

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Parasitology**

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie**

Ph.D. study program: Parasitology

Doktorský studijní program: Parazitologie

Summary of the Ph.D. Thesis / Autoreferát dizertační práce



**Development of surface and body musculature of the bird
schistosome *Trichobilharzia regenti***

**Vývoj povrchu a tělní svaloviny u ptačí schistosomy
*Trichobilharzia regenti***

Mgr. Jana Bulantová

Supervisor / Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Prague 2012

Ph.D. Thesis / Dizertační práce

- **Development of surface and body musculature of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti***
- Vývoj povrchu a tělní svaloviny u ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti*

Program / Studijní program: **Parasitology / Parazitologie**

Author / Autor: **Mgr. Jana Bulantová**

Supervisor / Školitel: **Prof. RNDr. Petr Horák, PhD.**

Reviewers / Oponenti:

- **Ing. Jana Nebesářová, CSc.** (Parazitologický ústav BC AV ČR, České Budějovice, CZ)
- **Prof. Rafael Toledo** (Department of Parasitology, University of Valencia, Spain)

English version / Anglická verze

CONTENT

Abstract.....	4
Introduction.....	5
Aims of the thesis.....	7
Material and methods.....	8
List of original papers.	8
Conclusions	9

Czech version / Česká verze

OBSAH

Abstrakt	12
Úvod.....	13
Cíle práce.	15
Materiál a metodika.	16
Seznam publikovaných článků.....	16
Závěr	17
References / Seznam použité literatury	19
Curriculum vitae	20

ABSTRACT

Description of *Trichobilharzia regenti* as a new species of nasal bird schistosome in 1998 was only the first step in our knowledge of this extraordinary parasite. Natural definitive hosts of *T. regenti* are anseriform birds, but infective larvae – cercariae – are able to penetrate also into mammalian hosts including humans. There they are causative agents of hypersensitive skin immune reaction called cercarial dermatitis or swimmer's itch.

Contrary to other schistosomes, miracidia of *T. regenti* hatch directly inside the definitive host tissue. Schistosomula migrate through the nervous system of vertebrates and, together with adult worms, they have predominantly extravascular localization in definitive hosts. Adult worms have a short lifespan and low degree of sexual dimorphism, connected with lower dependence of adult females on long-term contact with males.

During the life cycle, *T. regenti* can be found within three different environments (freshwater, tissue of intermediate molluscan host and tissue of vertebrate host). Each of the seven developmental stages has a different role in the life cycle which corresponds with different organization of various organ systems.

The introductory part of the thesis is focused entirely on ontogenetic changes of surface ultrastructure and body musculature of particular stages of *T. regenti* and other (especially human) schistosomes. The attached publications are then concentrated on tegumental transformation of schistosomula *in vitro*, changes in arrangement of body musculature during *T. regenti* life cycle and localization of dominant antigenic structures on the surface and in the body of cercariae, schistosomula and adult worms of *T. regenti*.

Due to close taxonomical relationship and similar life cycle, many characteristics of surface tegument and body musculature of *T. regenti* resemble those of human schistosomes. Mechanism of gradual transformation of the cercarial head organ to the oral sucker of schistosomula, or presence of radial muscle fibers in cercarial body and subsequent increase of their number in schistosomula and adult worms have newly been described for *T. regenti*. Based on photodocumentation from accessible articles, the above mentioned changes of muscle organization concern not only *T. regenti*, but presumably also the entire family Schistosomatidae.

The most apparent differences between the teguments of human schistosomes and *T. regenti* can be found in adult worms. While in human schistosomes the male tegument has usually more complicated topography compared to females, both genders of *T. regenti* show similar tegumental ultrastructure.

INTRODUCTION

Schistosomes are ranked among the most important parasitic helminths with a significant pathological effect on millions of people in tropical areas worldwide. Except for human schistosomes, the family Schistosomatidae also contains numerous representatives, which parasitize in adulthood a wide range of other worm-blooded vertebrate hosts. Among