklíčkách odparafinovat a zavodnit pomocí sestupné alkoholové řady. V dřívějších pokusech jsme řezy umístili do všech kroků alkoholové řady na 5 minut, v pozdějších jsme přešli ke kratším krokům čítajícím pouze 2 minuty, které byly dostačující.

### 3.2.1 Použitá histologická barvení

Nejdříve byla zvolena barvení, která byla vhodná pro pozorování infikovaných tkání.

Pomocí barvení **hematoxylinem a eosinem** bylo možné popsat naprostou většinu tkání a buněk a toto barvení bylo vhodné i ke sledování změn v průběhu infekce. Hematoxylin obarvil fialově jádra buněk i fragmenty jader. Eosin je výrazně růžový a ve tkáni nosní sliznice značil s různou intenzitou cytoplasmu buněk, amorfni hmotu hustého i řídkého kolagenního vaziva, svalovinu cév protínajících tkáň i svalovinu stadií parazita: dospělců a vyvíjejících se miracidii a apikální žlázy miracidii (např. Obr. 10). K označení hůře identifikovatelných buněk a tkání jsme využili další barvení.

Pomocí **Massonových trichromů I a II** byla modře zvýrazněna kolagenní vlákna, která u zdravé tkáně tvořila řídké a husté vazivo a obsahovaly je stěny cév (Obr. 7 B, C). U parazitované tkáně pak docházelo k výrazným změnám ve výskytu těchto vláken (např. Obr. 11), které budou popsány níže. Dále byly modře zbarveny hlavně mucinózní žlázy nosní sliznice hostitele, u parazita pak žlázy miracidia (tmavší byla apikální žláza a světlejší penetrační žlázy) a svalovina dospělce a miracidia. Také toto barvení je pro sledování a srovnávání fází infekce vhodné a doplňuje poznatky získané barvením hematoxylinem a eosinem.

**Toluidinová a alcianová modř** označily ve tkáni žírné buňky, z těchto dvou barvení jsme pro další pokusy zvolili toluidinovou modř (Obr. 7 D, Obr. 9 C). Buňky ve zřejmě stejném zastoupení byly patrné i při barvení **Diff Quickem** (Obr. 8 A). Pro žírné buňky je typická metachromasie, tedy že se po obarvení toluidinovou modří zbarví odlišně od okolní tkáně, v tomto případě byly žírné buňky fialové a okolní tkáň zůstala modrá (např. Obr. 7 D). Barvení toluidinovou modří je vhodné pro detekci žírných buněk. Diff Quick obarvil v některých případech fialově jádra i granula v cytoplasmě, v některých jádra modře a granula v cytoplasmu fialově. V jednom případě byl zachycen i materiál neznámého původu, a to u barvení Diff Quickem (Obr. 13 B, zvětšeno ve výřezu) viz níže.

Při použití barvení **Ziehl-Neelsen** došlo v některých případech k výraznějšímu zbarvení skořápek vajíček (Obr. 13 A). V tkáni nebyly pozorovány žádné další výrazně odlišné struktury.



Toto barvení je pro sledování jakýchkoliv změn či jevů v infikované tkáni nevhodné a nebylo již dále používáno.

Metoda **PAS** ukázala na přítomnost polysacharidů, přičemž jejich zastoupení se u vyvíjejícího miracidia ve vajíčku měnilo. Vyvíjející se a vyvinutá miracidia měla některé struktury výrazně PAS pozitivní (Obr. 13 C). V některých oblastech byl nalezen nenabarvený zlatavý materiál (Obr. 13 D). Nacházel se v pojivové tkáni v oblasti spolu s vajíčky, ale zachycen byl i v cévě.

K vizualizaci elastických vláken byl použit **orcein**, který obarvil vlákna koncentrovaná zejména v perichondriu a stěnách artérií; další, již méně výrazná vlákna pak prostupovala také stěnami žilního systému a řídkým kolagenním vazivem. Původně byly v průběhu infekce pozorovány jen nevýrazné změny v tkáni, ale v některých případech se elastická vlákna nacházela kolem snůšky vajíček, ale nikoli uvnitř (Obr. 13 E).

Hnědý pigment v nosní sliznici nebyl **pruskou modří** obarven. Kontrolní vzorek myší sleziny obsahoval modře obarvená granula.

Posledním z použitých barvení byla **Giemsa**. Ji obarvené vzorky však byly natolik nekонтastní, že nebyla dále používána.

Pro sledování jednotlivých fází infekce byla zvolena barvení, která přinášela dobře definovatelné výsledky a bylo díky nim možné pozorovat případné změny v přítomnosti infiltrovaných buněk a reparaci tkáni po působení parazita. Zvolenými barveními jsou: hematoxylin a eosin, Massonovy trichromy a toluidinová modř.

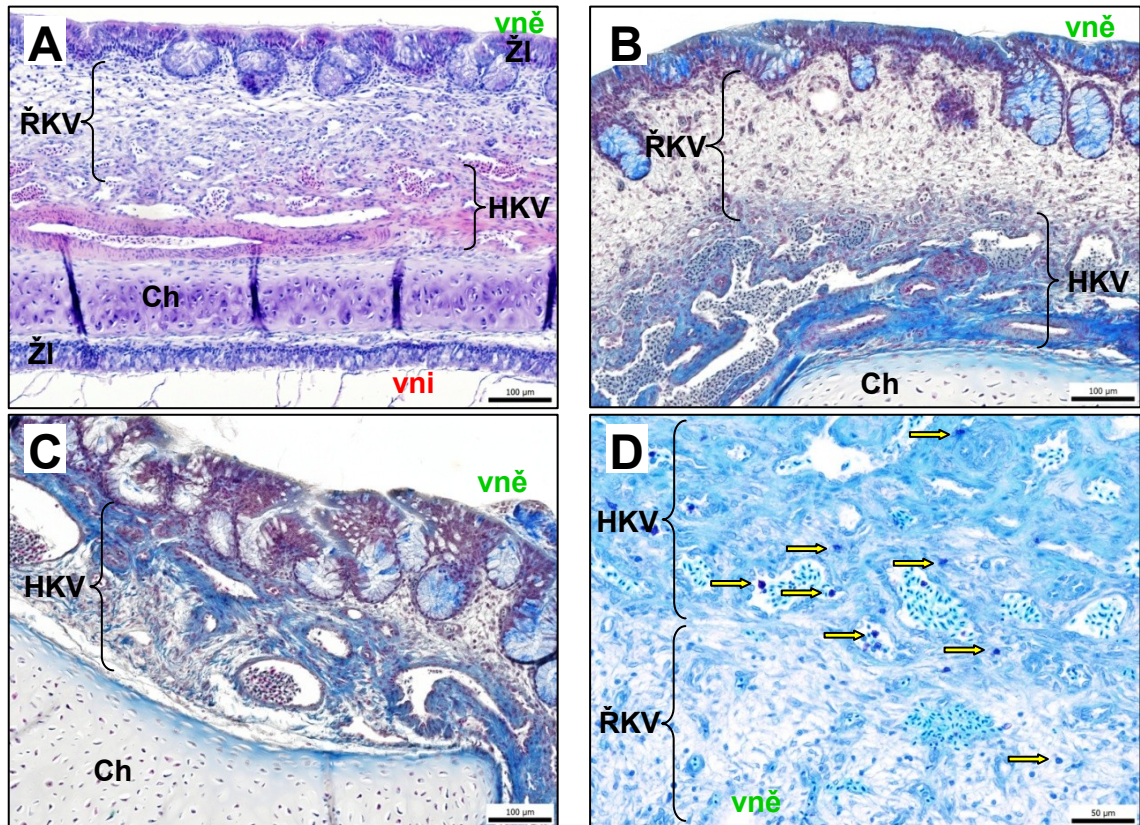
### **3.2.2 Průběh zánětu v přítomnosti parazita**

Z obou bočních stěn dutiny nosní odstupují nosní skořepky (viz Obr. 4 A, str. 19). Nosní skořepa je slizniční výchlípka podepřená chrupavkou, která byla využita k histologickým barvením.

#### **3.2.2.1 Histologický popis nosní sliznice zdravé kachny**

Na histologických preparátech (Obr. 7) byla patrná centrální hyalinní chrupavka s perichondriem, na které navazovalo kolagenní vazivo s převládající amorfni hmotou (*lamina propria*). Blíže chrupavce byla vrstva hustého kolagenního vaziva, kterou protkávaly artérie a zejména pak tenkostěnná venózní pleteň tvořící rozšířené cisterny. Tato oblast bohatá na kolagenní vlákna byla při barvení hematoxylinem a eosinem výrazně eozinofilní (díky přítomnosti svaloviny ve stěnách cév) a Massonovy trichromy ji barvily modře (díky přítomnosti kolagenů ve stěnách cév). Blíže povrchu bylo pozorováno řídké kolagenní vazivo obsahující klasické zastoupení buněk, ze kterých bylo možné rozlišit fixní fibroblasty/fibrocyty a druhotně vcestované, tzv. bloudivé krevní buňky: makrofágy, plasmatické buňky, žírné buňky (ty byly ale častější v hustém vazivu a lumenu žil; Obr. 7 D), lymfocyty, granulocyty, a dále v krevních kapilárách byly patrné jaderné erytrocyty. Povrch pokrýval víceřadý cylindrický

epitel s řasinkami (*lamina epithelialis*), v některých místech jsou patrné pohárkové buňky a časté jsou zanořené mucinózní žlázy s krátkým vývodem, jejichž buňky mají cylindrický tvar a jádro blíže bazální membráně.



Obr. 7: Zdravá nosní sliznice kachny domácí. (A) Hematoxylin eosin; (B, C) Massonův trichrom II; (D) Toluidinová modř.

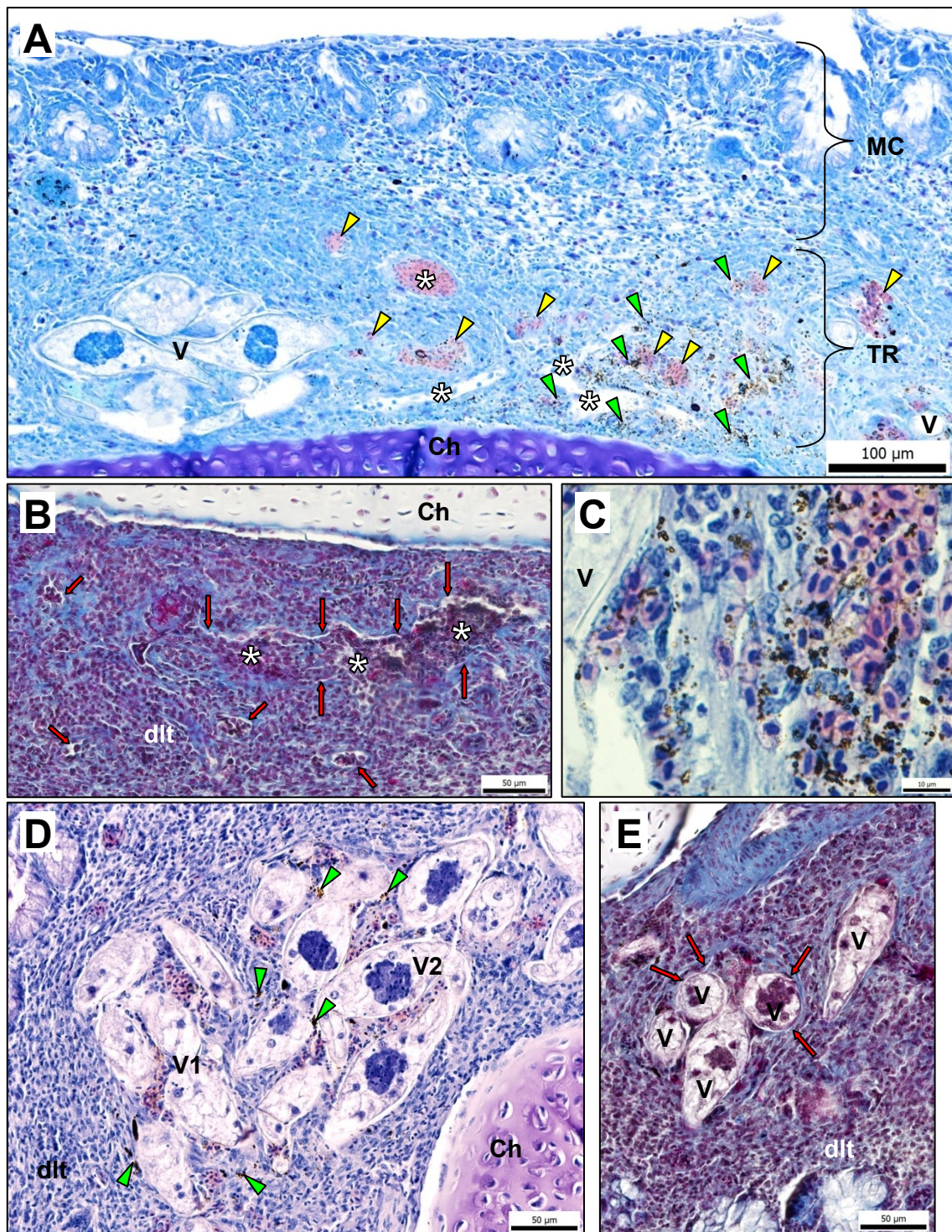
HKV – oblast hustého kolagenního vaziva a cév: artérií a venózních pletení; Ch – chrupavka; ŘKV – řídké kolagenní vazivo; ŽI – mucinózní žlázy; **vně** – vnější strana skořepy; **vni** – vnitřní strana skořepy;

→ – žírné buňky.

### 3.2.2.2 Histologický popis infikované nosní sliznice 14. dpi *T. regenti*

Již na vzorcích nosní sliznice infikované kachny usmrcené 14. dpi bylo možné pozorovat dospělé červy a nakladená vajíčka. Vajíčka byla ve dvou stupních vývoje: v 1. stupni byly patrné pouze vitelinní buňky a případně zygota, ve 2. stupni již bylo možné rozeznat rýhující se embryo. V obou případech tvořily vitelinní buňky stále jednotlivé buňky a byly v těsném kontaktu s vnitřním povrchem skořápky (Obr. 8 D). V oblasti kolem nakladených vajíček se často nacházel hnědý pigment, s velkou pravděpodobností se jedná o produkt po trávení krve (Obr. 8 C).

Oblast, kterou ve zdravé tkáni vyplňuje venózní pleteň, již prakticky nebyla patrná, v některých oblastech bylo možné pozorovat stěny cév s poškozeným a přerušovaným endotelem, jejichž lumen vyplňovala velká množství zánětlivých buněk a od okolní tkáně ji bylo možné rozlišit jen díky absenci mezibuněčné hmoty (Obr. 8 B). Samotná tkáň byla infiltrovaná lymfocyty a makrofágy, zato obsahovala jen velmi málo granulocytů (Obr. 8 D). Dospělci i vajíčka se nacházeli ve stejné oblasti tkáně – v oblasti kolagenního vaziva blíže chrupavce v místech původní venózní pleteně. Kolem některých snůšek byla patrná organizovaná kolagenní vlákna se zbytky endotelu (patrné buňky se zploštělými jádry), která poukazují na možný pozůstatek cévy (Obr. 8 E). Žírné buňky nebyly pozorovány kolem vajíček ani dospělců, ale jejich počty se viditelně zvýšily a vyplňovaly zejména oblast mezi mucinózními žlázkami blíže povrchu (Obr. 8 A).

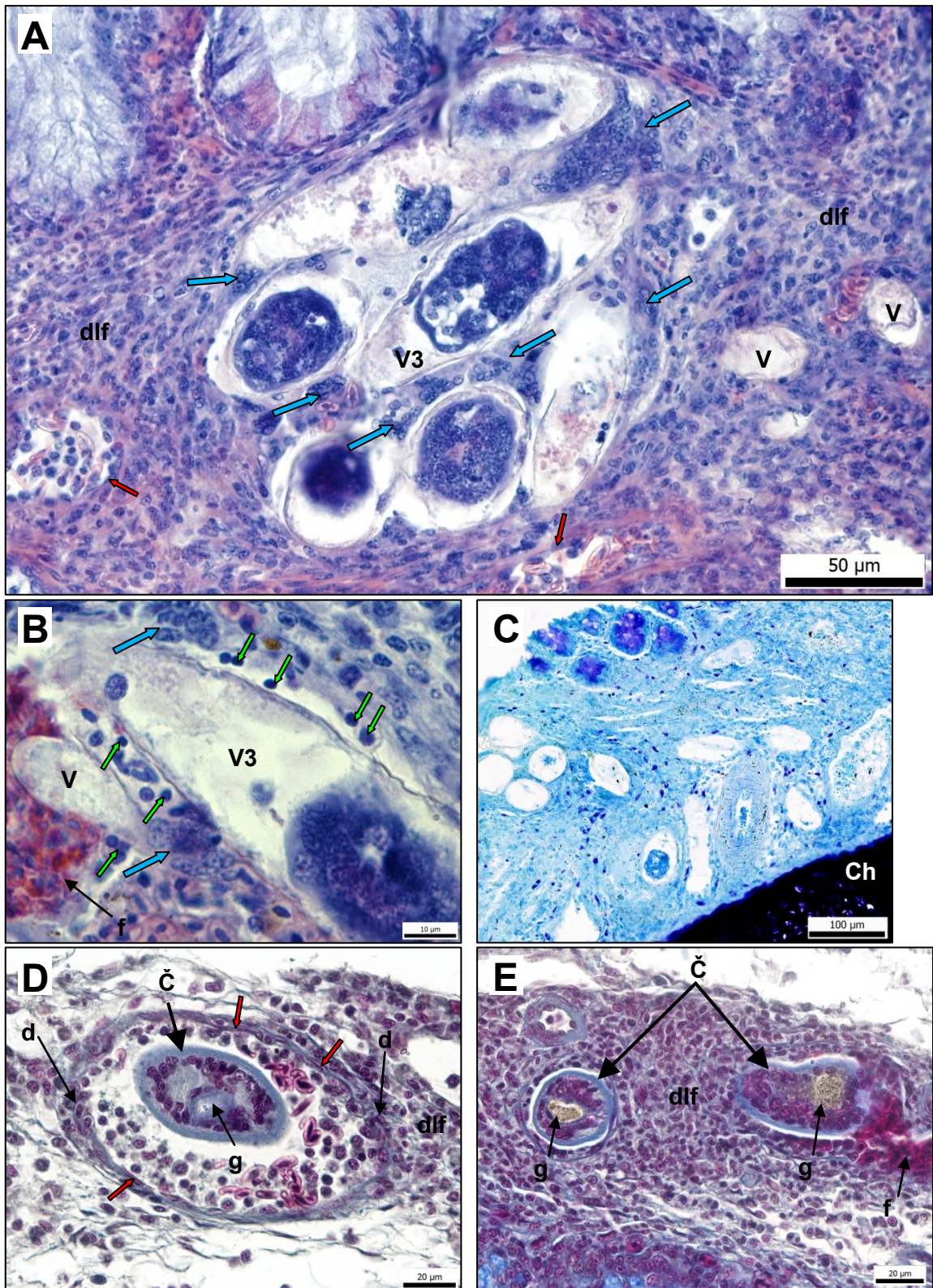


Obr. 8: Řezy nosní sliznicí kachny nakažené *T. regenti*, 14. dpi. (A) Diff Quick. Oblast po migraci dospělého červa obsahuje nakladená vajíčka, krevní sraženiny a hemozoinem. Oblast mezi mucinózními žlázami obsahuje fialově zbarvené žírné buňky. (B) Massonův trichrom II. Céva poškozená při migraci dospělého červa. (C) Hematoxylin eosin. Hemozoin ve tkáni okolo vajíček. (D) Hematoxylin eosin. Vajíčka nakladená v tkáni. (E) Massonův trichrom II. Vajíčka nakladená v cévě.

Ch – chrupavka; MC – oblast obsahující zvýšené množství žírných buněk (mastocytů); TR – oblast výskytu stadií *T. regenti*; V – vajíčka či snůšky vajíček; ▶ – krev ve tkáni; ▶ – hemozoin; ▶ – stěna cévy s endotelem; \* – lumen cévy; V1 – vajíčko vývojového stupně 1; V2 – vajíčko vývojového stupně 2; dlt – difúzní lymfatická tkáň

### 3.2.2.3 Histologický popis infikované nosní sliznice 16. dpi *T. regenti*

Ve vajíčkách, která byla obsažena v nosní sliznici infikovaných kachen usmrčených 16. dpi, byla patrná embrya budoucích miracidii v pokročilém stadiu vývoje a jádra vitelinních buněk, nikoli cytoplasmatické membrány. Začínala se tvořit podskořápková vrstva (tento vývojový stupeň vajíčka byl nazván stupněm 3). Malé množství miracidii již bylo plně či téměř plně vyvinuto (stupeň 4; popis viz kapitola 3.2.2.4). Kolem vajíček bylo možné nalézt nápadně kumulované větší buňky s jádry s patrným heterochromatinem. V některých místech zejména mezi vajíčky byly patrné velké shluky jader, která obklopovala celistvá hmota. Jedná se o tkáňové makrofágy (Obr. 9 A). Kolem některých vajíček byly pozorovány klidové lymfocyty s kompaktním jádrem (Obr. 9 B). Okolní tkáň byla stále infiltrovaná velkým množstvím buněk (v obrázku označeno jako „difúzní lymfatická tkáň“) zahrnujících zejména efektorové lymfocyty a makrofágy (Obr. 9 A). Stále však nebylo možné ve tkáni rozeznat nebo nalézt granulocyty. Dospělí červi se nacházeli intravaskulárně i extravaskulárně a nebyly na jejich povrchu pozorovány žádné těsně nasednuté buňky. Nicméně jak v tkáni, tak v cévě byly v okolí červa hojně zastoupené imunitní buňky ať už ve tkáni formou tkáňového infiltrátu, nebo v krevním řečišti. Střevo dospělého bylo často plné hnědého pigmentu. (Obr. 9 D, E). Ve tkáni mezi vaječnými snůškami se často nacházela hmota obsahující fragmenty, které se barvily hematoxylinem, tedy se jednalo zřejmě o jádra (Obr. 9B). V celé tkáni bylo možné pozorovat také oproti zdravé tkáni zvýšená množství žírných buněk (Obr. 9 C).

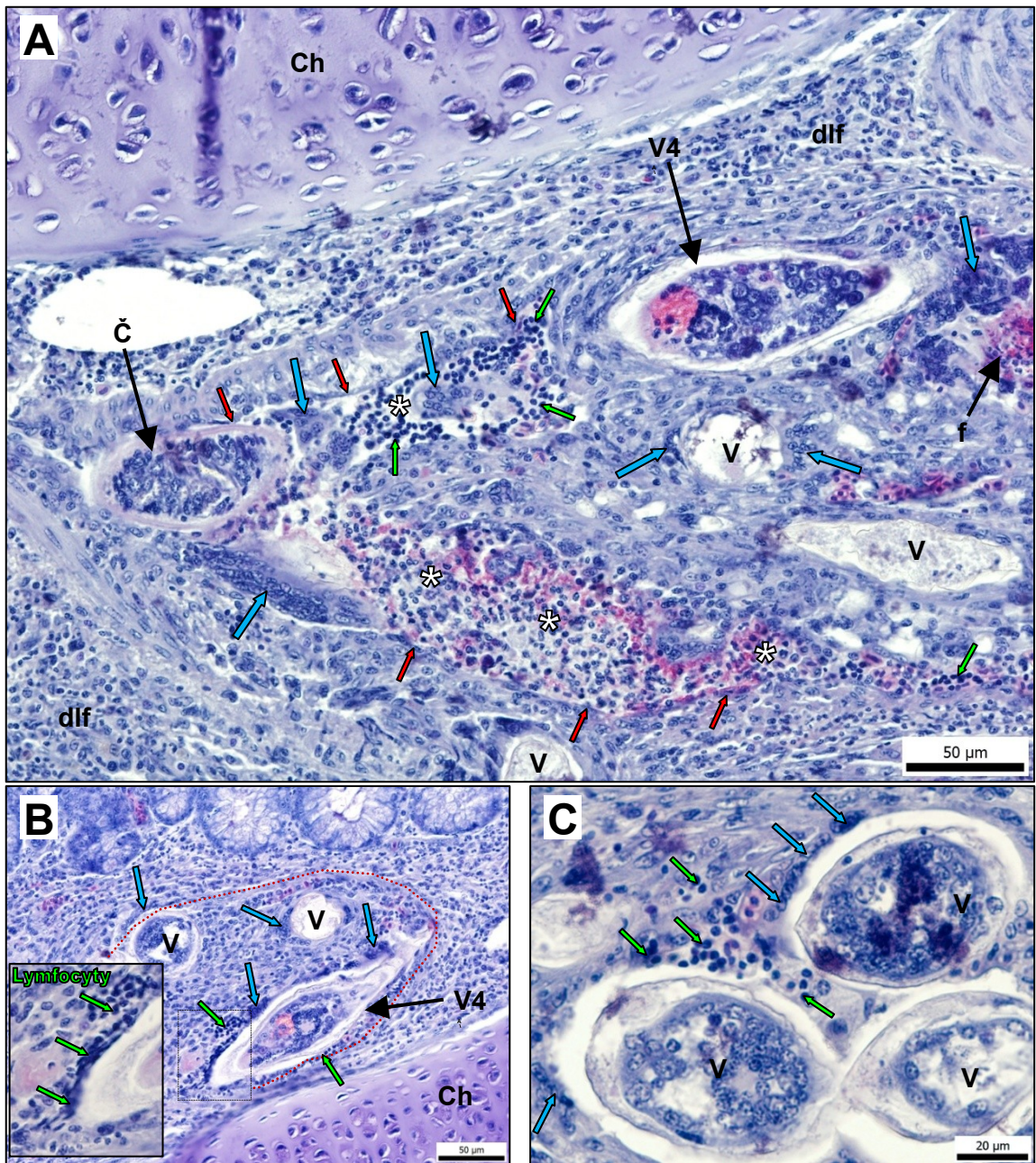


Obr. 9: Řezy nosní sliznicí kachny nakažené *T. regenti*, 16. dpi. (A) Hematoxylin eosin. Vajíčka nakladená v tkáni a obklopená shluky makrofágů. (B) Hematoxylin eosin. Vajíčko ve tkáni obklopené makrofágy a klidovými lymfocyty. (C) Toluidinová modř. Infikovaná nosní sliznice s žírnými buňkami. (D, E) Massonův trichrom. Dospělý červ: v cévě s prázdným střevem (D) a ve tkáni se světle hnědým obsahem střeva (E).

Č – dospělec *T. regenti*; → (červená) – stěna cévy s endotelovými buňkami; → (zelená) – klidové lymfocyty; → (modrá) – makrofágy ve shlucích; Ch – chrupavka; V3 – vajíčko vývojového stupně 3; dlif – difúzní lymfatická tkáň; d – diapedéza; g – střevo; f – hmota s fragmenty jader.

#### 3.2.2.4 Histologický popis infikované nosní sliznice 22. dpi *T. regenti*

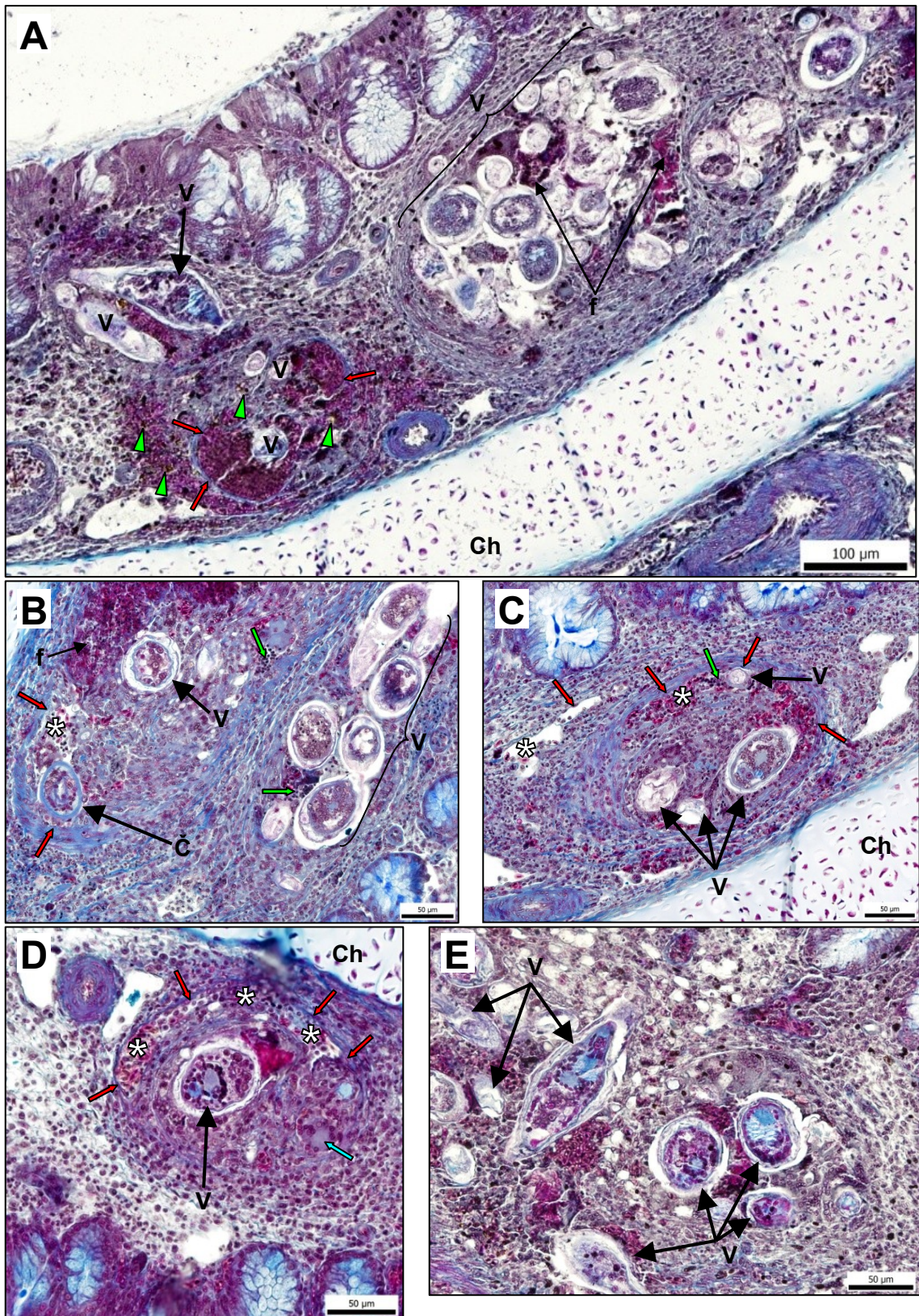
Ve vajíčkách, která byla nalezena v nosní sliznici infikovaných kachen usmrcených 22. dpi, se již hojně vyskytovala plně vyvinutá miracidia s těmito výraznějšími strukturami: terebratoriem, eozinofilními žlázami (apikální a penetrační), nervovým gangliem, germinálními buňkami a povrchem pokrytým řasinkami (stupeň 4). Bylo však možné nalézt vajíčka všech čtyř vývojových stupňů, jelikož v této vrcholné fázi infekce stále docházelo ke kladení nových vajíček. Dospělci se vyskytovali intravaskulárně i extravaskulárně, ale častěji byli pozorováni v lumenu cév. Kolem vajíček se stále nacházela velká množství těsně přisedlých buněk s velkými jádry, jedná se zřejmě o makrofágy ve stavu „epiteloidních buněk“. Častější než v předchozí fázi byly v blízkosti vajíček i klidové lymfocyty (Obr. 10 A–C). Zřídka byly pozorovány i obří vícejaderné buňky, tedy makrofágy s fúzovanými membránami tvořící tzv. Langhansovy buňky (Obr. 11 D). V cévách dominovaly lymfocyty a buňky monocyto-makrofágové řady. V cévách i ve tkáni již byly pozorovány i granulocyty, které se však neobjevovaly v blízkosti vajíček. Ve tkáni mezi vaječnými snůškami se často nacházela hmota obsahující objekty, které se barvily hematoxylinem, tedy jde zřejmě o malá jádra či fragmenty jader (Obr. 10 A). Tkáň stále obsahovala bohatou tzv. difúzní lymfatickou tkáň s lymfocyty, diferencovanými plasmatickými buňkami, makrofágy a dalšími krevními elementy včetně erytrocytů. Zastoupení žírných buněk se nezměnilo a nebyla pozorována degranulace. Kolem některých vajíček obklopených zánětlivým infiltrátem byla pozorována soustředná orientovaná kolagenní vlákna (Obr. 11 A, C, D). V některých případech bylo možné v okolí vajíček odlišit zbytky stěn cév podle přítomnosti buněk endotelu (Obr. 11 A–D). V ostatních případech se jednalo zřejmě o novotvary, tedy reparační tkáň oddělující parazita od tkáně. Přítomnost výraznějších kolagenních vláken byla zaznamenána v oblastech původních venózních pletení a hustého kolagenního vaziva. V případě, že se vajíčka nacházela v oblasti řídkého kolagenního vaziva, docházelo ve většině případů také k tvorbě soustředných orientovaných kolagenních vláken, bylo jich však méně a nebyly tudíž tak výrazné (Obr. 11 A, D, E). Vajíčka, infiltrované imunitní buňky a kolagenní vlákna spolu tvořily ohraničenou mikroskopickou zánětlivou jednotku neboli granulom (zejména Obr. 10 B, Obr. 11 A, C, D).



Obr. 10: Řezy nosní sliznic kachny nakažené *T. regenti*, 22. dpi. Hematoxylin a eosin. (A) Céva s poškozeným endotelem, v jejímž lumenu se vyskytuje dospělý červ a velké množství imunitních buněk. Vajíčka jsou obklopená makrofágy a extracelulární matrix. (B) Zánětlivý granulom s vajíčky, imunitními buňkami a kolagenními vlákny; na detailu jsou lymfocyty. (C) Vajíčka ve tkáni obklopená makrofágy („epiteloidní buňky“) a klidovými lymfocyty.

Č – dospělec *T. regenti*; V – vajíčka; V4 – vajíčko vývojového stupně 4; → – stěna cévy s endotelovými buňkami; → – klidové lymfocyty; → – makrofágy ve shlucích; ..... – okraj granulomu; \* – lumen cévy vyplněný imunitními buňkami; Ch – chrupavka; f – hmota s fragmenty jader; dlf – difúzní lymfatická tkáň.



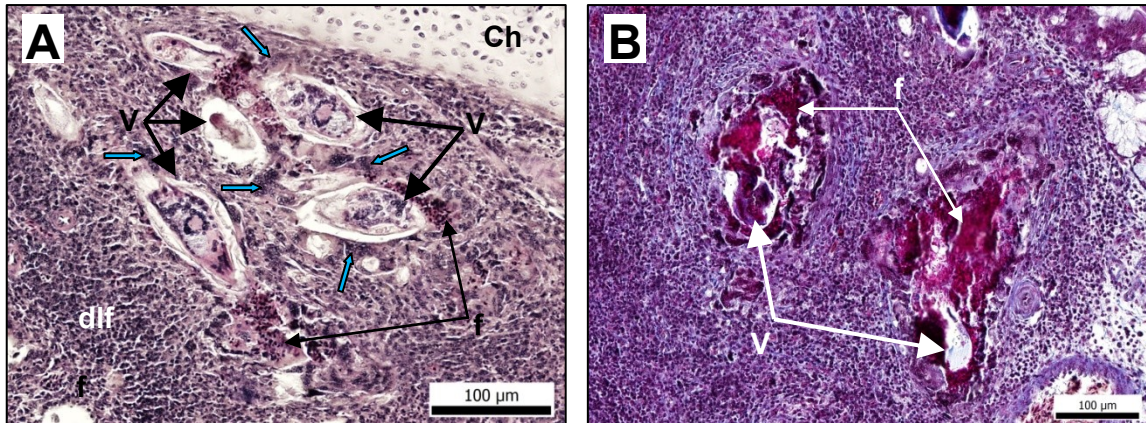


Obr. 11: Řezy nosní sliznicí kachny nakažené *T. regenti*, 22. dpi. Massonův trichrom. (A) Vajíčka ve tkáni a poškozené cévě. (B) Vajíčka ve tkáni a jedno vajíčko v poškozené a reparované oblasti; dospělý červ zachycen v lumenu cévy. (C, D) Vajíčka zřejmě v původním lumenu cévy obklopená makrofágy a kolageními vlákny. (E) Vajíčka ve tkáni.

Č – dospělec *T. regenti*; Ch – chrupavka; V – vajíčka; → – stěna cévy s endotelovými buňkami; → – lymfocyty; \* – lumen cévy vyplněné imunitními buňkami; → – hemozoin; → – obří vícejaderná buňka.

### 3.2.2.5 Histologický popis infikované nosní sliznice 26. dpi *T. regenti*

Nosní sliznice infikovaných kachen usmrčených 26. dpi se podobala předchozím fázím. Obsahovala vajíčka všech výše popsaných vývojových stupňů, ale převažovaly stupně 3 a 4. Stále však bylo možné nalézt i nové snůšky. Zastoupení imunitních buněk v tkáni bylo velmi podobné situaci z 22. dpi (Obr. 12 A). V některých případech byla vajíčka v přítomnosti hmoty s fragmenty jader pravděpodobně kalcifikovaná, jak usuzujeme podle podobných pozorování u vajíček lidských schistosom (Obr. 12 B). V tkáni byl v jednom případě nalezen dospělý červ.

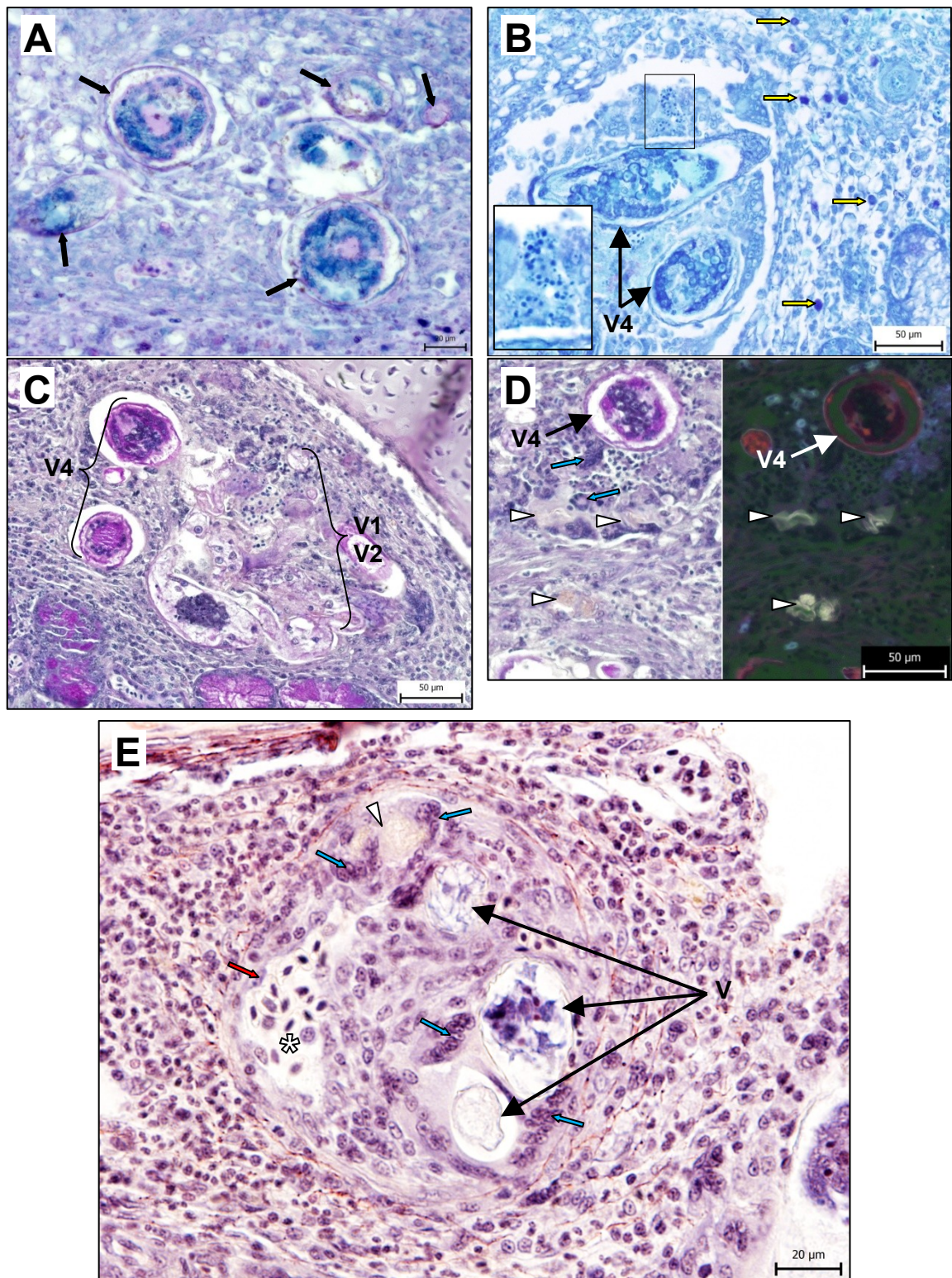


Obr. 12: Řezy nosní sliznicí kachny nakažené *T. regenti*, 26. dpi. (A) Hematoxylin eosin. Vajíčka ve tkáni se shlukly makrofágů a oblastmi s fragmenty či malými jádry. (B) Massonův trichrom II. Poškozená vajíčka ve tkáni.

Ch – chrupavka; V – vajíčka; ➡ – makrofágy; f – hmota s fragmenty jader.

### 3.2.2.6 Další pozorované jevy v infikované nosní sliznici kachen nakažených *T. regenti*

V případě použití PAS reakce, barvení Ziehl-Neelsenem a orceinem se jednalo pouze o prvotní pokusy, které byly prováděny na řezech nosní sliznicí kachen usmrčených 22. dpi *T. regenti*. V případě barvení Ziehl Neelsenem došlo v některých případech k výraznějšímu zbarvení skořápek některých vajíček (Obr. 13 A) oproti okolní tkáni, nicméně nebyla pozorována žádná souvislost s mírou vyvinutí miracidia, dobou infekce ani degradací okolní tkáně. V tkáni nebyly pozorovány žádné další výrazně odlišné struktury. V případě PAS reakce byla skořápka i vitelinní buňky mladších vajíček (stupně 1 a 2) jen slabě PAS pozitivní, zatímco u vajíček s vyvinutým miracidie (stupeň 4) bylo výrazně PAS+ několik struktur: podskořápková vrstva, svalovina miracidia a některé oblasti uvnitř miracidia přiléhající těsně pod svalovinu (Obr. 13 C, D). Růžová byla také kolagenní vlákna vaziva. V některých oblastech byl nalezen nenabarvený zlatavý materiál (Obr. 13 D, E), který byl také poměrně výrazně autofluorescenční. Nacházel se ve tkáni v oblasti spolu s vajíčky, ale zachycen byl i v cévě. U jednoho vzorku barveného Diff Quicem byl pozorován neznámý materiál z vnější strany skořápky vajíčka. Tento materiál neobsahoval jádra buněk a morfologicky připomínal váčky či apoptická tělíska. V okolí vajíček se opět nacházely shluky makrofágů. Při barvení orceinem bylo pozorováno, že v některých „granulomech“ se nenacházela elastická vlákna (Obr. 13 E).



Obr. 13: Výběr snímků z dalších histologických barvení, která nebyla použita k mapování infekce, 22. dpi. (A) Ziehl-Neelsen. Skořápky některých vajíček jsou růžové. (B) Diff Quick. Žírné buňky ve tkáni a v detailu materiál připomínající váčky či apoptická tělíska. (C, D) PAS. Barvený rozdíl mezi vývojovými stupni vajíčka a zlatavý materiál v tkáni, který je patrný i pod UV lampou. (E) Orcein, dobarveno Wiegertovým hematoxylinem. Hnědě obarvená elastická vlákna obklopují oblast s nakladenými vajíčky, patrný je endotel a lumen cévy a makrofágy kolem vajíček i nenabarveného zlatavého materiálu.

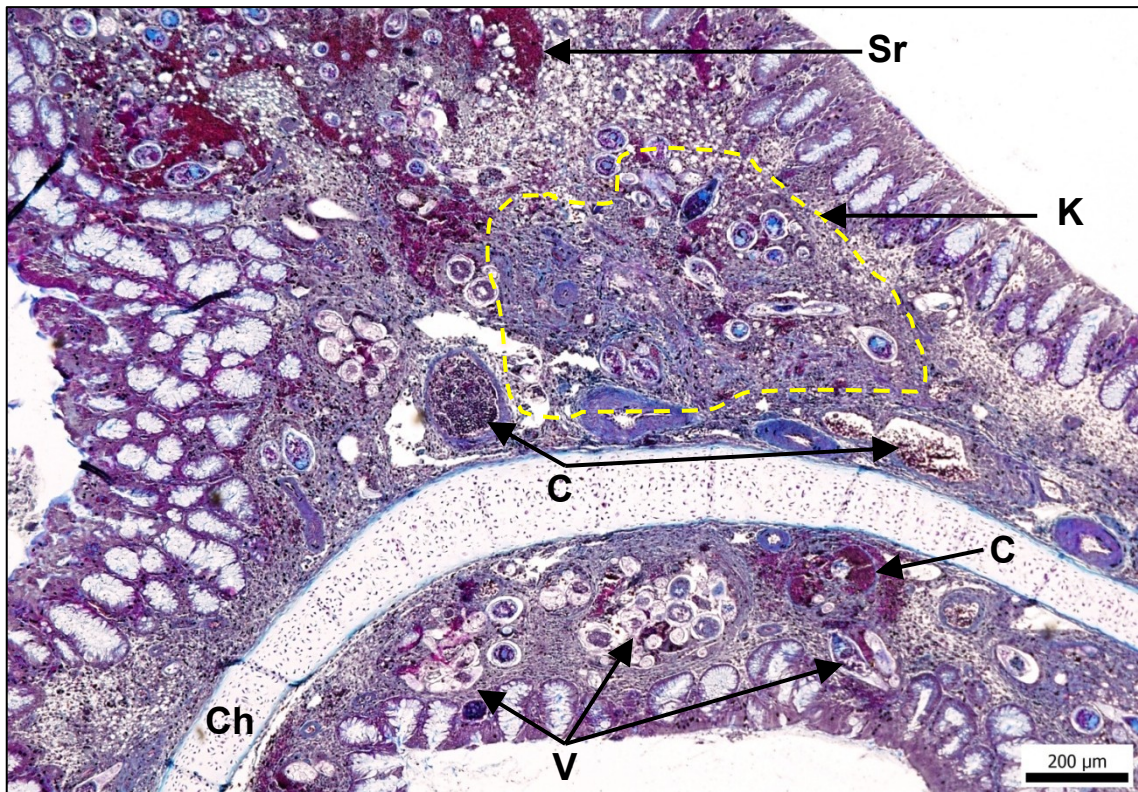
V – vajíčka; V1, V2, V4 – vajíčka vývojového stupně 1, 2 a 4; \* – lumen cévy s erythrocyty a imunitními buňkami; → – stěna cévy s endotelovými buňkami; → – skořápky; → – žírné buňky; ▷ – nenabarvený zlatavý materiál; → – makrofágy ve shlcích.

Celkově lze konstatovat, že pomocí histologických technik byly identifikovány některé buněčné typy a změny tkáně v průběhu infekce ptačí motolicí *T. regenti*. Dospělí červi a vajíčka všech vývojových stupňů byli pozorováni po celou dobu infekce od 14. do 26. dpi. Ke konci pozorovaného období byla některá vajíčka poškozená. Tkáň byla od prvního pozorovaného dne (14. dpi) infiltrovaná leukocyty, z nichž převažovaly lymfocyty a makrofágy. Právě makrofágy byly od 16. dpi pozorovány také v těsné blízkosti vajíček a vajíčka často obklopovaly. Žírné buňky byly ve tkáních také hojně zastoupeny, a to po celou dobu infekce, zato granulocyty byly zachyceny v menších množstvích až od 22. dpi. Kolem vajíček docházelo ke kumulaci infiltrovaných leukocytů a tvorbě kolagenních vláken. V případě některých orientovaných uskupení kolagenních vláken se jednalo o stěny cév, na jejichž vnitřním povrchu byla patrná jádra endotelových buněk. Endotel byl často poškozen a v některých místech byly v blízkosti stěn cév nakladená vajíčka, která byla v pozdějších fázích infekce (22. a 26. dpi) obklopená fibroblasty a mezibuněčnou hmotou obsahující orientovaná kolagenní vlákna. Přítomnost a četnost pozorovaných procesů je shrnuta v tabulce (Tab. 7) a celkový přehled všech jevů ve fázi infekce (22. dpi) možné vidět na přehledovém mikroskopickém obrázku při menším zvětšení (Obr. 14).

Tab. 7: Souhrn pozorování na histologických preparátech.

Pozorované jevy	Fáze infekce				
	Z	14. dpi	16. dpi	22. dpi	26. dpi
vajíčka v tkáni	x	+++	+++	+++	++
plně vyvinutá miracidia ve vajíčcích	x	-	+	+++	++
dospělci	x	++	+++	+++	+
poškozená vajíčka	x	-	-	+	++
poškozené cévy	-	+++	+++	+++	+++
hemozoin kolem vajíček	x	+++	+++	++	+
difúzní lymfatická tkáň	-	+++	+++	+++	+++
žírné buňky	+	+++	+++	+++	+++
makrofágy obklopující vajíčka	x	+	+++	+++	+++
kolagenní vlákna	+	++	++	+++	++

Míra výskytu jednotlivých pozorování je vyznačena znaménky: (+) nízký stupeň výskytu; (++) střední stupeň výskytu; (+++) maximální stupeň výskytu; (-) výskyt nepozorován; (x) výskyt nemohl být pozorován. Z – zdravá kachna; TR x dpi – x dní po infekci *T. regenti*.



Obr. 14: Řez nosní sliznicí kachny nakažené *T. regenti*, 22. dpi. Massonův trichrom II. Kolagenní vazivo vyplňovaly snůšky vajíček, časté byly krevní sraženiny. Lumen cév obsahoval velká množství imunitních buněk, které infiltrovaly napadenou tkáň. Kontrastní modrá zvýrazňuje kolagenní vlákna a velké žlázy miracidíí.

C – žíly; Ch – chrupavka; K – oblast se zvýšeným množstvím kolagenních vláken; Sr – krevní sraženiny, V – vajíčka; ----- – oblast s vyšším výskytem kolagenních vláken.

### 3.3 Imunohistochemické značení tkáně protilátkami

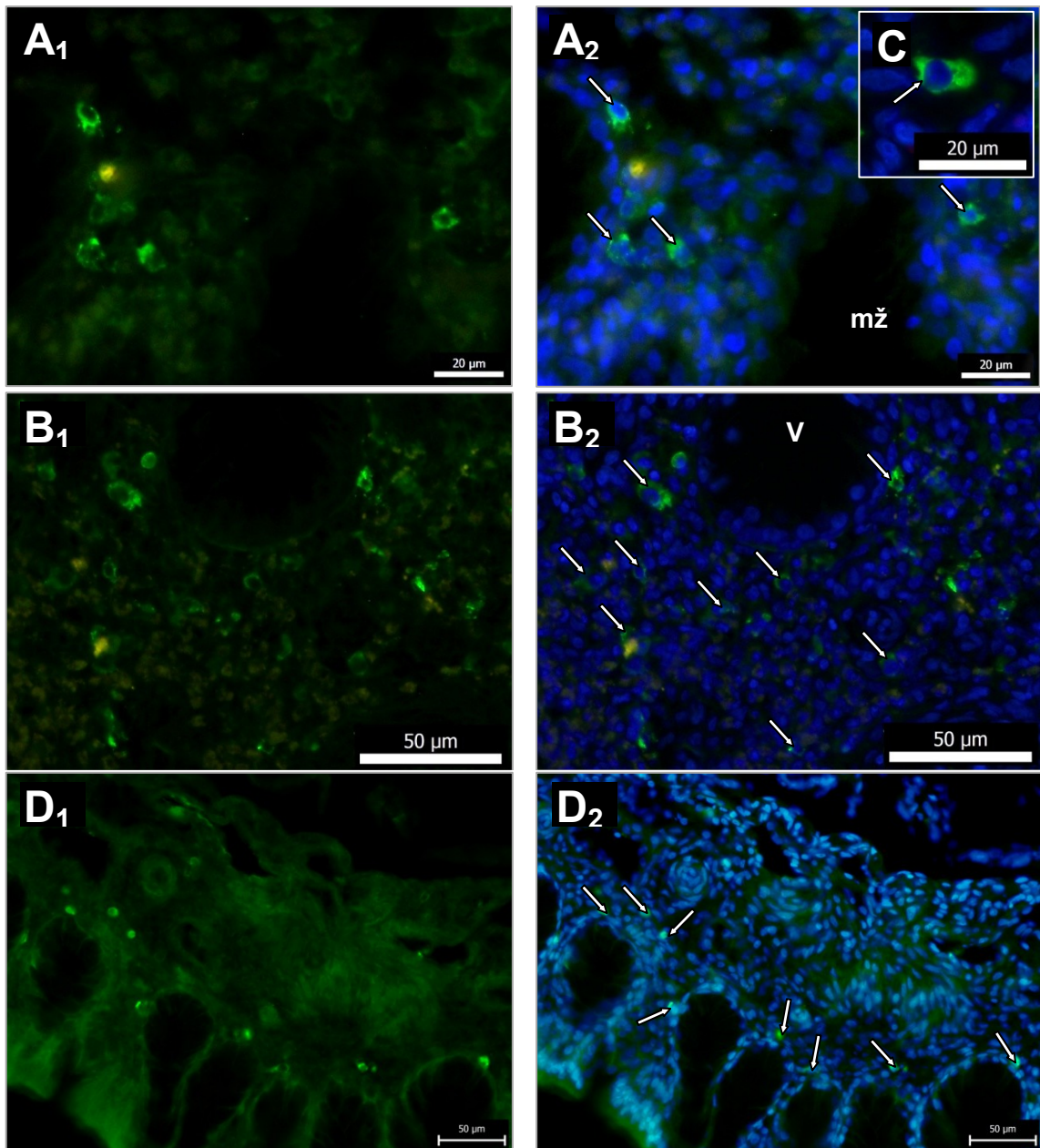
Pro účely imunohistochemického značení nosní sliznice byly využity následující počty kachen nakažených *T. regenti* a usmrcených po určitém počtu dnů po infekci (dpi): 1 kachna 14.dpi, 3 kachny 16. dpi, 3 kachny 22. dpi a 3 kachny 26. dpi. Zásadním kritériem pro to, aby byl pokus považován za úspěšný, bylo provedení negativní kontroly, kdy reakce vzorku obsahujícího pouze sekundární protilátku bez primární protilátky byla negativní. Dalším kritériem bylo opakované dosažení stejného výsledku.

#### 3.3.1 Použité protilátkové sondy

Prvním krokem bylo testování, zda jsou protilátky funkční. K tomu byly použity roztěry kuřecí a kachní krve, a v některých případech také otisky orgánů – kachní sleziny a Fabriciovy burzy. Po tomto kroku, který byl minimálně dvakrát opakován, byla naprostá většina protilátek vyřazena, neboť neprokázaly požadovanou vazebnou aktivitu. Zbývající protilátky byly použity na značení kryořezů nosní sliznice. U následujících protilátek byl na kryořezech zaznamenán pozitivní signál (Tab. 8). Pouze v případě dvou protilátek bylo dosaženo opakované reprodukovatelnosti a pozitivního výsledku bylo dosaženo minimálně třikrát. Výsledné fotografie z pokusů testujících protilátky jsou v této práci pro lepší přehled vždy ve dvou verzích. Obrázky s indexem 1 zobrazují pouze pozorovaný signál použité protilátky a obrázky s indexem 2 složený obraz se signálem použité protilátky a se signálem DAPI značícím jádra buněk.

##### 3.3.1.1 Průkaz CD4+ buněk na kryořezech

Pomocí protilátky specifické proti transmembránovému glykoproteinu CD4 na kachních T lymfocytech (BioRad, MCA2478) byly u kachen označeny buňky s jednoduchým jádrem ve slezině i ve sliznici. Tyto buňky se nacházely nejčastěji pod bazální membránou epitelu těsně pod povrchem sliznice. Nalezeny byly sporadicky u zdravých kachen (Obr. 15 D), kde měly s panožkami velikost až 13  $\mu\text{m}$  (Obr. 15 C), a ve větších počtech u kachen nakažených *T. regenti* (Obr. 15 A, B), u kterých byly velké cca 8 – 11  $\mu\text{m}$ . Nebyla pozorována žádná nápadná kumulace buněk kolem dospělých červů či vajíček. Ve všech případech bylo označeno i pozadí a nespecifický signál vyskytující se hlavně v oblasti kolagenních pojiv bránil v rozeznání případných dalších buněk v pojivu směrem blíže ke chrupavce. Proto jsou zde popsány pouze buňky nacházející se prakticky výhradně pod povrchem sliznice.



Obr. 15: Buňky s jednoduchým jádrem velké cca 8 – 11  $\mu\text{m}$  v nosní sliznici kachny, značeny protilátkou proti CD4 epitopu kachních T lymfocytů (BioRad, MAC2478). (A) 14. dpi; (B) 22. dpi; (C) příklad typické CD4+ označené buňky; (D) nosní sliznice ze zdravé kachny s CD4+ buňkami pod bazální membránou. Index 1 – značené CD4+ buňky; index 2 – značené CD4+ buňky a DAPI+ jádra buněk.

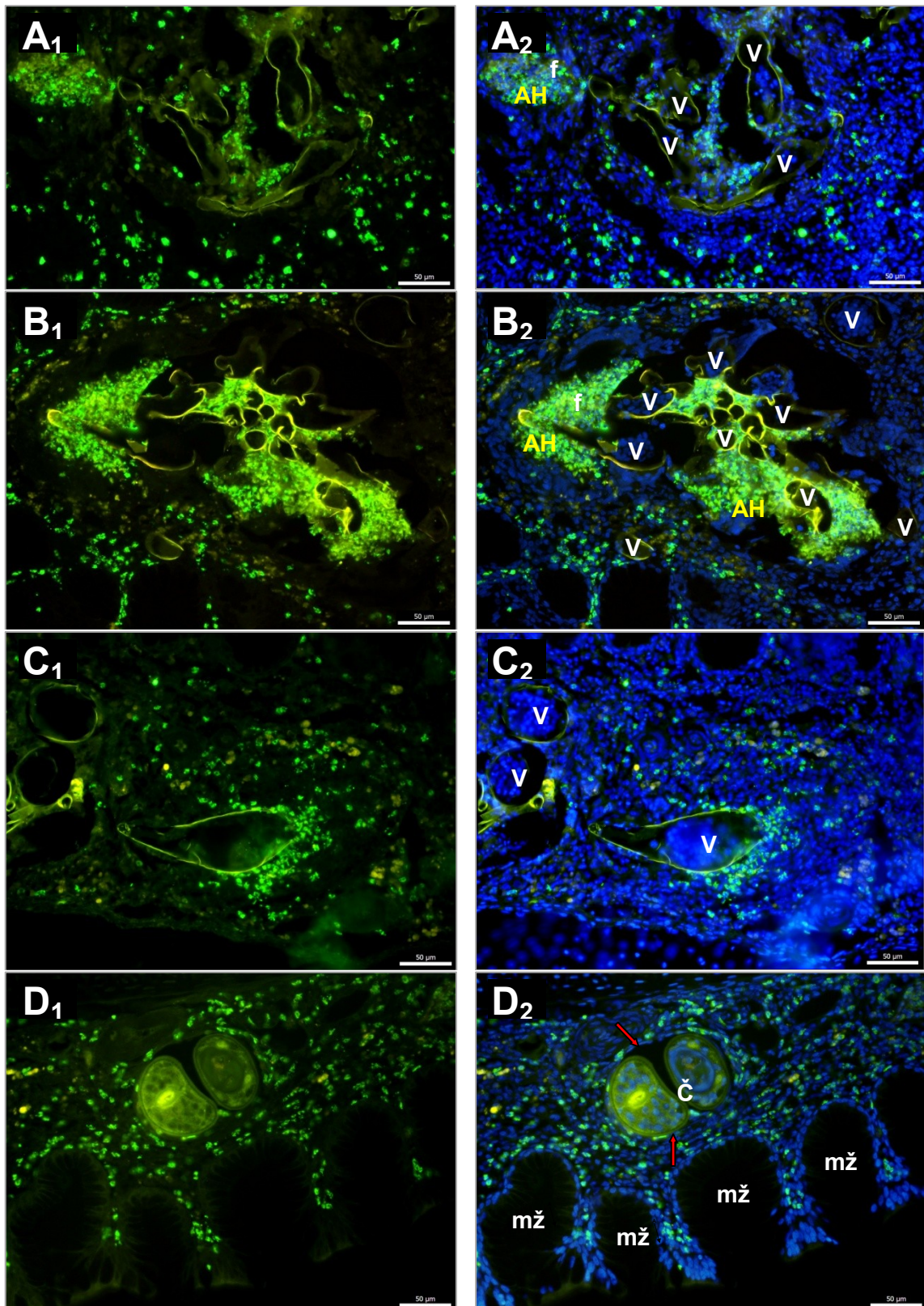
V – vajíčko; mž – mucinózní žlázky;  $\Rightarrow$  – CD4+ buňky; zelený signál – CD4+ buňky; modrý signál – DAPI+ jádra buněk.

### 3.3.1.2 Průkaz KUL01+ buněk na kryosezech

Pomocí protilátky proti kuřecím buňkám monocyto-makrofágového systému (Southern Biotech, 8420-02) byly ve slezině zachyceny kompaktní buňky v oblasti červené pulpy (Obr. 17 D). V nosní sliznici zdravé kachny byly KUL01+ buňky ojedinele přítomny v řídkém kolagenním pojivu v blízkosti mucinózních žlázek. Ve sliznici kachen nakažených *T. regenti* se nacházelo velké množství buněk o velikosti cca 10  $\mu\text{m}$ . U některých buněk byl pozorován kompaktní KUL01+ signál cytoplasmy, u většího množství buněk byla v cytoplasmě patrná samostatná KUL01+ granula. Tato granula se v pozdějších fázích infekce (22. a 26. dpi) vyskytovala i extracelulárně (Obr. 17 A, B). Jádra byla nejčastěji segmentovaná (Obr. 17 E). Jedná se o jedinou protilátku, pomocí které byly označeny i buňky či granulární materiál nacházející se v autofluorescenční hmotě (Obr. 16 A, B; Obr. 17 A–C) v těsné blízkosti nakladených vajíček.

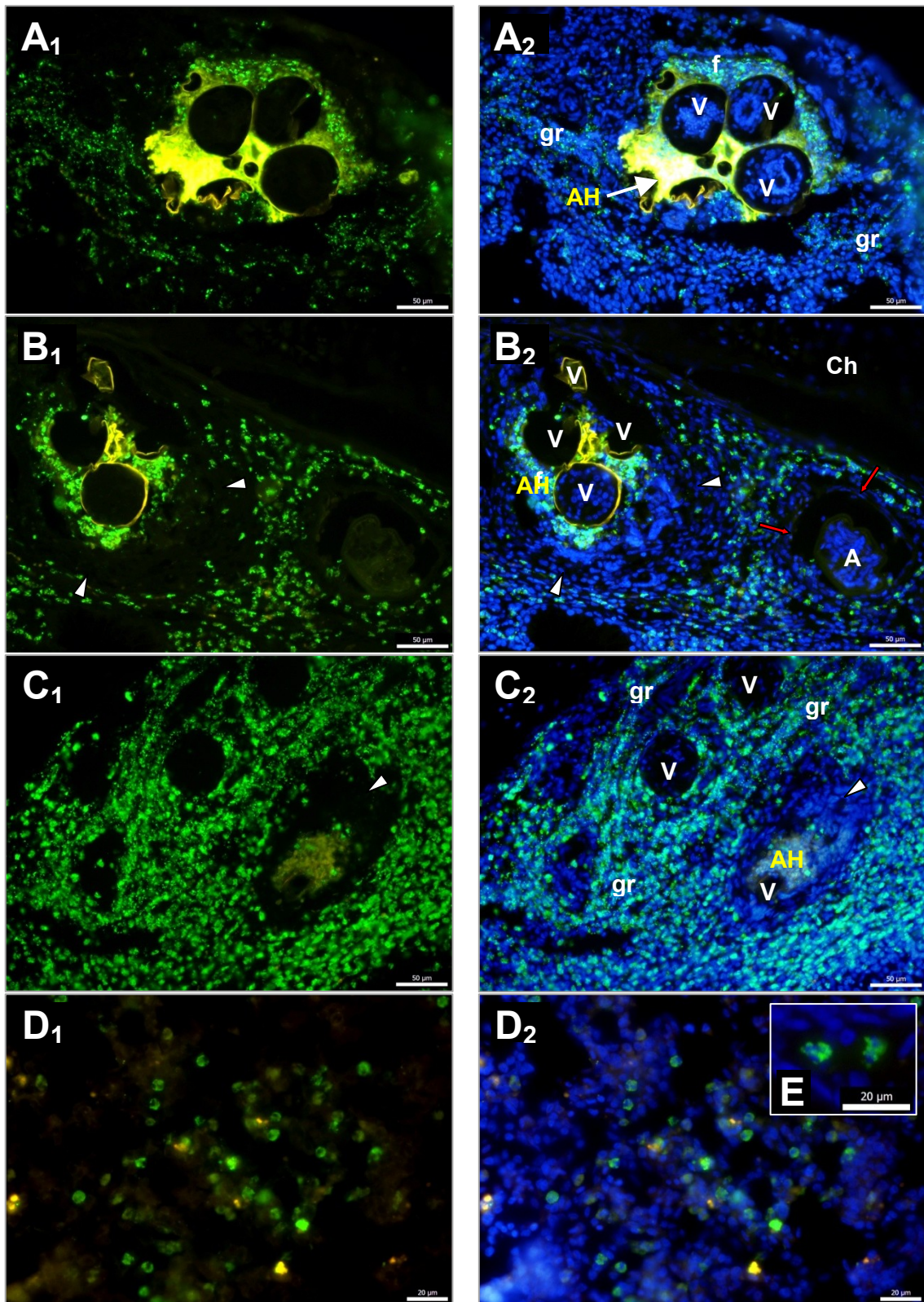
V nosní sliznici nakažené kachny byl zachycen masivní infiltrát KUL01+ buněk již od 14. dpi (Obr. 16 A, B). Snůšky vajíček byly často obklopené autofluorescenční hmotou, ve které bylo možné nalézt také KUL01 signál a malé DAPI+ útvary, tedy zřejmě jádra či fragmenty jader (Obr. 16 B). Ve vzorcích z nálezů 22. dpi (Obr. 16 C, D; Obr. 17 A, B) se u některých samostatných vajíček ve tkáni objevovaly nahlučené KUL01+ buňky (Obr. 16 C). U všech nálezů (a hlavně 22. a 26. dpi) pak byly pozorovány i menší samostatné KUL01+ útvary, velikostně odpovídající granulím z cytoplasmy ostatních buněk (Obr. 17 A, C). Masivní infiltrát KUL01+ buněk ve tkáni přetrvával po celou sledovanou dobu infekce. Kolem některých snůšek se vyskytoval „prstenec“ bez KUL01 signálu, ovšem obsahující DAPI signál buněčných jader (Obr. 17 B, C). Dospělí červi byli pozorováni intravaskulárně (Obr. 16 D; Obr. 17 B) i extravaskulárně (není doloženo obrázkem) a nebyl v jejich okolí zaznamenán nápadný KUL01 signál.





Obr. 16: Buňky se segmentovanými jádry o velikosti cca 10 µm v nosní sliznici kachny, značený protilátkou proti kuřecím Mo/MF (KUL01). (A, B) 14. dpi; (C, D) 22. dpi. Index 1 – značené KUL01+ buňky; index 2 – značené KUL01+ buňky a DAPI+ jádra buněk.

Č – dospělec *T. regenti*; AH – autofluorescenční hmota; V – vajíčka; zelený signál – KUL01+ buňky; modrý signál – DAPI+ jádra buněk; → – stěna cévy s endotelovými buňkami; f – hmota s KUL01+ oblastmi a s fragmenty jader; mž – mucinózní žlásky.



Obr. 17: Buňky se segmentovanými jádry o velikosti cca 10 µm v nosní sliznici kachny, značený protilátkou proti kuřecím Mo/MF (KUL01). U starších nákaz (22. a 26. dpi) pak byly pozorovány i menší KUL01+ útvary. (A, B) 22. dpi; (C) 26. dpi; (D) kachní slezina; (E) KUL01+ buňky se segmentovanými jádry. Index 1 – značené KUL01+ buňky; index 2 – značené KUL01+ buňky a DAPI+ jádra buněk s popisky.

A – dospělec *T. regenti*; AH – autofluorescenční hmota; gr – KUL01+ granula; ch – chrupavka; f – hmota s KUL01+ oblastmi a s fragmenty jader; V – vajíčka; zelený signál – KUL01+ buňky; modrý signál – DAPI+ jádra buněk; → – stěna cévy s endotelovými buňkami; ▷ – „prstenec“ bez KU01 signálu.

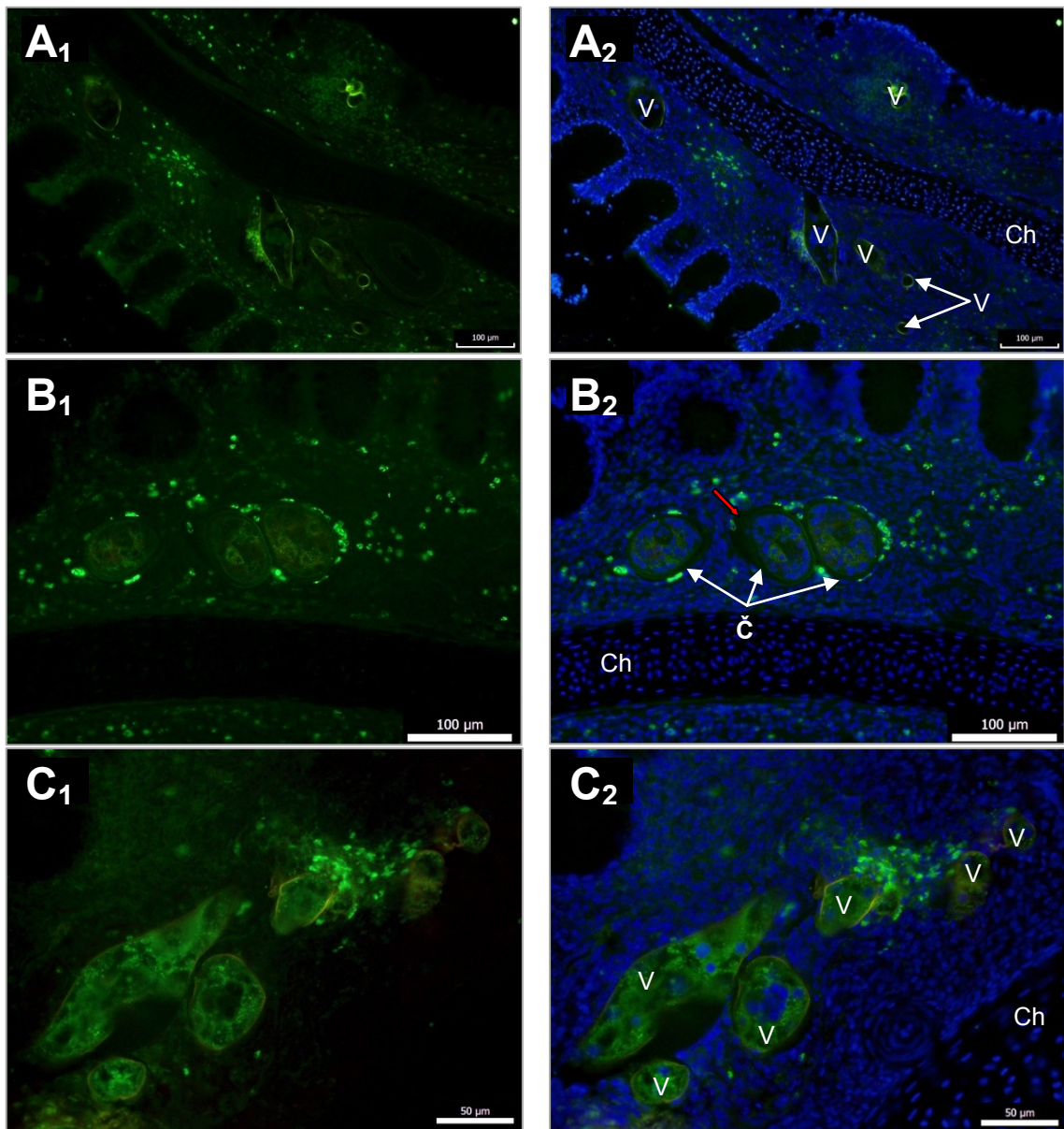
### 3.3.1.3 Další použité protilátky

U následujících protilátek nebylo splněno druhé kritérium, tedy nebylo možné reprodukovat úspěšné značení.

Při použití protilátky proti lidskému membránovému receptoru pro faktor aktivující B lymfocyty (BAFF-R; Santa Cruz Biotech, sc-365410) byly ve vzorcích tkáně zachyceny buňky se segmentovanými jádry a granuly v cytoplasmě. Počty pozitivních buněk byly nižší než u značení protilátkou KUL01, která značila vůbec nejširší spektrum buněk (Obr. 16; Obr. 17), toto pozorování však nebylo kvantifikováno. Pozitivní reakci se podařilo zaznamenat pouze ve dvou případech na vzorcích nosní sliznice jediné kachny usmrcené 16. dpi (Obr. 18 A).

Při použití protilátky proti 3-nitrotyrosinu (Abcam, ab7048), která značí nitrosylované proteiny, byla pozitivní reakce zaznamenána u buněk kolem červa v tkáni i v cévě (Obr. 18 B) a u buněk, které tvořily shluky kolem některých vajíček (Obr. 18 C). Celá nosní sliznice byla po použití kitu pro značení oxidovaných proteinů (s protilátkou proti dinitrofenolu; Cell Biolabs, STA-310) vyhodnocena jako dinitrofenol pozitivní. Zachyceno bylo pouze několik buněk/útvárů (nebylo možné určit) výraznějších oproti okolní tkáni (není doloženo obrázkem). V případě obou protilátek se značení již nepodařilo opakovat.

Protilátkou proti kuřecím CD28 epitopům (ÚMG AV ČR) byly označeny buňky o velikosti cca 8  $\mu\text{m}$  na roztěrech kuřecí i kachní krve, na otisku sleziny a v jediném případě na kryořezu nosní sliznice. Ani v tomto případě se značení nepodařilo později opakovat.



Obr. 18: Buňky pozitivní na protilátky proti BAFF-R a 3-NT. Nosní sliznice kachny 16. dpi *T. regenti*. Zelený signál – (A) BAFF-R+ buňky; (B, C) 3-NT+ buňky; modrý signál – DAPI+ jádra buněk. Index 1 – buňky pozitivní na použitou protilátku; index 2 – buňky pozitivní na použitou protilátku a DAPI+ jádra buněk s popisky.

Č – dospělec *T. regenti*; Ch – chrupavka; V – vajíčka; DAPI; → – stěna cévy s endotelovými buňkami.

Lze shrnout, že tkáň byla již minimálně od 14.dpi po infekci motolicí *T. regenti* infiltrovaná velkým množstvím buněk. Tyto buňky byly často KUL01+, vyplňovaly pojivo, oblasti pod sliznicí, místa s původním bohatým cévním zásobením poblíž chrupavky a také okolí vajíček, a to včetně míst s výrazně autofluorescenční hmotou kolem vajíček. V pozdějších fázích infekce byly kolem některých snůšek pozorovány oblasti bez KUL01 signálu. Kolem některých vajíček byly po 22. dpi pozorovány nejen KUL01+ buňky, ale také samostatná KUL01+ granula či fragmenty buněk. Pro výskyt CD4 buněčných epitopů máme data až od 16. dpi, kdy se protilátka vážala na buňky nacházející se pod bazální membránou, v některých případech na tkáň okolo vajíček, ale také na další struktury.

Při použití dalších zmíněných protilátek byly inkubované vzorky pozitivní v maximálně dvou opakováních. Jednalo se o vzorky nosní sliznice jediné kachny usmrčené 16. dpi *T. regenti*. Výjimku představuje protilátka proti BAFF-R, jejíž signál byl v jednom případě zaznamenán i u vzorku z 22. dpi. Výsledky značení protilátkami jsou shrnuty v tabulce (Tab. 8).

Tab. 8: Seznam použitých protilátek a pozorovaných signálů na tkáňových kryžezech.

Antigen/ protilátka	Klon	Speci- fita	Signál na kryžezech	Obrázek
<b>Značení bylo s úspěchem opakováno</b>				
CD4	DuCD4-2	kachna	buňky o velikosti cca 8 – 11 μm s jednoduchým jádrem, které se nacházely nejčastěji pod bazální membránou epitelu v pojivové tkáni	Obr. 15
KUL01-FITC	KUL01	kuře	velké množství buněk o velikosti cca 10 μm se segmentovanými jádry, které se nacházely v pojivové tkáni	Obr. 16 Obr. 17
<b>Značení se podařilo pouze jednou</b>				
BAFF-R /CD268	2C4	člověk	buňky se segmentovanými jádry a granuly v cytoplasmě, které se nacházely v pojivové tkáni	Obr. 18A
nitrotyrosine (3-NT)	HM.11	-	buňky v okolí migrujícího červa v cévě i tkáni a shluky u některých vajíček	Obr. 18B Obr. 18C
dinitrophenol (DNP) *	-	-	pozitivní okrsky v tkáni	-
CD28	2-4	kuře	cca 8 μm velké buňky	-

Protilátka proti Mo/MF (KUL01) byla jako jediná konjugovaná fluorescenční značkou FITC. \*) vzorek vykazoval silný signál pozadí.

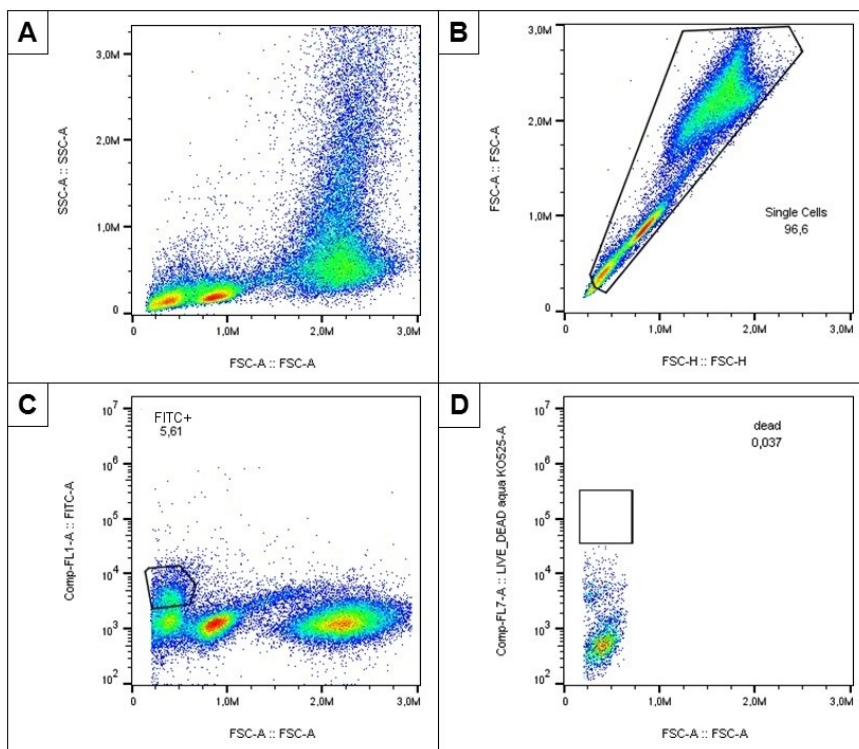
### 3.4 Měření signálu protilátek pomocí průtokové cytometrie

Výsledky z průtokové cytometrie měly sloužit k potvrzení vazby použitých protilátek. U 1. pokusu byla kachní krev zmrazena. V mražené krvi došlo k lyzi erytrocytů a nebylo naměřeno dostatečné množství pozitivních událostí. V případě 2. pokusu bylo zjištěno, že plná krev není vhodná, dokud není znám a použit marker leukocytů, který by sledované buňky pomohl odfiltrovat. Protilátka proti kuřecím CD28 epitopům, která by mohla být pro tyto účely vhodná, nebyla již podle novějších pokusů funkční. V případě použití Histopaque došlo k oddělení některých leukocytů od erytrocytů, nicméně v naměřených hodnotách nebyl patrný signifikantní rozdíl mezi vazbou sekundárních protilátek a KUL01 protilátky.

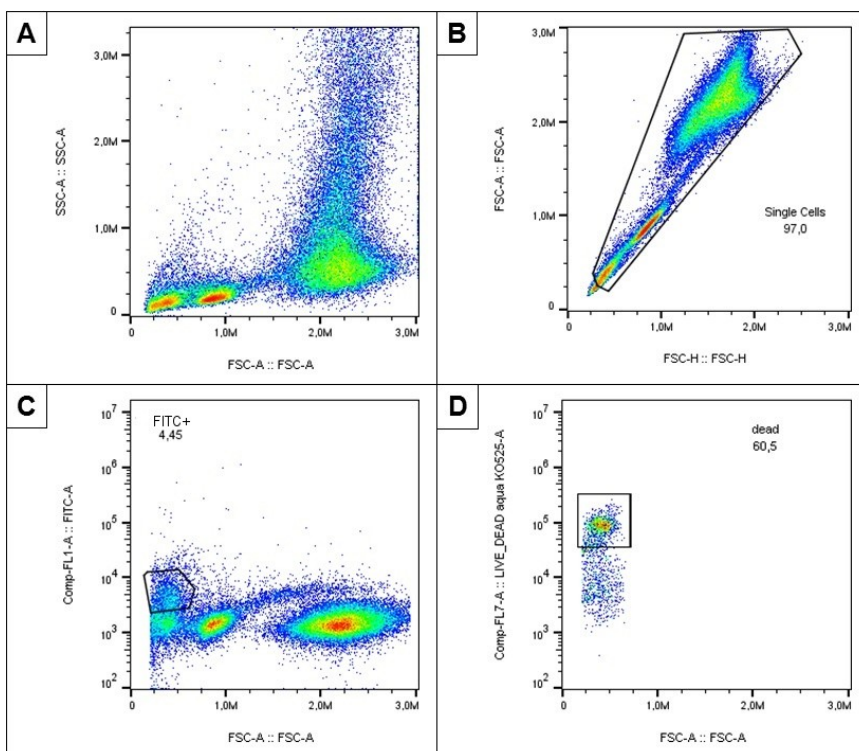
Pro 3. pokus byla vybrána homogenizovaná kachní slezina obsahující oproti krvi velké množství leukocytů a výrazně nižší množství erytrocytů a je pro tyto účely vhodnější.

U vzorků 2, 4-7, 9 bylo naměřeno 50 000 událostí. Jejich rozložení na grafech však bylo prakticky vždy totožné. Proto je pro ilustraci v níže uvedených grafech situace doložena jen negativní kontrolou se sekundární protilátkou a jedním vzorkem obsahujícím i primární protilátku. Zvolená „gating strategy“ byla u všech vzorků totožná (Grafy 1, Grafy 2). V prvním kroku byla data vynesena na graf, který zobrazoval velikost jednotlivých událostí (osa x) a granularitu (osa y) (Grafy 1A, Grafy 2A), poté byly vybrány pouze singlety, tedy jednotlivé buňky (Grafy 1B, Grafy 2B). U singletů byla poté sledována síla fluorescenčního signálu (osa y) vztahená k velikosti buněk (osa x). Zde byla u všech vzorků (kromě kontroly, která nebyla inkubována s žádnou protilátkou) označena populace malých buněk nebo buněčného „debris“ (zbytků), která vykazovala nejsilnější fluorescenční signál (Grafy 1C, Grafy 2C), a tato populace byla poté vynesena na grafu zobrazujícím velikost buněk (osa x) a signál mrtvých buněk (osa y; použitý marker LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain – dále kráceno jen na L/D).

U kontroly byla zaznamenána nespecifická vazba sekundární protilátky u 5,6 % událostí, z nichž žádná nevykazovala signál L/D (Grafy 1D). U vzorků s primární protilátkou CD3ε (Santa Cruz Biotech sc-1179) bylo takto naměřeno 4,45 % pozitivních událostí z celkového množství jednotlivých buněk, z nichž 60,5 % vykazovalo také signál L/D. Více než polovina pozitivních událostí byla tedy naměřena na mrtvých buňkách či buněčném „debris“ (Grafy 2D). Velmi podobné rozložení (v průměru kolem 5% pozitivních událostí obsahujících většinu mrtvých buněk či zbytků) bylo pozorováno také u ostatních sledovaných primárních protilátek. Pro obrazovou demonstraci výsledků zde byly vybrány 2 vzorky. U všech měřených vzorků však byly hodnoty obdobné a vzhledem k výsledkům u kontrol se sekundární protilátkou neměly žádnou výpovědní hodnotu. Pomocí průtokové cytometrie tedy nebyla ověřena reaktivita žádné z vybraných protilátek používaných s kachním modelem, avšak měření podle postupu u 3. experimentu bylo provedeno pouze jednou.



Grafy 1: Cytometrická analýza vazby sekundární protilátky na buňky homogenátu kachní sleziny (kontrolní vzorek č. 2). Gating strategy: (A) buňky rozdělené dle velikosti (forward scatter, FSC) a granularity (side scatter, SSC), (B) vybrané singlety, (C) oddělená populace FITC+ buněk, (D) v oddělené populaci FITC+ buněk nebyly žádné mrtvé buňky.



Grafy 2: Cytometrická analýza vazby protilátky proti lidskému epitopu CD3ε na buňky homogenátu kachní sleziny (vzorek č. 6). Gating strategy: (A) buňky rozdělené dle velikosti (forward scatter, FSC) a granularity (side scatter, SSC), (B) vybrané singlety, (C) oddělená populace FITC+ buněk, (D) v oddělené populaci FITC+ buněk je 60,5 % mrtvých buněk.

### 3.5 Histochemické značení tkáně lektiny

V případě značení řezů nosní sliznice infikované motolicí *T. regenti* (16., 22., 26. dpi) pomocí lektinů nebyla ze spektra testovaných lektinů pozorována žádná relevantní vazba, tedy vhodná pro účely identifikace imunitních buněk, a to u lektinů ConA, PSA, SBA, UEA I ani WGA. Tyto lektiny označily na vzorcích velké množství struktur bez hodnotitelné vazby na probíhající infekci.

Pozitivní signál infiltrovaných buněk byl na řezech tkání zaznamenán při použití lektinů LTL, PNA a RCA-I. Ve slezině označily všechny tři lektiny buňky se segmentovanými jádry, a to LTL nejvýrazněji a PNA nejméně výrazně. Ve Fabriciově burze byly rovněž patrné buňky se segmentovanými jádry, ovšem jen v malém množství (jednotky buněk na otisk) a pozitivní byla i tkáň kolem buněk. V nosní sliznici kachny byl signál pozorován zejména v mucinózních žlázách, ve tkáni u infiltrovaných buněk a slabší reakce také v autofluorescenčním materiálu kolem vajíček. Použití sacharidového inhibitoru ukázalo, že se v případě infiltrovaných buněk v nosní sliznici jednalo o nespecifické vazby, rovněž nespecificky byly označeny buňky se segmentovanými jádry ve slezině a Fabriciově burze (až na velmi malé množství buněk označených PNA). Specifická byla vazba na mucinózní žlázy kachny u značení PNA a LTL, na ojedinělé buňky se segmentovanými jádry ve slezině a Fabriciově burze značené PNA a na tkáň kolem buněk ve Fabriciově burze.

Jelikož však byly vazby na infiltrované buňky v nosní sliznici nespecifické, nebyly lektiny dále využívány k mapování stadií infekce. Výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tab. 9).

Tab. 9: Vazba tří lektinů na vybrané tkáně/buňky kachen po použití specifického inhibitoru.

Lektin	Zkratka	Použitý inhibitor	Výsledky použití		
			Infikovaná nosní sliznice	Slezina	Fabriciova burza
Peanut ag.	PNA	D-galaktóza	+++ MŽ, n +++ IB	+ BSN	+ OB, + BSN*
Ricinus communis ag.	RCA I	D-galaktóza	n +++ MŽ, n +++ IB	n +++ BSN	++ OB, n + BSN*
Lotus tetragonobolus ag.	LTL	L-fukóza	+++ MŽ, n +++ IB	n +++ BSN	+++ OB, n + BSN*

MŽ – mucinózní žlázy; IB – infiltrované buňky; BSN – buňky se segmentovaným jádrem, OB – tkáň v okolí buněk; agg. – aglutinin. Množství/intenzita fluorescenčního signálu je vyznačena znaménky: (+) malá intenzita signálu; (++) střední intenzita signálu; (+++) vysoká intenzita signálu; (n) nespecifický signál; \* – malý výskyt.



## 4 DISKUZE

### 4.1 Fixace tkáně

Pro účely histologických barvení bylo nejdříve třeba vybrat vhodnou fixáž, neboť hodnocené vzorky obsahovaly tkáně různého charakteru (chrupavka, kolagenní pojivo, skořápky vajíček atd.). Nejdříve byly použity běžné fixáže: 4% formaldehyd v PBS a Bouinův roztok. Obě fixáže jsou v naší laboratoři běžně používány a byly využívány také pro histologická zkoumání tkání zvířat nakažených *T. regenti* (Chanová & Horák, 2007; Horák *et al.*, 1999; Kolářová *et al.*, 2001). V případě 4% formaldehydu byla tkáň křehká a bylo problematické dosáhnout kvalitního řezu bez trhlin. V případě Bouinova roztoku působila tkáň kompaktnějším dojmem, nicméně problém byl u krevních sraženin a nekróz. Patrně vlivem některé složky Bouinova roztoku došlo ke ztvrdnutí těchto oblastí, tkáň vypadávala z řezů či nedocházelo k uspokojivému napnutí tkáně na hladině vody. Jelikož se poblíž těchto oblastí často vyskytovala také vajíčka a červi, byl tento jev rovněž překážkou k dosažení uspokojivého výsledku při barvení. Fixáže nebyly dále používány.

Z výše uvedených důvodů byla zvolena Davidsonova fixáž (DAFA). DAFA je díky svému složení vhodná pro fixaci vzorků obsahujících kombinaci tkání různých mechanických vlastností (tvrdých kostí či chránek, pružné a pevné chrupavky a gelovitého vaziva) a používá se např. při fixaci korýšů. Vzorek se po použití této fixáže poměrně snadno krájel a vzorky působily kompaktním dojmem. Nicméně vajíčka byla v některých případech oddělená od okolní tkáně, což by mohlo být způsobeno nedokonalým průnikem fixáže skořápkou.

Pro imunohistochemické značení byla zvolena fixace 4% paraformaldehydem, který byl čerstvý nebo maximálně 14 dní skladovaný při 4 °C. V případě použití staršího roztoku docházelo k nežádoucí autofluorescenci pozadí.

### 4.2 Histologická barvení

#### 4.2.1 Hodnocení vzorků pomocí histologických barvení

Průběh infekce byl sledován od 14. do 26. dpi ve 4 fázích. Původně byly tyto fáze pouze tři: 16. dpi (předpoklad: počátek infekce s již přítomnými dospělci a prvními nakladenými vajíčky), 22. dpi (předpoklad: vrchol infekce, největší množství vajíček v různých stupních vývoje miracidia), 26. dpi (předpoklad: ústup infekce bez přítomnosti dospělců). Jelikož však již 16. dpi byla infekce velmi rozvinutá, byla přidána ranější fáze – 14. dpi. Červi i vajíčka byli zachyceni po celé sledované období; již 14. dpi byla tkáň hojně vyplněná vajíčky (v některých již bylo možné pozorovat rýhující se embryo), a infiltrovaná imunitními buňkami hostitele,

které jsou diskutovány níže. Rovněž 26. dpi, kdy by již mělo docházet k ústupu infekce, byla stále nacházena nová vajíčka a v jednom případě byl zachycen i dospělý červ.

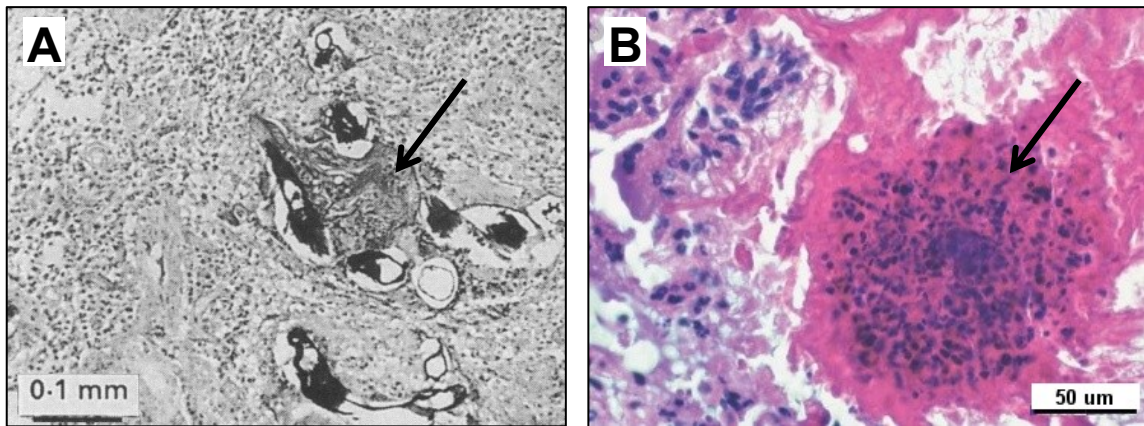
Podle pozorování Chanové & Horáka (2007) klade červ vajíčka nejdříve kolem chrupavky a až později se objevují vajíčka i dále ve tkáni. Kladení podél cévního řečiště blíže chrupavce dává smysl, neboť červ pravděpodobně prolézá krevním řečištěm nejdříve zde. To potvrzují i pozorování tkáně z 14. a 16. dpi, kdy byla vajíčka nakladena také blíže chrupavce a až v pozdějších fázích infekce se objevovala i v řídkém pojivu blíže mucinózním žlázkám a povrchu. Nabízí se otázka, kde dochází ke kladení vajíček, zda v tkáni, nebo v cévách. Při migraci červa dochází k rozsáhlému přílivu imunitních buněk do tkáně, a to zejména do míst, kde došlo k poškození cév. V lumenu cév je možné pozorovat převahu imunitních buněk nad erytrocyty oproti vzorkům ze zdravých kachen. Červ zřejmě prolézá krevním řečištěm venózních pletení, narušuje cévy a klade vajíčka. Při narušení cév dochází k úniku krve do tkáně. Oblast je nejen infiltrována imunitními buňkami, takže je obtížné rozlišit, kde původně cévy byly, ale posléze je také opravována fibroblasty. Přítomnost vajíček by mohla souviset také s preferencí dospělce pro lokalizaci. V dřívějších pracích bylo popsáno, že se červi ve sliznici nacházejí intravaskulárně i extravaskulárně, přičemž lokalizace ve tkáni mimo cévu byla uvedena jako častější (Chanová & Horák, 2007; Horák *et al.*, 1999; Horák *et al.*, 1998; Kolářová *et al.*, 2001). V námi použitých a studovaných vzorcích se však červi nacházeli spíše intravaskulárně, zato extravaskulárně méně až ojediněle. Vajíčka byla dříve popsána pouze ve tkáni (Kolářová *et al.*, 2001). V našich vzorcích byla nalezena i v cévách v pozdějších infekcích obklopená reparační tkání obsahující kolagenní vlákna (Obr. 11 A, B, C, D). Vajíčka přítomná jak v tkáni, tak v cévách byla pozorována i na fotografiích z transmisního elektronového mikroskopu (TEM; viz PŘÍLOHY, Obr. 20 A, B; K. Svobodová, nepublikováno).

Všechna výše uvedená pozorování byla provedena na vzorcích barvených zejména hematoxylinem a eosinem, které poskytlo základní přehled o tkáni i ideální podmínky pro pozorování průběhu infekce. Barvení již bylo dříve aplikováno i na řezy nosní sliznice kachen a byly popsány imunitní buňky účastníci se zánětu v přítomnosti *T. regenti* (Chanová & Horák, 2007; Kolářová *et al.*, 2001). Pomocí tohoto barvení byla označena jádra buněk modře a bazické struktury růžově. Barvení se používá rutinně v laboratořích k diagnostickým účelům a zkušeným okem lze v tkáni popsat jednotlivé typy tkání a buněk včetně buněk imunitního systému. V případě zdravé tkáně byly relativně dobře rozlišitelné různé typy buněk v pojivově tkáni, přičemž rozložení odpovídalo běžnému rozložení buněk v řídkém slizničním pojivu u sliznic. U infikovaných zvířat už byla identifikace díky velkému množství infiltrovaných buněk obtížnější.

Kolem vajíček *T. regenti* v nosní sliznici byly již dříve popsány eosinofily, heterofily, histiocyty (tedy makrofágy nacházející se v pojivově tkáni a schopné tvořit panožky) a kolem vajíček s vyvinutým miracidem také vícejaderné buňky. Méně často se vyskytovaly

plasmatické buňky a další jednojaderné buňky. Podobná reakce byla pozorována kolem samotných skořápek i volných miracidii; ve tkáni bylo pozorováno také velké množství erytrocytů (Chanová & Horák, 2007; Kolářová *et al.*, 2001). V našich experimentech byla tkáň od prvního sledovaného dne, tedy 14. dpi infiltrovaná velkým množstvím imunitních buněk, zejména lymfocytů, z nichž některé by mohly být ve stadiu dělení. V těsné blízkosti vajíček byly od 16. dpi patrné shluky makrofágů a jejich počty v průběhu infekce mírně stoupaly. Později (hlavně 22. dpi) se kolem vajíček objevovaly klidové lymfocyty s kompaktním jádrem a vyskytovaly se i plasmatické buňky s kulatým jádrem a basofilní cytoplasmou ustupující do strany.

Velmi brzy by do místa zánětu měly u ptáků pronikat **heterofily**, funkční homology savčích neutrofilů (Brooks *et al.*, 1996). Heterofily jsou významnými fagocyty, stojí běžně v první linii obrany proti mikrobům (maxima dosahují již 12 hodin po infekci) a velký význam mají právě v dýchací soustavě. Na obraně proti patogenům se podílí schopností fagocytovat, degranulovat a navozovat oxidativní vzplanutí, avšak oproti savčím neutrofilům s nižší intenzitou (Genovese *et al.*, 2013; Harmon, 1998). V případě nosní sliznice infikované *T. regenti* nebyly 14. ani 16. dpi identifikovány buňky odpovídající charakteristice granulocytů. Od 22. dpi již byly v některých případech rozeznány, ale v množství dalších buněk byly na 5  $\mu\text{m}$  řezech špatně patrné. Bylo popsáno, že u mladších ptáků (3 týdny) ještě nejsou heterofily plně vyvinuté (Lowry *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998), a tak se nabízelo vysvětlení, že by u kachen v tak nízkém věku ještě nebyly atrahovány do místa zánětu. Nicméně při TEM tkáně (19 dpi) byly granulocyty ve tkáni i v cévách poměrně hojně zastoupeny a v cytoplasmě obsahovaly charakteristická granula i fagocytovaný materiál (viz PŘÍLOHY, Obr. 20 E, F; K. Svobodová, nepublikováno). Je tedy pravděpodobnější, že granulocyty pouze nebyly v přítomnosti lymfocytárního infiltrátu na histologických preparátech zdárně odlišeny. Domněnky o přítomnosti granulocytů by mohlo osvětlit i detailnější prozkoumání „hmoty s fragmenty jader“. Zejména v oblastech větších snůšek totiž byly mezi vajíčky patrné oblasti obsahující nahloučená malá jádra či fragmenty jader, detailnější pozorování bylo obtížné. Tento materiál byl také výrazně autofluorescenční. Pravděpodobně se jedná o nekrotické oblasti obsahující právě heterofily a eosinofily, což by vysvětlovalo jejich růžovou barvu při barvení hematoxylinem a eosinem i Massonovými trichromy. Pomocí histologických barvení byly podobné oblasti popsány u infekce krevničkou *Schistosoma nasale* v nosní sliznici u dobytka, kde byly v těchto oblastech identifikovány eosinofily a neutrofilové (Obr. 19 A) (Debont *et al.*, 1989) nebo u bakteriální infekce solných žláz kachen, kde tyto nekrotické oblasti obsahovaly degenerované heterofily obklopené obřími vícejadernými buňkami (Obr. 19 B) (Klopfleisch *et al.*, 2005). Nekróza uvnitř granulomu byla popsána také u nálezů lidskými schistosomami, nicméně podle fotografií histologicky zpracovaných vzorků vypadá odlišně (např. von Lichtenberg *et al.*, 1973; Amaral *et al.*, 2017).



Obr. 19: **Nekrotické oblasti s granulocyty na histologických řezech.** (A) Nekrotický střed granulomu s vakuolizovanými buňkami, neutrofilny a eozinofily v nosní sliznici dobytka při nákaze *S. nasale*. (B) Nekrotický střed granulomu s degenerovanými heterofily obklopenými vícejadernými obřími buňkami při bakteriální infekci solných žláz u kachen. Šipka – nekróza. Zdroje: A (Debont *et al.*, 1989), B (Klopfleisch *et al.*, 2005), upraveno.

V místě zánětu byly přítomny pojivové **makrofágy** neboli histiocyty, kterými se stávají monocyty po průchodu z periferní krve do tkáně. Makrofágy mají mnoho funkcí: fagocytují nevhodný materiál, produkují mediátory zánětu a fungují jako antigen prezentující buňky. Při schistosomóze hrají makrofágy roli jak v počátcích v akutní fázi infekce, tak i v rozvoji chronických stavů, a to podle způsobu aktivace (Herbert *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2014). Ve tkáni napadené *T. regenti* se nacházelo velké množství makrofágů. Patrné byly od 14. dpi infiltrované v pojivu a od 16. dpi se objevovaly nápadné shluky v přímém okolí vajíček často těsně obklopující vajíčko (např. Obr. 9 A, Obr. 10 C). Velké množství makrofágů bylo pozorováno i na snímcích z TEM, buňky tvořily panožky a obsahovaly fagocytovaný materiál. Kolem některých vajíček v tkáni a kolem jednoho vajíčka nalezeného v cévě tvořily velmi dlouhé panožky, které vajíčko obklopovaly. V některých místech byly dokonce tak blízko sebe, že nebyly patrné cytoplasmatické membrány a možná došlo k fúzi. Byly nalezeny i větší buňky plné fagocytovaného materiálu a reziduí jiných buněk (zřejmě erytrocytů), takže jde patrně rovněž o makrofágy (viz PŘÍLOHY, Obr. 20 C, D, E; K. Svobodová, nepublikováno). Pokud nemohou makrofágy patogenní agens pohltnout, mohou tvořit „epiteloidní buňky“, které jej obklopí. Jejich fúzi pak může dojít ke tvorbě obřích vícejaderných tzv. Langhansových buněk. Tyto modifikace tkáňových makrofágů jsou běžným jevem při granulomatózním zánětu a byly při podobných infekcích již popsány (Debont *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 2012; Klopfleisch *et al.*, 2005; Kolářová *et al.*, 2001). U lidí mají významný vliv na tvorbu těchto buněčných uskupení T lymfocyty. Bylo popsáno, že k tvorbě obřích buněk je zapotřebí, aby proběhla interakce mezi T lymfocyty a monocyty, resp. epitopem CD40 a jeho ligandem (CD40L), a to navíc v přítomnosti cytokinu IFN- $\gamma$  produkovaném rovněž T lymfocyty (Sakai *et al.* 2012).

**Lymfocyty** z periferní krve infiltrovaly tkáň velmi brzy a vytvořily tzv. difúzní lymfatickou tkáň, kde dochází ke tvorbě a diferenciaci dalších lymfocytů. Jednalo se nejspíš o aktivované

a diferencované T a B lymfocyty z uzlin, které představují zástupce specifické imunity. Z B buněk se pak mohou diferencovat plasmatické buňky produkující protilátky. Tyto buňky se ve tkáni také nacházely, ale nebyly nalezeny na snímcích z TEM, kde je pro tyto buňky charakteristické výrazně rozvinuté drsné endoplazmatické retikulum. V blízkosti vajíček se u pozdějších infekcí (hlavně od 22. dpi) objevovaly i klidové lymfocyty s kompaktním jádrem, ale na rozdíl od makrofágů je nikdy tak těsně neobklopovaly. Tyto lymfocyty jsou velmi časté v perifériích a po aktivaci jsou schopné dělení a diferenciaci na efektorové lymfocyty. Byly obsaženy v poškozených místech, kde předpokládáme původní cévní zásobení, ojedinele pak také pod povrchem sliznice. Ke stanovení typů lymfocytů by však bylo vhodné použít specifitější značení protilátkami.

Dalším buněčným typem byly **žírné buňky**, které byly zvýrazněny toluidinovou modří. Žírné buňky neboli heparinocyty či mastocyty se běžně nacházejí v pojivu a ve sliznicích dýchacího a gastrointestinálního traktu, kde tvoří první linii obrany proti patogenům. Hrají důležitou roli v imunitní odpovědi a zánětu, účastní se obrany proti virům a parazitům i na regulaci imunitní odpovědi. Při schistosomóze se žírné buňky patrně podílí na vzniku fibrózy (Birck *et al.*, 2006). Žírné buňky se vyskytují i u ptáků a produkují množství látek: histamin, heparin, serotonin, chymázu či tryptázu, jejíž hladina je u kuřat přímo úměrná množství mastocytů v tkáni (Wang *et al.*, 2008). Běžně se nacházejí ve sliznicích a pojivu i u kachen (Valsala *et al.*, 1986). Pokud jsou žírné buňky aktivovány (přítomností antigenů virů, bakterií, parazitů či působením komplementu), uvolňují prozánětlivé mediátory a cytokiny, kterými ovlivňují také permeabilitu cév a působí příliv dalších imunitních buněk (Galli *et al.*, 1999). Vazodilatátor histamin, který lze v buňkách obarvit toluidinovou modří, působí rozšíření cév, příliv imunitních buněk a zároveň vypuzení parazita. Také umožňuje zvýšenou produkci hlenu na sliznici. Při experimentální virové infekci kuřat došlo k produkci histaminu, který se zdál být spíše zodpovědný za poškození tkáně (Sun *et al.*, 2009), a tryptázy, jejímž pravděpodobným přičiněním došlo ke zvýšení počtu prozánětlivých buněk. Mastocyty byly popsány také při histopatologických studiích nálezů lidskými schistosomami, namátkou např. kolem vajíček *S. mansoni* v játrech infikované myši (Epstein *et al.*, 1979) či kolem schistosomul *S. japonicum* v epidermis primátů (Hsu *et al.*, 1979). Žírné buňky se sice v nosní sliznici kachny napadené *T. regenti* objevují hojněji než u zdravé tkáně, ale nebyla patrná kumulace kolem parazita ani jejich degranulace. To, že se žírné buňky nevyskytují v blízkosti parazita, by mohlo být způsobeno tím, že jejich úloha pro tuto infekci je pouze v atrakci makrofágů a lymfocytů do infikované tkáně pomocí zánětlivých mediátorů a cytokinů, jak uvažují v souvislosti s virózou kuřat také Sun *et al.* (2009). V našem případě by tedy mohlo v časně fázi infekce dojít k rozpoznání cizorodých antigenů žírnými buňkami, jejich navýšení v tkáni (v porovnání se zdravou tkání) a produkce prozánětlivých cytokinů, které pak atrahují další leukocyty. Jelikož

nebyly pozorovány v blízkosti parazita ani degranulované, je možné, že se aktivně (vylitím granulí s enzymy) nepodílejí na likvidaci parazita.

V nosní sliznici a střevě dospělých červů *T. regenti* byl často pozorován také **hnědý pigment**, který nebyl obarven žádným z použitých barvení. *Trichobilharzia regenti* se živí krví hostitele a pigment byl popsán už ve střevě schistosomul 12 a 13 dpi v meningeální oblasti kachního *bulbus olfactorius*, kdy červ zřejmě přechází na krevní potravu (Chanová & Horák, 2007). V ojedinělých případech byl hnědý produkt pozorován i u mladších schistosomul v kachní míše (Blažová & Horák, 2005). Při schistosomóze byl tzv. bilharziální pigment nalezen v makrofázích i volně v tkáni (Botelho *et al.*, 2010). U *S. mansoni* se soudí, že je nejen odpadním detoxifikovaným materiálem, který parazité vylučují, popř. využívají dále ve viteláriích (Xiao & Sun, 2017), ale jedná se také o protizánětlivý mediátor. Po regurgitaci moduluje imunitní odpověď hostitele v souvislosti s indukcí tvorby alternativně aktivovaných makrofágů a Th2 odpovědi (Truscott *et al.*, 2013), čímž pomáhá k dlouhodobému přežití parazita. Obdobný hnědý pigment se tedy objevoval ve střevě dospělců *T. regenti* v nosní sliznici kachny a také v samotné tkáni v oblasti migrace červa. Je možné, že tento pigment sehrává u nálezů *T. regenti* podobnou roli jako u schistosomóz, tedy ovlivňuje protizánětlivou odpověď. Předpokládá se, že se i v případě našich vzorků, resp. v případě *T. regenti*, jedná o hemoglobin metabolizovaný na hemozoin a vzorky byly obarveny pruskou modří. Pruská modř barví modře pouze hemosiderin, jak bylo pozorováno např. v placentě žen nakažených malárií (Parekh *et al.*, 2010). Jelikož k obarvení tohoto pigmentu nedošlo, je možné vyloučit, že by se jednalo o hemosiderin (na který byla pozitivní kontrolní slezina myši). Podle pozorování struktury a porovnání s daty, která jsou známá u lidských schistosom, by se tedy mělo jednat o hemozoin. Pozorovali jsme také rozdílný odstín tohoto pigmentu ve střevech dospělých červů: světlý (Obr. 9 E) a tmavý (není doloženo obrázkem). U *S. mansoni* bylo popsáno, že světlý obsah se nacházel ve střevě samců a tmavý ve střevě samic. Důvodem této odlišnosti je zřejmě rozdílné množství přijímané krve a rozdílná schopnost detoxikace hemu mezi pohlavími: spotřeba krve u samců je relativně nízká a zpracováno je pouze 10 % hemu, zatímco u samic je to více než 50 % a jejich spotřeba krve je vyšší (Oliveira *et al.*, 2000). Tento pigment lze v tkáni považovat také za doklad předchozí přítomnosti parazita, i pokud právě nejsou přítomna vajíčka či samotný dospělec.

Na některých vzorcích byl pozorován zlatavý materiál v tkáních i v cévě. Mohlo by se jednat o skořápky vajíček po vylíhnutí miracidia. Kolem některých těchto domnělých skořápek byly zachyceny i nahloučené makrofágy (Obr. 13 E).

**Granulomy** složené z infiltrovaných buněk a případně ještě obklopené kolagenními vlákny se v menší míře objevují 16. dpi a ještě nejsou příliš znatelné, ale 22. dpi již jsou zejména díky kolagenním vláknům rozlišitelné poměrně dobře, nacházejí se spíše blíže chrupavce v místech,

kde bylo původně bohaté cévní zásobení. Co se týče kladení vajíček, pozorování některých oblastí s nakladenými vajíčky naznačují, že může docházet ke kladení přímo v cévě. Vajíčka zde však vlivem množství, velikosti a svého specifického vřetenovitého tvaru uvíznou podobně, jako je tomu u vajíček schistosom. U lidských schistosom dochází k extravazaci vajíček do tkání a poté lumenu střeva, resp. močového měchýře. Za to jsou zřejmě zodpovědné proteolytické enzymy produkované vajíčkem společně s pohyby svalstva napadeného orgánu. Ve vajíčcích či jejich produktech byly popsány enzymaticky aktivní látky, které by mohly mít na průchodu tkáněmi podíl (Cesari *et al.*, 2000; Doenhoff *et al.*, 1990; Pinoheiss *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1990). Vajíčko má patrně vliv i na krevní destičky, které způsobí jeho zachycení v mezenterických cévách (Ngaiza & Doenhoff, 1990). U *T. regenti* k průchodu vajíček tkáněmi nedochází. Je však možné, že jsou kladena rovněž do cév, kde dojde k jejich zachycení. Taktéž je možné, že dochází k vaječné exkreci či sekreci, která ovlivňuje hostitele, nicméně bude asi jiného charakteru či síly, než u lidských schistosom. Vajíčko *T. regenti* totiž zůstává v tkáni, dokud se z něj nevylíhne miracidium. Již samotná přítomnost vajíček *T. regenti* může dále narušovat cévu (např. Obr. 11 A) a společně s povrchovými antigeny, případně ES produkty stimulovat imunitní systém. Dochází k atrakci imunitních buněk a fibroblastů a následné reparaci tkáně a oddělení cizorodého materiálu od hostitelovy krve a tkáni. Tuto situaci demonstrují obrázky Obr. 10A, Obr. 11B, C a D.

Při lidské schistosomóze byl nejdříve pozorován kolagen III prostupující tkáni, který byl poté nahrazován kolagenem I, jež byl pozorován v kompaktnějším uskupení kolem vajíček (Andrade *et al.*, 1992). Běžně se kolagenní vlákna barví trichromy, např. Massonovým barvením, které bylo použito pro tuto práci. Kolagenní vlákna typu III lze barvit metodou PAS. Podle těchto barvení lze soudit, že opornou funkci pojivové tkáně v nosní sliznici kachny plní kolagenní vlákna zřejmě typů I a III, která pozorujeme rozvolněná ve zdravé tkáni; v nosní sliznici nakažené kachny jsou tato vlákna infiltrována imunitními buňkami. Bohužel u kachen nedochází k tak výrazným změnám tkáně jako u nálezů lidskými schistosomami, a tak nemohlo být využito podobné klasifikace granulomů, jakou publikovali např. Amaral *et al.* (2017). Rozdíly mohou být způsobeny odlišným hostitelem i parazitem, rozdíly v ES produktech i dobou infekce – u *T. regenti* sledujeme mnohem kratší období. V našem případě lze tedy konstatovat, že kolem snůšek se objevuje shluk imunitních buněk: makrofágy a lymfocyty kolem vajíček a nekrotické oblasti s granulocyty. Také dochází ke tvorbě kolagenních vláken fibroblasty, které jsou kolem snůšek patrnější v pozdějších fázích infekce. Výraznější jsou kolagenní vlákna v oblasti původního cévního zásobení, podle charakteru pozorované tkáně předpokládáme, že některé snůšky jsou nakladeny přímo do cévy, a kolagenní „obal“ je tak alespoň z části tvořen stěnou cévy. Kolem vajíčka se pak tvoří kolagenní pouzdro podobného histologického charakteru, jako má stěna cévy, *de novo*, a to s cílem zachování průchodnosti napadených cév, ale oddělení patogenního agens od toku krve.

#### 4.2.2 Histologická barvení, která nebyla dále využita

Při pilotních pokusech byla použita i další barvení, která nakonec z různých důvodů nebyla vhodná ke sledování průběhu infekce.

**Ziehl Neelsen** je histologická metoda používaná běžně k detekci bakterií *Mycobacterium tuberculosis* či rodu *Nocardia* (Muricy *et al.*, 2014). Karbol-fuchsin pronikne do buňky, jejíž buněčná stěna obsahuje mykolové kyseliny, které udrží barvivo uvnitř buňky (Richards 1941), což se projeví výrazně růžovým zbarvením bakterií. Bylo popsáno, že touto metodou je možné obarvit také skořápky vajíček *S. mansoni* a *S. intercalatum* v tkáni; nebylo však určeno, co karbol fuchsin ve skořápkách barví (Lichtenberg & Lindenberg, 1954; Muller & Taylor, 1972a; Muller & Taylor, 1972b). Vieira *et al.* (2016) to však vyvracejí a uvádějí, že při obarvení roztěru s vajíčky byly při pozorování ve světelné mikroskopii skořápky obarveny jen velmi slabě. I u *T. regenti* došlo ke slabému nabarvení některých skořápek, avšak nebyla patrná žádná souvislost s délkou vývoje či dobou infekce, a navíc kontrast nebyl zdaleka tak výrazný, jak uvádějí některé výše zmíněné práce. Spíše bylo odhadováno, zda se jedná o obarvení či o vhodný lom světla, tloušťku a úhel říznuté skořápky. Nepříjemný je i fakt, že karbol-fuchsin je potřeba zahřát, což bylo prováděno v digestoři nad kahanem, na plotýnce či v laboratorní pídce.

**PAS reakce** barví polysacharidy a je používána jako pomocná diagnostická metoda u některých onemocnění způsobených bakteriemi, ale i helminty – konkrétně echinokokózy (např. Brunetti *et al.*, 2010) či trichinelózy (např. Othman & Shoheib, 2016), při kterých jsou patrné výrazně PAS pozitivní cysty. Zastoupení polysacharidů se u vyvíjejícího miracidia *T. regenti* ve vajíčku měnilo, ale nebyly pozorovány žádné jiné struktury, pro které by bylo toto barvení vhodné, proto nebylo dále využíváno.

**Orcein** značí elastická vlákna a mohl by být tedy užitečný ze dvou důvodů: (a) pro označení stěn cév, které jsou po poškození špatně patrné, a (b) pro případné označení novotvarů v okolí vajíček *T. regenti*. Při studiu tvorby, charakteru a změn okolí periovulárních granulomů u myši nakažených *S. mansoni* byla elastická vlákna pozorována ve stěnách krevních cév, ale také v tkáni, kde bylo při schistosomóze zaznamenáno zvyšující se množství vláken, a to v oblasti poničených cév (Andrade *et al.*, 1992). Při nákaze lidskými schistosomami dochází k obstrukcím cévního systému a pomocí orceinu lze od okolí cév odlišit fibrotickou a zánětlivou tkáň vyplňující lumen cév (Andrade *et al.*, 2006). Vlivem vaječných antigenů dochází u nálezů *S. mansoni* také k tvorbě nových cév (Loeffler *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006). Vzhledem k destrukci cév po migraci dospělce *T. regenti* a k omezení průtoku krve vlivem nakladených vajíček by ke tvorbě nových cév (angiogenezi) mohlo docházet, nicméně na našich vzorcích nebyly útvary připomínající nové cévy patrné. U některých granulomů však bylo zaznamenáno, že se elastická vlákna nacházejí jen podél okraje granulomu, nikoliv „uvnitř“, kde však byla patrná zřejmě již nově vytvořená mezibuněčná hmota. Toto pozorování opět podporuje teorii, že



vajíčka jsou kladena (také) do cév a pomocí orceinu by teoreticky bylo možné odlišit, která vajíčka jsou nakladená v cévách (a obklopená novým pojivem), a která do tkáně.

Při prvních pokusech byl použit také roztok **Giemsy**. Roztok se používá rutinně, z parazitologické diagnostiky u lidí zejména na krevní roztěry k detekci prvoků rodu *Plasmodium* způsobujících spavou nemoc či *Trichomonas vaginalis* ve vaginálním stěru (mikrobiální obraz poševní), pro veterinární účely k detekci prvoků rodů *Leucocytozoon*, *Babesia*, bakterií *Anaplasma/Ehrlichia* přenášených klíšťaty, z helmintóz k detekci mikrofilárií v krvi atd. V našem případě byla nabarvená tkáň poměrně nekонтastní a bez výrazných struktur a dobře rozlišitelných buněk, barvení tedy nebylo dále využíváno. Je však možné, že byl použit nevhodný roztok, jelikož i při jiných experimentech v naší laboratoři byly zaznamenány různé výsledky při použití různých roztoků Giemsy na krevních roztěrech, a to i komerčně dostupných.

### 4.3 Výběr protilátek pro imunohistochemická značení

Výrazné autofluorescenci vzorků bylo zabráněno volbou vhodné fixáže – čerstvého 4% paraformaldehydu – a také pouze nezbytnou manipulací se vzorky a jejich uchováváním bez přístupu vzduchu. V průběhu let však docházelo opakovaně k nekonzistentním výsledkům značení. Negativní kontrola obsahující pouze sekundární protilátku byla v některých případech v pořádku, jindy vykazovala více či méně výrazný signál. V několika případech negativní kontrola vykazovala signál, přestože u vzorků inkubovaných i s primární protilátkou nebyl žádný signál patrný. Příčina nebyla zjištěna, a asi je možný negativní vliv stáří vzorků. Diskutovány jsou pouze výsledky pokusů, u nichž byla „negativní kontrola“ negativní.

Jelikož není na trhu dostatek protilátek ke značení kachních buněk a tkání, byly nejdříve zkoušeny dostupnější protilátky určené proti kuřatům. V některých případech byly získány pozitivní výsledky. Většinou protilátek byla v prvním kroku značena kuřecí krev. Vhodnější by však pro účely pozitivní kontroly bylo použití kuřecí sleziny. Naprostá většina testovaných protilátek nevykazovala na kuřecí krvi žádnou aktivitu, což asi bylo způsobeno jejich vysokým stářím a degradací či ztrátou reaktivity. Testovali jsme také několik protilátek proti epitopům na kachních buňkách. Použití některých protilátek je zde diskutováno.

#### 4.3.1 Protilátky s opakovaně pozitivním signálem

Přímo proti kachním **CD4** T lymfocytům byla použita specifická (nově zakoupená) protilátka (BioRad, MCA2478). Pozitivní byly buňky obsažené ve slezině a v některých případech jsme mohli pozorovat pozitivnější buňky v nosní sliznici, nicméně poměrně výrazný signál vykazovala i okolní tkáň. Tuto protilátku vyvinuli Kothlow *et al.* (2005) v BALB/c myších a spolu s dalšími protilátkami proti CD4 a CD8 epitopům ji úspěšně použili pro průtokovou

cytometrii ke značení buněk z brzlíku, sleziny, periferních a burzálních lymfocytů. Tutéž protilátku, ale již komerčně dostupnou (BioRad – Abd Serotec), s úspěchem využili ve svých pokusech Cornelissen *et al.* (2013). V nosní sliznici kachny byly pozorovány buňky s jednoduchým jádrem, které byly často protáhlé či panožkovité. U myši bylo v *in vitro* podmínkách popsáno, že vyšší hladina protizánětlivého cytokinu IL-4 stimuluje u T lymfocytů tvorbu panožek a nízká hladina prozánětlivého cytokinu IL-2 tvorbu panožek blokuje (Palomo *et al.*, 1996). Přítomnost T lymfocytů s panožkami by tak i v námi studované tkáni mohla indikovat potlačování zánětlivé odpovědi; tuto hypotézu by bylo třeba ověřit pomocí specifických protilátek, které však momentálně na trhu ještě nejsou k dispozici.

Protilátka, která specificky značí kuřecí buňky monocyto-makrofágové řady, **KUL01** (Southern Biotech, 8420-02), opakovaně značila velké množství buněk infiltrovaných do nosní sliznice kachny napadené *T. regenti* a také buňky v některých oblastech kachní sleziny a v krvi. Mast *et al.* (1998) popsali, že KUL01 specificky značí kuřecí monocyty/makrofágy. Velké množství makrofágů bylo nalezeno stejně jako v našem případě v červené pulpě sleziny. Ohledně reaktivity s kachními buňkami nebyly nalezeny žádné zmínky, ale je možné, že protilátka KUL01 rozpoznává u kachen nějaký konzervovaný epitop, resp. homolog, stejně jako je tomu u člověka (Staines *et al.*, 2014).

### 4.3.2 Protilátky s nekonzistentními výsledky značení

U protilátky proti kuřecímu **CD28** (ÚMG AV ČR) byl pozorován silný signál v dřívějších pokusech na roztěrech kuřecí i kachní krve, na otisku sleziny a v jednom případě i na vzorku nosní sliznice kachny nakažené *T. regenti* 16. dpi. Molekula CD28 byla u kuřat dříve označovaná jako CD2 (Vainio *et al.*, 1991). Jedná se o homolog savčích CD28 epitopů nacházejících se na T lymfocytech (Young *et al.*, 1994), kde působí jako kostimulační molekula pro interakci např. s APC a je důležitá pro aktivaci T lymfocytu na efektorovou Th1 buňku. Kuřecí CD28 molekulu specificky rozpoznává i námi použitá monoklonální protilátka (2-4; ÚMG AV ČR). Kotlow *et al.* (2005) popsali zkříženou reaktivitu této protilátky s kachními T lymfocyty a označili ji za „pan-T cell marker“ značící celou populaci kachních T lymfocytů (Kotlow *et al.*, 2005). Při našich dalších pokusech však nebyl pozitivní signál již pozorován. Je možné, že protilátka nebyla již při získání v dobrém stavu (ale jelikož se jednalo o starší vzorek získaný z jiného pracoviště, neznáme její historii), a při posledním rozmrazení došlo k jejímu znehodnocení.

Z komerčně dostupných protilátek byl pozorován pozitivní signál ve dvou případech u protilátek proti BAFF-R (Santa Cruz Biotech, sc-365410), ale další opakování již nebyla úspěšná. **BAFF-R** je konzervovaný transmembránový cytokin, který je důležitý pro aktivaci, proliferaci a diferenciaci B lymfocytů (Schneider *et al.*, 2004). Protilátku proti lidským BAFF-R jsme se rozhodli vyzkoušet, neboť lidský imunostimulant hBAFF má s kachním dBAFF 78%

shodu v aminokyselinových sekvencích a bylo prokázáno, že se váže i na kachní burzální B lymfocyty (Guan *et al.*, 2007), kuřecí chBAFF má shodu s dBAFF dokonce 97 % (Kothlow *et al.*, 2005).

V jednom případě byl pozorován signál také u vzorků testovaných na **oxidované a nitrosylované proteiny** (Cell Biolabs, STA-310; Abcam, ab7048). Při obraně organismu proti patogenům hrají svou roli reaktivní formy kyslíku (ROS), na jejichž produkci se podílejí fagocyty (neutrofily, makrofágy) po aktivaci během oxidačního vzplanutí. Makrofágy jsou stimulované prozánětlivými cytokiny (Th1) také k produkci oxidu dusnatého, který je užitečný zejména při zabíjení intracelulárních parazitů. Během zánětu však dochází také k poškození vlastních buněk hostitele: působením ROS dochází ke karboxylaci proteinů, při působení reaktivních forem dusíku (RNS) dochází k nitrosylaci, tedy navázání nitro- skupiny na tyrosin (Radi, 2004). Autoři výzkumu zabývajícího se vlivem nákazy myši motolicí *S. mansoni* popisují, že v některých orgánech, zejména v játrech, došlo k nárůstu karboxylovaných proteinů, které jsou známkou oxidačního poškození tkáně (de Oliveira *et al.*, 2013). Je pravděpodobné, že k podobným reakcím a poškození dochází i u naší sledované infekce, ale náš průkaz takto pozměněných proteinů se nepodařilo opakovat.

### 4.3.3 Protilátky s negativními výsledky značení

Bez úspěchu skončilo použití dalších protilátek (většinu jsme vyřadili již po značení krevních roztěrů), i když některé z nich se nám zdály perspektivní: proti epitopům CD3ε, CD45, kolagenu typu 1, makrofágům (K1, M1 a M2) a tryptáze žírných buněk.

U protilátek specifických proti kachním monocytům/makrofágům M1 a M2 (ÚMG AV ČR) šlo nejspíš o příliš staré a již degradované protilátky. Protilátka proti kuřecím leukocytům CD45 (Southern Biotech), která je využívána např. při cytometrii pro oddělení sledovaných buněk od jaderných erytrocytů (Bílková *et al.*, 2017), nebyla funkční ani při měření na průtokovém cytometru. Úspěšné nebylo ani použití nové protilátky proti kolagenu typu 1 (Santa Cruz Biotech, sc-59954). Stará byla zřejmě i protilátka K1 (ÚMG AV ČR), která byla původně vyvinuta proti kuřecím leukocytům. U té bylo dříve zjištěno, že zkříženě reaguje s kachními trombocyty a monocyty/makrofágy, a zároveň nereaguje s T a B lymfocyty a značení bylo ověřeno pomocí průtokové cytometrie (Kothlow *et al.*, 2005). V případě funkční protilátky by se opět mohlo jednat o užitečný nástroj detekce. V našem případě byla protilátka testovaná pouze na krevních roztěrech.

Monoklonální protilátka proti lidským CD3ε (Santa Cruz Biotech, sc-1179) by mohla označit T lymfocyty, pokud by šlo o vazbu na stejný epitop, na který se váže polyklonální králičí protilátka proti lidským CD3ε. CD3ε je vysoce konzervovaná membránová doména exprimovaná na T lymfocytech napříč skupinami obratlovců (kachna, kuře, člověk) (Kothlow *et al.*, 2005). Díky tomu může polyklonální protilátka proti lidským CD3ε zkříženě reagovat

i s kachními T lymfocyty (Bertram *et al.*, 1996). V případě této monoklonální protilátky však nebyl zaznamenán žádný signál na řezech ani při cytometrickém měření.

Pomocí protilátky byla značena také tryptáza žírných buněk (Santa Cruz Biotech, sc-33676). Díky histaminu je možné žírné buňky histologicky obarvit např. toluidinovou nebo alcianovou modří, jak bylo uvedeno výše, a díky obsahu tryptázy by zase mělo být možné je označit protilátkou proti tryptáze (Wang *et al.*, 2008). V našich pokusech nebyl v kachní tkáni pozorován pozitivní signál ani v jediném případě, přestože se podle barvení toluidinovou modří žírné buňky ve tkáni hojně vyskytovaly.

#### **4.4 Testování reaktivity protilátek pomocí průtokové cytometrie**

Měření vazby protilátek pomocí průtokové cytometrie bylo zvoleno poté, co při použití několika výše zmíněných protilátek v imunohistochemických detekcích vycházely rozdílné výsledky. Vzorek zpracováváný pro průtokovou cytometrii neprochází tolika kroky, které by mohly ovlivňovat epitopy, a navíc byly používány protilátky většinou z pracovišť, kde byly používány právě pro cytometrická měření, nikoli pro značení řezů.

Mražení by údajně nemělo mít vážnější vliv na záchyt lymfocytů v lidské krvi (Alam *et al.*, 2012), takže i kachní krev byla pro první pokus zmrazena v -80 °C. Mražení způsobilo lyzi erytrocytů, což nevadilo, ale pravděpodobně znehodnotilo i granulocyty, a možná i další krevní elementy či antigenní struktury, přestože byl ke krvi přidán roztok DMSO. Proto jsme při dalších pokusech pracovali již s čerstvou krví, nicméně výsledek byl obdobný výsledku u prvního pokusu a nebyla pozorována žádná nápadně odlišitelná populace. Pro oddělení lymfocytů byla při druhém pokusu použita jednokroková gradientová metoda. Vhodnější by mohl být postup, pomocí kterého lze oddělit nejen lymfocyty a monocyty, ale také heterofily, bazofily a eosinofily, a to v různém poměru v 5 oddělených frakcích (Mills & Wilcox, 1993), tento postup byl však dohledán až po provedení všech tří cytometrických pokusů. Čerstvá krev, popř. čerstvá slezina či jiná tkáň je k tomuto měření vhodnější a lépe odráží podmínky, které byly původně nastaveny pro kachní buňky (Kothlow *et al.*, 2005), a proto jsme pro účely třetího pokusu zvolili kachní slezinu.

Při třetím pokusu byly pomocí L/D markeru označeny i mrtvé buňky. Všechna měření včetně kontroly vyšla v pořádku, avšak interpretace je problematická. Jediný rozdíl u všech vzorků se specifickou protilátkou oproti negativní kontrole byl v signálu, který vykazovala malá populace malých buněk či buněčného „debris“ (buněčných zbytků). U všech vzorků s primární protilátkou byla více než polovina této populace složená z mrtvých buněk/zbytků. Zato u negativní kontroly byly tyto buňky/zbytky živé. Pokus je nutné zopakovat, a v tuto chvíli lze pouze konstatovat, že pomocí průtokové cytometrie nebyla potvrzena reaktivita používaných specifických protilátek s kachním modelem.

Použitím vhodného spektra protilátek a optimalizací postupu by průtoková cytometrie v budoucnu mohla pomoci při analýze změn v zastoupení buněk a cytokinů v průběhu infekce v cílové tkáni – nosní sliznici.

#### 4.5 Histochemická značení lektiny

Na řezech nosní sliznicí kachny bylo vyzkoušeno také značení lektinovými sondami. Jedná se o proteiny a glykoproteiny neenzymatické a neimunitní povahy, které plní různou funkci v živých soustavách (Jacobson & Doyle, 1996) a s vysokou vazebnou specifitou obdobnou reakci antigen-protilátka rozpoznávají sacharidy. Lektiny jsou často mitogeny schopnými stimulace dělení leukocytů (Nowell, 1960), využívají se ale také k vizualizaci přítomnosti sacharidových motivů. Práce s lektiny má řadu výhod: lektiny nejsou vázány na živočišný druh, jsou levné a sacharidy nejsou tak náchylné na ovlivnění fixací jako proteinové epitopy. Některé lektiny rozpoznávají i subpopulace lymfocytů a makrofágů na základě jejich glykosylace.

V parazitologii se lektinové sondy využívají k pozorování jednotlivých fází životního cyklu. Povrch schistosom pokrývá tzv. glykokalyx, který často nese fukosylované epitopy (Horák & Mikeš, 1995; Robijn *et al.*, 2005) a je bohatý také na D-manózu – váže se na něj lektin se specifitou k D-manóze (Klabunde *et al.*, 2000). V průběhu života dochází u jednotlivých stadií ke změnám exprese sacharidů. Po penetraci cercárie do kůže je odvrhován glykokalyx, čímž je zřejmě redukována povrchová imunoreaktivita (Chanová *et al.*, 2012; Římnáčová *et al.*, 2017; Simpson *et al.*, 1983). Změny exprese byly popsány např. i u stadií *S. mansoni* v mezhlostelském plži (Zelck & Becker, 1990) či u larev *T. szidati* (Horák, 1995). Všechny tyto změny lze pozorovat pomocí lektinů. Při schistosomóze myši byly pomocí lektinů označeny také některé sacharidové epitopy na červech či v okolí vajíček a v granulomu. Lektiny ConA, WGA a PNA rozpoznávaly sacharidy na povrchu dospělců *S. mansoni*. Granulom silně reagoval PNA a méně s ConA, který se vázal hlavně na fibrotický prstenec a okolní jaterní parenchym (Melo-Junior *et al.* 2008). Melo-Junior *et al.* (2008) podle výše uvedených vlastních výsledků i dalších studií usuzují, že by v některých případech mohlo jít o sacharidy produkované vajíčkem a inkorporované do vlastní i okolní tkáně. Při patologických procesech může rovněž docházet ke změnám glykosylace hostitelské tkáně. U pacientů trpících schistosomózou byla popsána zvýšená exprese WGA ligandů v mukóze tlustého střeva (Rego *et al.*, 2013). Pro naše pokusy byla vybrána sada lektinů, které pokrývaly co nejširší spektrum potenciálně hledaných sacharidů: CON A, PNA, UEA I, WGA, SBA, PSA, RCA, LTL.

**Konkanavalin A** (ConA; *Canavalia ensiformis*) se váže na povrchová vazebná místa lidských lymfocytů (Wands *et al.*, 1976) a podle Greenfield *et al.* (1988) je ConA vhodný pro značení tkáňových makrofágů (značí cytoplasmu) a heterofilů (označí granula a cytoplasmu) u ptáků. Konkanavalin A se ale v našem případě vázal také na většinu buněk a tkání, takže je možná vhodný pro práci v kulturách, ale méně na tkáňové řezy, a proto nebyl již dále používán.

Bez úspěchu skončila také aplikace lektinů UEA I, WGA, SBA, PSA. **UEA-I** (*Ulex europaeus*) by měl dobře značit endotel krevních cév (Miettinen *et al.*, 1983), ale u našich vzorků nebyl patrný žádný signál. Při použití **SBA** nebylo na vzorcích kromě krevních sraženin možné nic identifikovat, což by mohlo být způsobeno sializací T lymfocytů (Reisner *et al.*, 1976). Při aplikaci **WGA** byly patrné skořápky a povrch miracidia, a také **PSA** označil skořápky. U těchto lektinů nebylo provedeno kontrolní značení s inhibítorem.

Použitím lektinů PNA, RCA a LTL došlo k výraznějšímu označení zejména infiltrovaných buněk, které podle jader považujeme zpravidla za granulocyty, a mucinózních žláz na povrchu nosní sliznice, a proto byly u nich aplikovány i inhibitorové kontroly. Toxický **RCA-1** (*Ricinus communis*) se vázal i na skořápky vajíček, vitelinní buňky ve vajíčkách a na povrch miracidia. Při použití inhibitoru se však ukázalo, že specifická byla pouze vazba na mucinózní žlázy kachen, přestože dle literatury by se měl vázat také na povrch makrofágů (v CNS na mikrogliu) a na endotel (Brojer *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2002). **PNA** (*Arachis hypogaea*) se rovněž dobře váže na různé tkáně, v našem případě byla situace podobná jako u RCA-I s výrazně reagujícími mucinózními žlázami a granulocyty a použití inhibitoru ukázalo specifitu jen u mucinózních žláz. LTL se v krvi vázal na granulocyty, taktéž ve slezině a nosní sliznici, a na povrch a dvě laterální žlázy u miracidia, a to ve všech případech nespecificky. Je možné, že sacharidové epitopy jsou zamaskované. Nicméně závěrem je třeba říci, že pomocí lektinů nebyly ve tkáni odhaleny dobře identifikovatelné struktury se specifickou vazbou lektinů.

## ZÁVĚR

Pro detailnější prozkoumání nosní sliznice kachen nakažených ptačí motolicí *Trichobilharzia regenti* posloužila histologická barvení a protilátkové sondy, pomocí kterých byly identifikovány některé imunitní buněčné procesy v infikované tkáni *in situ*. Lektinové sondy se neosvědčily.

Diplomová práce potvrdila následující literární údaje:

- Dospělí červi *T. regenti* se v nosní sliznici kachny nachází minimálně od 14. do 26. dne po infekci (dpi). Červi migrují nejdříve oblastí protkanou venózní pletení blíže chrupavce. Většina prvních vajíček se nachází v této oblasti a až v pozdějších fázích se vajíčka objevují častěji i v řídkém kolagenním vazivu. Při migraci červ poškozuje endotel cév a regurgituje hemozoin.
- Husté i řídké kolagenní vazivo obsahuje již od 14. dpi masivní infiltrát imunitních buněk. Ve tkáni se nejdříve nachází lymfocyty, makrofágy a žírné buňky, od 16. dpi je možné nalézt i plasmatické buňky a obří vícejaderné buňky. Makrofágy (histiocyty) se od 16. dpi nacházejí v bezprostřední blízkosti vajíček („epiteloidní buňky“) a od 22. dpi i kolem prázdných skořápek. Lymfocyty vytváří v řídkém vazivu „difúzní lymfatickou tkáň“, kde dochází k dělení a diferenciaci dalších lymfocytů.
- Mezi vaječnými snůškami se již od 14. dpi objevují nekrotické oblasti s granulocyty, častější jsou v pozdějších fázích infekce, a 26. dpi se vyskytují i poškozená vajíčka. Přítomnost granulocytů byla prokázána imunohistochemickou detekcí již od 14. dpi a histologickým barvením od 22. dpi.
- Kolem snůšek dochází ke tvorbě orientovaných kolagenních vláken, která jsou výraznější v pozdějších fázích infekce a v hustém kolagenním vazivu.

Diplomová práce přinesla tato nová zjištění:

- Vajíčka schistosom *T. regenti* jsou kladena i do lumenu cév, u kterých je patrné poškození endotelu. Vajíčka jsou v cévě opouzdřena kromě makrofágů také fibroblasty a extracelulární matrix, a to hlavně od 22. dpi.
- Tkáň je od 14. dpi infiltrovaná KUL01 pozitivními buňkami a pozitivní signál se vyskytuje i v nekrotických oblastech kolem vajíček. Podle segmentovaného jádra se jedná zřejmě o granulocyty.
- Pod bazální laminou nazálního epitelu se při infekci nachází oproti zdravé tkáni zvýšené počty CD4 T lymfocyty, které jsou často protáhlé či panožkovité a mají velké kulaté jádro.

Další výzkum v této oblasti by vyžadoval užší spolupráci s imunology, s jejichž pomocí by bylo možné vytvořit spolehlivé a specifické protilátkové sondy, které by mohly objasnit účast jednotlivých typů imunitních buněk v přítomnosti parazita. Rozšíření spektra o nově vyvinuté specifické protilátky by pak mohlo být užitečné také pro studium jiných infekcí u kachen, respektive vrubozobých ptáků.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aMF	alternativně aktivované makrofágy
APC	antigen prezentující buňka; angl. antigen-presenting cell
BAFF	aktivační faktor B lymfocytů; angl. B-cell activating factor
BIP	blokační a inkubační pufr
BSA	bovinní sérum albumin
CNS	centrální nervová soustava
ConA	lektin konkavalin A; zdroj <i>Canavalia ensiformis</i>
CRIT	angl. complement C2 receptor inhibitory trispanning
DAF	angl. decay-accelerating factor
DAFA	Davidsonova fixáž; angl. Davidson AFA fixative
DAPI	fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenylindol
DC	dendritická buňka; angl. dendritic cell
DMSO	dimethylsulfoxid
DNPH	dinitrofenylhydrazin
dpi	dny po infekci
ES produkty	exkrementně-sekrecní produkty
EtOH	etanol
FITC	fluorescein-izo-thiokyanát
IAb	primární protilátka
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IIAb	sekundární protilátka
IL	interleukin
iNOS	inducibilní NO syntáza
IPSE	angl. IL-4 inducing principle form <i>S. mansoni</i>
K	kontrola
kMF	klasicky aktivované makrofágy
LTL	lektin; zdroj <i>Lotus tetragonobolus</i>
MALT	angl. mucosal-associated lymphoid tissue
MHC	hlavní histokompatibilní komplex; angl. major histocompatibility complex
Mo/MF	buňky monocyto-makrofágové řady
<i>n.</i>	<i>nervus</i>
NALT	angl. nasal-associated lymphoid tissue
NGS	kozí sérum; angl. normal goat serum
NO	oxid dusnatý
OCT	kryoprezervativní médium
p.i.	po infekci
PAS	Periodic Acid Schiff

PBMC	jednojaderné krevní buňky; angl. peripheral blood mononuclear cell
PBS	fosfátový pufr; angl. phosphate buffered saline
PD-L2	programmed cell death ligand 2
PGD2	prostaglandin D2
PNA	lektin; zdroj <i>Arachis hypogaea</i>
PSA	lektin; zdroj <i>Pisum sativum</i> )
R/T	pokožová teplota; angl. room temperature
RCA-I	lektin; zdroj <i>Ricinus communis</i>
RIG-I-like r.	receptor; angl. retinoic acid-inducible gene-I-like receptor
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
<i>S.</i>	<i>Schistosoma</i>
SBA	lektin sojový; zdroj <i>Glycine max</i>
SCIP	angl. schistosome complement inhibitory protein
SMAF	apoptický faktor; angl. <i>S. mansoni</i> -derived apoptosis-inducing factor
<i>T.</i>	<i>Trichobilharzia</i>
TBS	Tris pufr; angl. Tris-buffered saline
TCR	receptor T lymfocytů; angl. T-cell receptor
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Th	pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptor
TNF	faktor nádorové nekrózy; angl. tumor necrosis factor
Treg	regulační T lymfocyty
UEA-I	lektin; zdroj <i>Ulex europaeus</i>
VCAM-1	endotel adhezivní molekuly; angl. vascular cell adhesion molecule 1
WGA	lektin; zdroj <i>Triticum vulgare</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace; angl. World Health Organization

## LITERATURA

- Abdulla, M. H., Lim, K. C., McKerrow, J. H. and Caffrey, C. R. (2011). Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*, **8**, 942-949.
- Alam, I., Goldeck, D., Larbi, A. and Pawelec, G. (2012). Flow cytometric lymphocyte subset analysis using material from frozen whole blood. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, **33**, 128-139.
- Aldhoun, J. A., Podhorský, M., Holická, M. and Horák, P. (2012). Bird schistosomes in planorbid snails in the Czech Republic. *Parasitology International*, **61**, 250-259.
- Amaral, K. B., Silva, T. P., Dias, F. F., Malta, K. K., Rosa, F. M., Costa-Neto, S. F., Gentile, R. and Melo, R. C. N. (2017). Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE*, **12**, 20.
- Andrade, Z. A., Baptista, A. P. and Santana, T. S. (2006). Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 267-272.
- Andrade, Z. A., Peixoto, E., Guerret, S. and Grimaud, J. A. (1992). Hepatic connective-tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis. *Human Pathology*, **23**, 566-573.
- Angeli, W., Faveeuw, C., Delerive, P., Fontaine, J., Barriera, Y., Franchimont, N., Staels, B., Capron, M. and Trottein, F. (2001). *Schistosoma mansoni* induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection. *European Journal of Immunology*, **31**, 2751-2761.
- Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M. and Trottein, F. (2001). Role of the parasite-derived PGD2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *The Journal of Experimental Medicine*, **193**, 1135-1148.
- Barber, M. R. W., Aldridge, J. R., Webster, R. G. and Magor, K. E. (2010). Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 5913-5918.
- Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002). Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, **14**, 380-383.
- Baumgart, M., Tompkins, F., Leng, J. and Hesse, M. (2006). Naturally occurring CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *Journal of Immunology*, **176**, 5374-5387.
- Berry, A., Fillaux, J., Martin-Blondel, G., Boissier, J., Iriart, X., Marchou, B., Magnaval, J. and Delobel, P. (2016). Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance*, **21**, 7-10.
- Berry, A., Mone, H., Iriart, X., Mouahid, G., Aboo, O., Boissier, J., Fillaux, J., Cassaing, S., Debuissou, C., Valentin, A., Mitta, G., Theron, A. and Magnaval, J. F. (2014). Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 1595-1597.
- Bertram, E. M., Wilkinson, R. G., Lee, B. A., Jilbert, A. R. and Kotlarski, I. (1996). Identification of duck T lymphocytes using an anti-human T cell (CD3) antiserum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **51**, 353-363.
- Bílková, B., Bainová, Z., Janda, J., Zita, L. and Vinkler, M. (2017). Different breeds, different blood: Cytometric analysis of whole blood cellular composition in chicken breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **188**, 71-77.
- Birck, M., Pors, S., Johansen M. and Iburg, T. (2006). Distribution of mast cells in relation to *Schistosoma japonicum* induced lesions in pigs. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **37**, 630-40.
- Blažová, K. and Horák, P. (2005). *Trichobilharzia regenti*: The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International*, **54**, 167-172.
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., Toulza, E., Barre-Cardi, H., Rollinson, D., Kincaid-Smith, J., Oleaga, A., Galinier, R., Foata, J., Rognon, A., Berry, A., Mouahid, G., Henneron, R., Mone, H., Noel, H. and Mitta, G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infectious Diseases*, **16**, 971-979.

- Botelho, M. C., Oliveira, P. A., Vieira, P., Delgado, M. D., Lourenco, L., Lopes, C., Machado, J. C. and da Costa, J. M. C.** (2010). Granulomatous-like immune reaction and hepatic fibrosis induced by *Schistosoma haematobium* immature worms. *Virulence*, **1**, 123-129.
- Brandt, L. J.** (2011). *Schistosoma japonicum* showing flat colon polyp appearance. *Gastrointestinal Endoscopy*, **73**, 820-822.
- Brojer, C., Agren, E. O., Uhlhorn, H., Bernodt, K., Jansson, D. S. and Gavier-Widen, D.** (2012). Characterization of encephalitis in wild birds naturally infected by highly pathogenic avian influenza H5N1. *Avian Diseases*, **56**, 144-152.
- Brojer, C., Agren, E. O., Uhlhorn, H., Bernodt, K., Morner, T., Jansson, D. S., Mattsson, R., Zohari, S., Thoren, P., Berg, M. and Gavier-Widen, D.** (2009). Pathology of natural highly pathogenic avian influenza H5N1 infection in wild tufted ducks (*Aythya fuligula*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, 579-587.
- Brooks, R. L., Bounous, D. I. and Andreassen, C. B.** (1996). Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International*, **6**, 153-159.
- Brunet, J., Pfaff, A. W., Hansmann, Y., Gregorowicz, G., Pesson, B., Abou-Bacar, A. and Candolfi, E.** (2015). An unusual case of hematuria in a French family returning from Corsica. *International Journal of Infectious Diseases*, **31**, 59-60.
- Brunet, L. R., Beall, M., Dunne, D. W. and Pearce, E. J.** (1999). Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology*, **163**, 4976-4984.
- Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, D. A. and Writing Panel, W.-I.** (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, **114**, 1-16.\*
- Bulantová, J., Macháček, T., Panská, L., Krejčí, F., Karch, J., Jahrling, N., Saghafi, S., Dodt, H. U. and Horák, P.** (2016). *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates. *Micron*, **83**, 62-71.
- Burggraaf, S., Bingham, J., Payne, J., Kimpton, W. G., Lowenthal, J. W. and Bean, A. G. D.** (2011). Increased inducible nitric oxide synthase expression in organs is associated with a higher severity of H5N1 influenza virus infection. *PLoS ONE*, **6**, 12.
- Burke, M. L., Jones, M. K., Gobert, G. N., Li, Y. S., Ellis, M. K. and McManus, D. P.** (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, **31**, 163-176. \*
- Cao, J., Liu, W. J., Xu, X. Y. and Zou, X. P.** (2010). Endoscopic findings and clinicopathologic characteristics of colonic schistosomiasis: A report of 46 cases. *World Journal of Gastroenterology*, **16**, 723-727.
- Cesari, I. M., Ballen, D. E., Perrone, T., Oriol, O., Hoebeke, J. and Bout, D.** (2000). Enzyme activities in *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. *Journal of Parasitology*, **86**, 1137-1140.
- Chanová, M. and 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., Lichtenbergová, L., Bulantová, J., Mikeš, L. and Horák, P.** (2012). *Trichobilharzia regenti*: antigenic structures of intravertebrate stages. *Central European Journal of Biology*, **7**, 83-90.
- Chen, L., Rao, K. V. N., He, Y. X. and Ramaswamy, K.** (2002). Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 34329-34335.
- Cornelissen, J., Vervelde, L., Post, J. and Rebel, J. M. J.** (2013). Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathology*, **42**, 347-364.
- Cort, W. W.** (1928). Schistosome dermatitis in the United States (Michigan). *JAMA*, 1027-1029.
- Curwen, R. S., Ashton, P. D., Sundaralingam, S. and Wilson, R. A.** (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**, 835-844.
- de Jesus, A. R., Magalhaes, A., Miranda, D. G., Miranda, R. G., Araujo, M. L., de Jesus, A. A., Silva, A., Santana, L. B., Pearce, E. and Carvalho, E. M.** (2004). Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, **72**, 3391-3397.
- de Jesus, A. R., Silva, A., Santana, L. B., Magalhaes, A., de Jesus, A. A., de Almeida, R. P., Rego, M. A. V., Burattini, M. N., Pearce, E. J. and Carvalho, E. M.** (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, **185**, 98-105.

- de Oliveira, R. B., Senger, M. R., Vasques, L. M., Gasparotto, J., dos Santos, J. P. A., Pasquali, M. A. D., Moreira, J. C. F., Silva, F. P. and Gelain, D. P. (2013). *Schistosoma mansoni* infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. *International Journal for Parasitology*, **43**, 371-379.
- Debont, J., Vanaken, D., Vercruysse, J., Franssen, J., Southgate, V. R. and Rollinson, D. (1989). The prevalence and pathology of *Schistosoma nasale* Rao, 1933 in cattle in Sri-Lanka. *Parasitology*, **98**, 197-202.
- Degen, W. G. J., van Daal, N., Rothwell, L., Kaiser, P. and Schijns, V. (2005). Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary Microbiology*, **105**, 163-167.\*
- Deng, J. S., Gold, D., LoVerde, P. T. and Fishelson, Z. (2003). Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infection and Immunity*, **71**, 6402-6410.
- Dessyn, J. F., Duquenne, S. and Hoarau, G. (2016). Incidental pseudolymphomatous bladder inflammatory polyp revealing urinary schistosomiasis. *International Journal of Infectious Diseases*, **53**, 39-40.
- Doenhoff, M. J., Curtis, R. H. C., Ngaiza, J. and Modha, J. (1990). Proteases in the schistosome life-cycle - a paradigm for tumor-metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **9**, 381-392.
- Dolečková, K., Albrecht, T., Mikeš, L. and Horák, P. (2010). Cathepsins B1 and B2 in the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*: distinct gene expression profiles and presumptive roles throughout the life cycle. *Parasitology Research*, **107**, 751-755.
- Dolečková, K., Kašný, M., Mikeš, L., Cartwright, J., Jedelský, P., Schneider, E. L., Dvorak, J., Mountford, A. P., Craik, C. S. and 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.
- Dolečková, K., Kašný, M., Mikeš, L., Mutapi, F., Stack, C., Mountford, A. P. and Horák, P. (2007). Peptidases of *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) and its molluscan host *Radix peregra* s. lat. (Lymnaeidae): Construction and screening of cDNA library from intramolluscan stages of the parasite. *Folia Parasitologica*, **54**, 94-98.
- Dvorak, J., Delcroix, M., Rossi, A., Vopálenký, V., Pospíšek, M., Šedinová, M., Mikeš, L., Sajid, B., Sali, A., McKerrow, J. H., Horák, P. and Caffrey, C. R. (2005). Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology*, **35**, 895-910.
- Ebbs, E. T., Loker, E. S., Davis, N. E., Flores, V., Veleizan, A. and Brant, S. V. (2016). Schistosomes with wings: how host phylogeny and ecology shape the global distribution of *Trichobilharzia querquedulae* (Schistosomatidae). *International Journal for Parasitology*, **46**, 669-677.
- Elmahgoub, S. (1982). Pelvic schistosomiasis and infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **20**, 201-206.
- Epstein, W. L., Fukuyama, K., Danno, K. and Kwanwong, E. (1979). Granulomatous inflammation in normal and athymic mice infected with *Schistosoma mansoni* - ultrastructural study. *Journal of Pathology*, **127**, 207-215.
- Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H. H., Hokke, C. H., van der Ham, A. J., Fitzsimmons, C. M., Doenhoff, M. J., van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., Mohrs, M., Yazdanbakhsh, M. and Schramm, G. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *Journal of Experimental Medicine*, **206**, 1673-1680.
- Fallon, P. G., Richardson, E. J., McKenzie, G. J. and McKenzie, A. N. J. (2000). Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: is a profibrotic agent. *Journal of Immunology*, **164**, 2585-2591.
- Fatima, M., Horta, M. and Ramalhinho, F. J. (1991). Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing invitro. *Journal of Experimental Medicine*, **174**, 1399-1406.
- Faveeuw, C., Gosset, P., Bureau, F., Angeli, W., Hirai, H., Maruyama, T., Narumiya, S., Capron, M. and Trottein, F. (2003). Prostaglandin D2 inhibits the production of interleukin-12 in murine dendritic cells through multiple signaling pathways. *European Journal of Immunology*, **33**, 889-898.
- Feldmeier, H., Krantz, I. and Poggensee, G. (1994). Female genital schistosomiasis as a risk-factor for the transmission of HIV. *International Journal of Std & Aids*, **5**, 368-372.
- Ferguson, A. R. (1911). Associated bilharziosis and primary malignant disease of the urinary bladder, with observations on a series of forty cases. *J. Pathol.*, **16**: 76-94.
- Ferrari, T. C. A., Moreira, P. R. R. and Cunha, A. S. (2008). Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. *Acta Tropica*, **108**, 89-97.\*

- Fölster-Holst, R., Disko, R., Rowert, J., Bockeler, W., Kreiselmaier, I. and Christophers, E.** (2001). Cercarial dermatitis contracted via contact with an aquarium: case report and review. *British Journal of Dermatology*, **145**, 638-640.
- Fraga, L. A. D., Torrero, M. N., Tocheva, A. S., Mitre, E. and Davies, S. J.** (2010). Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. *Journal of Infectious Diseases*, **201**, 464-472.
- Fu, C. L., Odegaard, J. I., Herbert, D. R. and Hsieh, M. H.** (2012). A novel mouse model of *Schistosoma haematobium* egg-induced immunopathology. *PLoS Pathogens*, **8**, 13.
- Galli, S. J., Maurer, M. and Lantz, C. S.** (1999). Mast cells as sentinels of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **11**, 53-59.\*
- Gelfand, M., Weinberg, R., and Castle, W.** (1967). Relation between carcinoma of the bladder and infestation with *Schistosoma haematobium*. *The Lancet* **289**, 1249-1251.
- Genovese, K. J., He, H. Q., Swaggerty, C. L. and Kogut, M. H.** (2013). The avian heterophil. *Developmental and Comparative Immunology*, **41**, 334-340.\*
- Glick, B., Chang, T. S. and Jaap, R. G.** (1956). The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Science*, **35**, 224-225.
- Goldring, O. L., Clegg, J. A., Smithers, S. R. and Terry, R. J.** (1976). Acquisition of human-blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clinical and Experimental Immunology*, **26**, 181-187.
- Greenfield, C. L., Sanders, F. S. and Dietert, R. R.** (1988). Detection of avian macrophages with Concanavalin A. *Avian Pathology*, **17**, 803-820.
- Gryseels, B.** (2012). Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, **26**, 383-397.\*
- Grzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F. and Sher, A.** (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, **146**, 1322-1327.
- Guan, Z. B., Ye, J. L., Dan, W. B., Yao, W. J. and Zhang, S. Q.** (2007). Cloning, expression and bioactivity of duck BAFF. *Molecular Immunology*, **44**, 1471-1476.
- Harmon, B. G.** (1998). Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science*, **77**, 972-977.\*
- He, Y. X., Chen, L. and Ramaswamy, K.** (2002). *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin. *Experimental Parasitology*, **102**, 99-108.
- Herbert, D. R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Clausen, B. E., Forster, I. and Brombacher, F.** (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, **20**, 623-635.
- Herbert, D. R., Orekov, T., Perkins, C. and Finkelma, F. D.** (2008). IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology*, **181**, 7214-7220.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R. and Maizels, R. M.** (2009). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **167**, 1-11.\*
- Hogg, K. G., Kumkate, S., Anderson, S. and Mountford, A. P.** (2003). Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c(+) and F4/80(+) cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, **71**, 3563-3571.
- Holtfreter, M. C., Mone, H., Muller-Stover, I., Mouahid, G. and Richter, J.** (2014). *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance*, **19**, 2-4.
- Horák, P.** (1995). Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. *Folia Parasitologica*, **42**, 255-265.
- Horák, P., Dvorak, J., Kolářová, L. and Trefil, L.** (1999). *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology*, **119**, 577-581.
- Horák, P. and Kolářová, L.** (2000). Survival of bird schistosomes in mammalian lungs. *International Journal for Parasitology*, **30**, 65-68.
- Horák, P. and Kolářová, L.** (2011). Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology*, **56**, 779-790.
- Horák, P., Kolářová, L. and Dvorak, J.** (1998). *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie*, **5**, 349-357.

- Horák, P. and Mikeš, L.** (1995). Cercarial surface saccharides of 6 trematode species from the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie*, **2**, 419-421.
- Horák, P., Mikeš, L., Lichtenbergová, L., Skála, V., Soldánová, M. and Brant, S. V.** (2015). Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**, 165-190.\*
- Hrádková, K. and Horák, P.** (2002). Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology*, **76**, 137-141.
- Hsu, S. Y. L., Hsu, H. F., Penick, G. D., Hanson, H. O., Schiller, H. J. and Cheng, H. F.** (1979). Immunoglobulin-E, mast cells, and eosinophils in the skin of rhesus monkeys immunized with X-irradiated cercariae of *Schistosoma japonicum*. *International Archives of Allergy and Immunology*, **59**, 383-393.
- Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F. and Voehringer, D.** (2010). Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood*, **116**, 3311-3320.
- Hulspas, R., O'Gorman, M. R. G., Wood, B. L., Gratama, J. W. and Sutherland, D. R.** (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, **76B**, 355-364.\*
- Hussein, A. M. T., Magd, A. M. A., Medany, S., Sherif, S. M. and Williams, C. B.** (1983). Multiple endoscopic polypectomies for schistosomal polyposis of the colon. *Lancet*, **1**, 673-674.
- Ihcworld.com:** Diff-Quick (Diff-Quik) Staining Protocol.\*\*
- Ihcworld.com:** Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells.\*\*
- Inal, J. M. and Sim, R. B.** (2000). A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Letters*, **470**, 131-134.
- Jacobson, R. L. and Doyle, R. J.** (1996). Lectin parasite interactions. *Parasitology Today*, **12**, 55-61.\*
- Javid, B., Aliyu, S. H., Save, V. E., Carmichael, A. J. and Lever, A. M. L.** (2007). Schistosomal colonic polyposis in an HIV-positive man. *AIDS*, **21**, 386-388.
- Jeurissen, S. H. M. and Janse, E. M.** (1998). The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species. *Veterinary Quarterly*, **20**, 140-143.
- Jochems, B. and Phillips, T. E.** (2015). Histological and ultrastructural studies on the conjunctiva of the barred owl (*Strix varia*). *PLoS ONE*, **10**, 19.
- Kang, H., Wang, H., Yu, Q. and Yang, Q.** (2012). Effect of intranasal immunization with inactivated avian influenza virus on local and systemic immune responses in ducks. *Poultry Science*, **91**, 1074-1080.
- Kang, H. H., Yan, M. F., Yu, Q. H. and Yang, Q.** (2014). Characterization of nasal cavity-associated lymphoid tissue in ducks. *Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, **297**, 916-924.
- Kida, H., Yanagawa, R. and Matsuoka, Y.** (1980). Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune-response. *Infection and Immunity*, **30**, 547-553.
- Kim, J. K., Negovetich, N. J., Forrest, H. L. and Webster, R. G.** (2009). Ducks: The "Trojan Horses" of H5N1 influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **3**, 121-128.\*
- King, C. L., Medhat, A., Malhotra, I., Nafeh, M., Helmy, A., Khaudary, J., Ibrahim, S., ElSherbiny, M., Zaky, S., Stupi, R. J., Brustoski, K., Shehata, M. and Shata, M. T.** (1996). Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis - IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *Journal of Immunology*, **156**, 4715-4721.
- Kini, S., Dayoub, N., Raja, A., Pickering, S., & Thong, J.** (2009). Schistosomiasis-induced male infertility. *BMJ Case Reports*, 2009.
- Klabunde, J., Berger, J., Jensenius, J. C., Klinkert, M. Q., Zelck, U. E., Kremsner, P. G. and Kun, J. F. J.** (2000). *Schistosoma mansoni*: Adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Experimental Parasitology*, **95**, 231-239.
- Klasing, K. C.** (1991). Avian inflammatory response - mediation by macrophages. *Poultry Science*, **70**, 1176-1186.
- Klopfleisch, R., Muller, C., Polster, U., Hildebrandt, J. P. and Teifke, J. P.** (2005). Granulomatous inflammation of salt glands in ducklings (*Anas platyrhynchos*) associated with intralesional Gram-negative bacteria. *Avian Pathology*, **34**, 233-237.
- Kogut, M., Rothwell, L. and Kaiser, P.** (2002). Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Developmental and Comparative Immunology*, **26**, 817-830.
- Kolářová, L., Horák, P. and Cada, F.** (2001). Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitology Research*, **87**, 644-650.

- Kolářová, L., Horák, P. and Sitko, J.** (1997). Cercarial dermatitis in focus: Schistosomes in the Czech Republic. *Helminthologia*, **34**, 127-139.
- Kolářová, L., Horák, P. and Skirnisson, 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.\*
- Kolářová, L., Skirnisson, K. and Horák, P.** (1999). Schistosome cercariae as the causative agent of swimmer's itch in Iceland. *Journal of Helminthology*, **73**, 215-220.
- Kothlow, S., Mannes, N. K., Schaerer, B., Rebeski, D. E., Kaspers, B. and Schultz, U.** (2005). Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**, 733-748.
- Kouřilová, P., Hogg, K. G., Kolářová, L. and Mountford, A. P.** (2004a). 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. and Kolářová, L.** (2004b). The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research*, **93**, 534-542.
- Krčmářová, V.** (2017). Ultrastrukturální interakce larev ptačích schistosom *Trichobilharzia regenti* s imunitními buňkami nervového systému hostitele. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie.
- Lawton, S. P., Lim, R. M., Dukes, J. P., Cook, R. T., Walker, A. J. and Kirk, R. S.** (2014). Identification of a major causative agent of human cercarial dermatitis, *Trichobilharzia franki* (Muller and Kimmig 1994), in southern England and its evolutionary relationships with other European populations. *Parasites & Vectors*, **7**, 10.
- Layland, L. E., Rad, R., Wagner, H. and Da Costa, C. U. P.** (2007). Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *European Journal of Immunology*, **37**, 2174-2184.
- Lee, Y. B., Nagai, A. and Kim, S. U.** (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of Neuroscience Research*, **69**, 94-103.
- Leutscher, P. D. C., Pedersen, M., Raharisolo, C., Jensen, J. S., Hoffmann, S., Lisse, I., Ostrowski, S. R., Reimert, C. M., Mauclore, P. and Ullum, H.** (2005). Increased prevalence of leukocytes and elevated cytokine levels in semen from *Schistosoma haematobium* infected individuals. *Journal of Infectious Diseases*, **191**, 1639-1647.
- Lichtenberg, F. and Lindenberg, M.** (1954). An alcohol-acid-fast substance in eggs of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **3**, 1066-1076.
- Lichtenbergová, L., Kolbeková, P., Kouřilová, P., Kašný, M., Mikeš, L., Haas, H., Schramm, G., Horák, P., Kolářová, L. and Mountford, A. P.** (2008). Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite Immunology*, **30**, 585-595.
- Lichtenbergová, L., Lassmann, H., Jones, M. K., Kolářová, L. and Horák, P.** (2011). *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Experimental Parasitology*, **128**, 328-335.
- Lin, C. T., Chen, C. Y., Jao, S. W. and Wu, C. C.** (2010). An unusual pedunculated polyp of the transverse colon associated with schistosomiasis. *Endoscopy*, **42**, E160-E160.
- Loeffler, D. A., Lundy, S. K., Singh, K. P., Gerard, H. C., Hudson, A. P. and Boros, D. L.** (2002). Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, **185**, 1650-1656.
- Lowry, V. K., Genovese, K. J., Bowden, L. L. and Kogut, M. H.** (1997). Ontogeny of the phagocytic and bactericidal activities of turkey heterophils and their potentiation by *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **19**, 95-100.
- Lundqvist, M. L., Middleton, D. L., Radford, C., Warr, G. W. and Magor, K. E.** (2006). Immunoglobulins of the non-galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**, 93-100.\*
- Macháček, T., Panská, L., Dvořáková, H. and Horák, P.** (2016). Nitric oxide and cytokine production by glial cells exposed in vitro to neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasites & Vectors*, **9**, 10.
- Magor, K. E., Higgins, D. A., Middleton, D. L. and Warr, G. W.** (1994). One gene encodes the heavy-chains for 3 different forms of IgY in the duck. *Journal of Immunology*, **153**, 5549-5555.



- Mast, J., Goddeeris, B. M., Peeters, K., Vandesande, F. and Berghman, L. R.** (1998). Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **61**, 343-357.
- Masteller, E. L., Larsen, R. D., Carlson, L. M., Pickel, J. M., Nickoloff, B., Lowe, J., Thompson, C. B. and Lee, K. P.** (1995). Chicken B-cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development*, **121**, 1657-1667.
- Maxwell, M. H.** (1973). Comparison of heterophil and basophil ultrastructure in 6 species of domestic birds. *Journal of Anatomy*, **115**, 187-202.
- Maxwell, M. H.** (1978). Fine structure of granules in eosinophil leukocytes from aquatic and terrestrial birds. *Tissue & Cell*, **10**, 303-317.
- McCormack, W. T., Tjoelker, L. W. and Thompson, C. B.** (1991). Avian B-cell development - generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annual Review of Immunology*, **9**, 219-241.\*
- McKee, A. S. and Pearce, E. J.** (2004). CD25(+)CD4(+) cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *Journal of Immunology*, **173**, 1224-1231.
- McKerrow, J. H. and Salter, J.** (2002). Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. *Trends in Parasitology*, **18**, 193-195.
- Melo-Junior, M. R., Cavalcanti, C. D. B., de Pontes, N. T., de Carvalho, L. B. and Beltrao, E. I. C.** (2008). Carbohydrates detection in the hepatic egg - granuloma system using lectin histochemistry. *International Journal of Morphology*, **26**, 967-972.
- Meuleman, E. A., Huyer, A. R. and Mooij, J. H.** (1984). Maintenance of the life-cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*, **34**, 414-417.
- Meyer, N. H., Mayerhofer, H., Tripsianes, K., Blindow, S., Barths, D., Mewes, A., Weimar, T., Kohli, T., Bade, S., Madl, T., Frey, A., Haas, H., Mueller-Dieckmann, J., Sattler, M. and Schramm, G.** (2015). A crystallin fold in the interleukin-4-inducing principle of *Schistosoma mansoni* eggs (IPSE/alpha-1) mediates IgE binding for antigen-independent basophil activation. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 22111-22126.
- Mickum, M. L., Rojsajakul, T., Yu, Y. and Cummings, R. D.** (2016). *Schistosoma mansoni* alpha 1,3-fucosyltransferase-F generates the Lewis X antigen. *Glycobiology*, **26**, 270-285.
- Miettinen, M., Holthofer, H., Lehto, V. P., Miettinen, A. and Virtanen, I.** (1983). *Ulex europaeus* I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. *American Journal of Clinical Pathology*, **79**, 32-36.
- Mikeš, L., Zidkova, L., Kašný, M., Dvorak, J. and Horák, P.** (2005). *In vitro* stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology Research*, **96**, 230-241.
- Mills, J. N. and Wilcox, G. E.** (1993). Separation of phagocytic leukocytes from the peripheral blood of chickens. *Avian Pathology*, **22**, 343-352.
- Moqbel, R., Macdonald, A. J., Cromwell, O. and Kay, A. B.** (1990). Release of leukotriene-C4 (LTC4) from human eosinophils following adherence to IgE-coated and IgG-coated schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Immunology*, **69**, 435-442.
- Muller, R. L. and Taylor, M. G.** (1972a). Specific differentiation of schistosome eggs by Ziehl-Neelsen technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **66**, 18-19.
- Muller, R. L. and Taylor, M. G.** (1972b). Use of Ziehl-Neelsen technique for specific identification of schistosome eggs. *Journal of Helminthology*, **46**, 139-142.
- Muricy, E. C. M., Lemes, R. A., Bombarda, S., Ferrazoli, L. and Chimara, E.** (2014). Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: critical aspects for bacteriological diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **56**, 397-401.
- Nair, M. G., Du, Y. R., Perrigoue, J. G., Zaph, C., Taylor, J. J., Goldschmidt, M., Swain, G. P., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A., Karow, M., Stevens, S., Pearce, E. J. and Artis, D.** (2009). Alternatively activated macrophage-derived RELM-alpha is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *Journal of Experimental Medicine*, **206**, 937-952.
- Nausch, N., Midzi, N., Mduluzi, T., Maizels, R. M. and Mutapi, F.** (2011). Regulatory and activated T cells in human *Schistosoma haematobium* infections. *PLoS ONE*, **6**, 8.
- Ngaiza, J. R. and Doenhoff, M. J.** (1990). Blood platelets and schistosome egg excretion. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **193**, 73-79.

- Nowell, P. C.** (1960). Phytohemagglutinin - an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, **20**, 462-466.
- Nyame, A. K., Lewis, F. A., Doughty, B. L., Correa-Oliveira, R. and Cummings, R. D.** (2003). Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. *Experimental Parasitology*, **104**, 1-13.
- Ohshima, K. and Hiramatsu, K.** (2000). Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chickens. *Histology and Histopathology*, **15**, 713-720.
- Ohta, S., Hanai, N., Habu, S. and Nishimura, T.** (1993). Expression of sialyl Lewis(X) antigen on human T-cells. *Cellular Immunology*, **151**, 491-497.
- Okano, M., Satoskar, A. R., Nishizaki, K. and Harn, D. A.** (2001). Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *Journal of Immunology*, **167**, 442-450.
- Oliveira, M. F., d'Avila, J. C., Torres, C. R., Oliveira, P. L., Tempone, A. J., Rumjanek, F. D., Braga, C. M. S., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M. A., de Souza, W. and Ferreira, S. T.** (2000). Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **111**, 217-221.
- Othman, A. A. and Shoheib, Z. S.** (2016). Detrimental effects of geldanamycin on adults and larvae of *Trichinella spiralis*. *Helminthologia*, **53**, 126-132.
- Palomo, L. F., DecoteRicardo, D., Pirmez, C., Vieira, R. M. and DosReis, G. A.** (1996). Ligation of CD4 concomitant to activation induces primary CD4(+) T-cell adhesion and pseudopodia formation in vitro. *Cellular Immunology*, **172**, 43-51.
- Parekh, F. K., Davison, B. B., Gamboa, D., Hernandez, J. and Branch, O. H.** (2010). Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, 973-980.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A.** (1991). Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*, **173**, 159-166.
- Pech, V.** (2013). Perorální infekce ptáků a saveců neuropatogenní motolící *Trichobilharzia regenti*. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie.
- Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., El Kasmi, K. C., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J. and Wynn, T. A.** (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Plos Pathogens*, **5**, 15.
- Pinoheiss, S., Brown, M. and McKerrow, J. H.** (1985). *Schistosoma mansoni*: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Experimental Parasitology*, **59**, 217-221.
- Prüter, H., Sitko, J. and Krone, O.** (2017). Having bird schistosomes in mind: the first detection of *Bilharziella polonica* (Kowalewski 1895) in the bird neural system. *Parasitology Research*, **116**, 865-870.
- Radi, R.** (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4003-4008.\*
- Rego, M., Vieira-De-Mello, G. S., Araujo, C. W., Cavalcanti, M. D. D. and Beltrao, E. I. C.** (2013). Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **55**, 213-215.
- Reisner, Y., Ravid, A. and Sharon, N.** (1976). Use of Soybean agglutinin for separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **72**, 1585-1591.
- Richards, O.W.** (1941) The staining of acid-fast tubercle bacteria. *Science*. 93:190.
- Řimnáčová, J., Mikeš, L., Turjanicová, L., Bulantová, J. and Horák, P.** (2017). Changes in surface glycosylation and glycocalyx shedding in *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) during the transformation of cercaria to schistosomulum. *PLoS ONE*, **12**, 20.
- Robijn, M. L. M., Koeleman, C. A. M., Hokke, C. H. and Deelder, A. M.** (2007). *Schistosoma mansoni* eggs excrete specific free oligosaccharides that are detectable in the urine of the human host. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **151**, 162-172.
- Robijn, M. L. M., Wuhrer, M., Kornelis, D., Deelder, A. M., Geyer, R. and Hokke, C. H.** (2005). Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. *Parasitology*, **130**, 67-77.

- Rodriguez-Guardado, A., Miquel, R., Perez, F., Fresno, M. and Corachan, M. (2010). Colonic polyposis due to *Schistosoma intercalatum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**, 443-445.
- Ross, A. G., McManus, D. P., Farrar, J., Hunstman, R. J., Gray, D. J. and Li, Y. S. (2012). Neuroschistosomiasis. *Journal of Neurology*, **259**, 22-32.\*
- Sakai, H., Okafuji, I., Nishikomori, R., Abe, J., Izawa, K., Kambe, N., Yasumi, T., Nakahata, T., Heike, T. (2012) The CD40–CD40L axis and IFN- $\gamma$  play critical roles in Langhans giant cell formation, *International Immunology*, **24**, 5-15.
- Salter, J. P., Lim, K. C., Hansell, E., Hsieh, I. and McKerrow, J. H. (2000). Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 38667-38673.
- Sanin, D. E. and Mountford, A. P. (2015). Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. *Parasites & Vectors*, **8**, 12.
- Schat, K. A., Kaspers, B., Kaiser, P. (2014). Avian immunology, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier Ltd., 439 str., ISBN: 978-0-12-396965-1.\*
- Schneider, K., Kothlow, S., Schneider, P., Tardivel, A., Gobel, T., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2004). Chicken BAFF - a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *International Immunology*, **16**, 139-148.
- Schramm, G., Mohrs, K., Wodrich, M., Doenhoff, M. J., Pearce, E. J., Haas, H. and Mohrs, M. (2007). Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent antigen-independent IL-4 production by murine basophils *in vivo*. *Journal of Immunology*, **178**, 6023-6027.
- Schwartz, C., Oeser, K., da Costa, C. P., Layland, L. E. and Voehringer, D. (2014). T Cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *Journal of Immunology*, **193**, 3590-3599.
- Secor, W. E., Shah, A., Mwinzi, P. M. N., Ndenga, B. A., Watta, C. O. and Karanja, D. M. S. (2003). Increased density of human immunodeficiency virus type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on the surfaces of CD4(+) T cells and monocytes of patients with *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, **71**, 6668-6671.
- Shariati, F., Perez-Arellano, J. L., Carranza, C., Lopez-Aban, J., Vicente, B., Arefi, M. and Muro, A. (2011). Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Experimental Parasitology*, **128**, 44-49.
- Sharp, G. B., Kawaoka, Y., Wright, S. M., Turner, B., Hinshaw, V. and Webster, R. G. (1993). Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A-subtypes. *Epidemiology and Infection*, **110**, 161-176.
- Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., Scott, P. and Cheever, A. W. (1990). Interleukin-5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma-formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 61-65.
- Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. and Mosmann, T. (1991). Production of IL-10 by CD4+ lymphocytes T correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *Journal of Immunology*, **147**, 2713-2716.
- Sher, A., Hall, B. F. and Vadas, M. A. (1978). Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*, **148**, 46-57.
- Simpson, A. J. G., Correaoiveira, R., Smithers, S. R. and Sher, A. (1983). The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation *in vivo*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **8**, 191-205.
- Singh, K. P., Gerard, H. C., Hudson, A. P., Reddy, T. R. and Boros, D. L. (2005). Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*, **114**, 410-417.
- Srivatsan, J., Smith, D. F. and Cummings, R. D. (1992). The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis-X antigen. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 20196-20203.
- Staines, K., Hunt, L. G., Young, J. R. and Butter, C. (2014). Evolution of an expanded mannose receptor gene family. *PLoS ONE*, **9**, 10.
- Sun, Q., Li, W., She, R., Wang, D., Han, D., Li, R., Ding, Y. and Yue, Z. (2009). Evidence for a role of mast cells in the mucosal injury induced by Newcastle disease virus. *Poultry Science*, **88**, 554-561.

- Trottein, F., Nutten, S., Angeli, V., Delerive, P., Teissier, E., Capron, A., Staels, B. and Capron, M.** (1999). *Schistosoma mansoni* schistosomula reduce E-selectin and VCAM-1 expression in TNF-alpha-stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with the NF-kappa B pathway. *European Journal of Immunology*, **29**, 3691-3701.
- Trottein, F., Nutten, S., Papin, J. P., Leportier, C., PoulainGodefroy, O., Capron, A. and Capron, M.** (1997). Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *Journal of Immunology*, **159**, 804-811.
- Truscott, M., Evans, D. A., Gunn, M. and Hoffmann, K. F.** (2013). *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of *Retnla* expression and secretion. *Infection and Immunity*, **81**, 133-142.
- Turjanicová, L., Mikeš, L., Pecková, M. and Horák, P.** (2015). Antibody response of definitive hosts against antigens of two life stages of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasites & Vectors*, **8**, 11.
- Vainio, O., Riwar, B., Brown, M. H. and Lassila, O.** (1991). Characterization of the putative avian CD2 homolog. *Journal of Immunology*, **147**, 1593-1599.
- Valdovinos, C. and Balboa, C.** (2008). Cercarial dermatitis and lake eutrophication in south-central Chile. *Epidemiology and Infection*, **136**, 391-394.
- Valsala, K. V., Jarplid, B. and Hansen, H. J.** (1986). Distribution and ultrastructure of mast-cells in the duck. *Avian Diseases*, **30**, 653-657.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J., Kruize, Y. C. M., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock, D. T., Tielens, A. G. M. and Yazdanbakhsh, M.** (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk - Schistosomal lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 48122-48129.
- Vandam, G. J., Bergwerff, A. A., Thomasoates, J. E., Rotmans, J. P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. and Deelder, A. M.** (1994). The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis-X as repeating unit. *European Journal of Biochemistry*, **225**, 467-482.
- Vectorlabs.com:** Lektins and Glycobiology – brožura.\*\*
- Velupillai, P., dos Reis, E. A., dos Reis, M. G. and Harn, D. A.** (2000). Lewis(X)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. *Human Immunology*, **61**, 225-232.
- Vieira, S., Belo, S., & Hänscheid, T.** (2016). Ziehl-Neelsen in schistosomiasis: Much more than staining the shell and species identification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**(4), 699-700.
- Vinkler, M., Svobodová, J., Gabrielová, B., Bainová, H. and Bryjová, A.** (2014). Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. *Journal of Avian Biology*, **45**, 43-50.
- Von Lichtenberg, F., Erickson, D. G., & Sadun, E. H.** (1973). Comparative histopathology of schistosome granulomas in the hamster. *The American Journal of Pathology*, **72**(2), 149-178.
- Wands, J. R., Podolsky, D. K. and Isselbacher, K. J.** (1976). Mechanism of human lymphocyte stimulation by Concanavalin-A - role of valence and surface binding-sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**, 2118-2122.
- Wang, D. C., Xiong, J. M., She, R. P., Liu, L. Q., Zhang, Y. M., Luo, D. M., Li, W. G., Hu, Y. X., Wang, Y. H., Zhang, Q. and Sun, Q.** (2008). Mast cell mediated inflammatory response in chickens after infection with very virulent infectious bursal disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **124**, 19-28.
- Warren, K. S., Mahmoud, A. A. F., Cummings, P., Murphy, D. J. and Houser, H. B.** (1974). Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California - duration of infection, presence of disease, therapeutic management. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **23**, 902-909.
- Weinstock, J. V., Summers, R. W. and Elliott, D. E.** (2005). Role of helminths in regulating mucosal inflammation. *Springer Seminars in Immunopathology*, **27**, 249-271.\*
- Wells, L. L., Lowry, V. K., DeLoach, J. R. and Kogut, M. H.** (1998). Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Developmental and Comparative Immunology*, **22**, 103-109.
- Wuhrer, M., Balog, C. I. A., Catalina, M. I., Jones, F. M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M. J., Dunne, D. W., Deelder, A. M. and Hokke, C. H.** (2006). IPSE/alpha-1, a major secretory

- glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *FEBS Journal*, **273**, 2276-2292.
- Xiao, S. H. and Sun, J.** (2017). Schistosoma hemozoin and its possible roles. *International Journal for Parasitology*, **47**, 171-183.\*
- Xu, Y. Z., Shawar, S. M. and Dresden, M. H.** (1990). *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. *Experimental Parasitology*, **70**, 124-133.
- Young, J. R., Davison, T. F., Tregaskes, C. A., Rennie, M. C. and Vainio, O.** (1994). Monomeric homolog of mammalian CD28 is expressed on chicken T-cells. *Journal of Immunology*, **152**, 3848-3851.
- Zelck, U. and Becker, W.** (1990). Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. *Journal of Invertebrate Pathology*, **55**, 93-99.
- Zhu, J. F., Xu, Z. P., Chen, X. J., Zhou, S., Zhang, W. W., Chi, Y., Li, W., Song, X., Liu, F. and Su, C.** (2014). Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasites & Vectors*, **7**, 9.
- Zulkifli, I. and Siegel, P. B.** (1994). Heterophil to lymphocyte ratios during perinatal and neonatal stages in chickens. *British Poultry Science*, **35**, 309-313.

\*) označuje sekundární citace

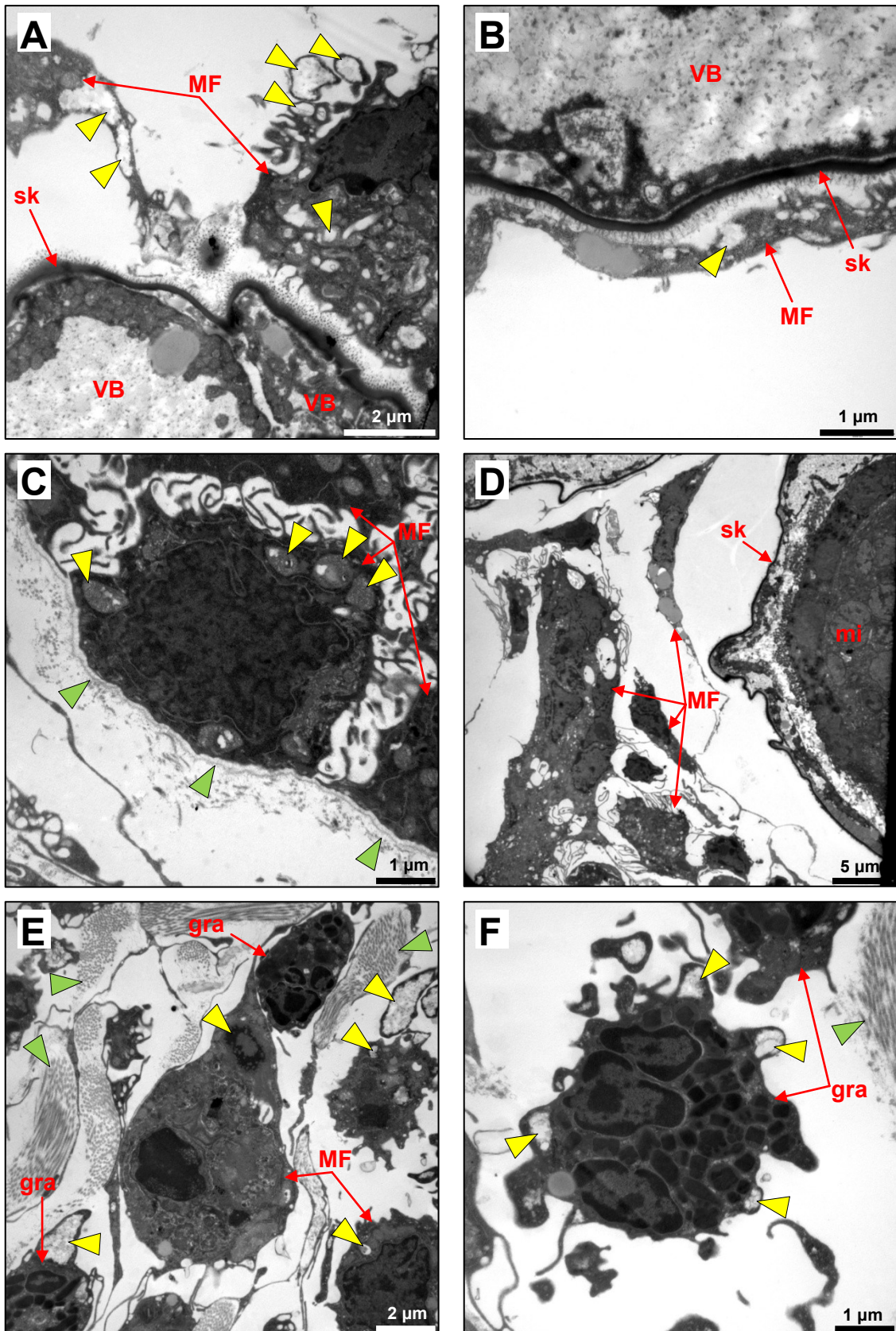
\*\*) označují internetové zdroje

## PŘÍLOHY

V příloze uvádíme jako doplňující fotodokumentaci ke kapitole DISKUZE dosud nepublikované výsledky pilotních pokusů Bc. Kateřiny Svobodové, která se v naší laboratoři věnuje elektronmikroskopickému hodnocení nazálních infekcí kachen motolicí *T. regenti*. Fotografie i text postupu jsou použity se souhlasem autorky (K. Svobodová 2018, nepublikováno). Fotografie z TEM mají podpořit naše závěry histologického a imunohistochemického hodnocení infikované tkáně.

Studovaná tkáň (nosní skořepa) byla vyjmuta ze zobáku kachny nakažené *T. regenti* 19. dpi, rozstříhána na cca 1x2 mm kousky z oblastí s petechiemi a fixována v 2,5% glutaraldehydu v HEPES pufru přes noc při pokojové teplotě. Poté byla tkáň 3x 10 minut promyta promývacím pufrům (obsah: 400 mM HEPES a 150 mM NaCl), postfixována 1 hodinu v 1% OsO<sub>4</sub> a znovu 3x 10 minut promyta promývacím pufrům. Následovalo odvodnění pomocí vzestupné alkoholové řady (30, 50, 70, 80, 96% EtOH po 10 minutách a 3x 100% EtOH a 3x aceton po 5 minutách), po kterém byla tkáň postupně prosycována pryskyřicí SPURR (SPI-CHEM) s acetonem v poměrech: 1:3 2 hodiny, 1:1 6 hodin, 3:1 12 hodin a čistou pryskyřicí SPURR 3x 12 hodin. Poté byla tkáň umístěna do silikonové formy a zalita čistou pryskyřicí SPURR, která polymerovala 48 hodin v 60°C. Bločky byly po kontrole pod světelným mikroskopem předány servisnímu pracovišti (Laboratoř elektronové mikroskopie, PřF UK), kde byly vytvořeny ultratenké řezy o tloušťce 60-70 nm. Řezy byly přeneseny na měděné elektronmikroskopické síťky potažené formvarovou blánou a poté standardně kontrastovány uranyl acetátem a citrátem olova. Takto zpracované vzorky byly pozorovány pod transmisním elektronovým mikroskopem (TEM JEOL 1011). Fotografie byly upraveny v programu Zoner Photo Studio 14 PRO.

Vajíčka byla nalezena ve tkáni (Obr. 20 D) i v cévách (Obr. 20 A, B). V některých se nacházely vitelinní buňky, v jiných už bylo možné pozorovat miracidium a podskořápkovou vrstvu. Vajíčka v cévách i ve tkáni byla obklopena makrofágy a ve tkáni byly pozorovány také velké útvary s více jádry a spojenou cytoplasmou, resp. obří vícejaderné buňky, tvořené zřejmě původními makrofágy (Obr. 20 D). Vajíčka se patrně vlivem nevhodné fixáže smršťují, proto se může zdát, že tkáň a buňky k sobě nepřiléhají těsně. Granulocyty byly přítomny v cévách i ve tkáni, ale nenacházely se na rozdíl od makrofágů v těsné blízkosti vajíček. Ve tkáni byly častěji pozorovány granulocyty s granuly obsahujícími krystalinní kosodélníkový útvar. Podle granulí by tyto buňky odpovídaly eozinofilům, jaké měli např. čája bělolící (*Chauna chavaria*) nebo husovec strakatý (*Anseranas semipalmata*) (Maxwell, 1978). Heterofily kachen byly popsány jako buňky obsahující oválná granula s malými centrálními denzními tělísky (Maxwell, 1973), takové buňky se v námi pozorované tkáni vyskytovaly jen velmi málo. Makrofágy a granulocyty přítomné ve tkáních i cévách obsahovaly fagocytovaný materiál (Obr. 20 C, E, F).



Obr. 20: TEM snímky nosní sliznice kachny napadené *T. regenti*, 19 dpi.

VB – vitelinní buňky; MF – makrofágy; sk – skořápka vajíčka; gra – granulocyty; mi – miracidium ve vajíčku; ► – fagocytovaný materiál; ► – kolagenní vlákna řídkého vaziva.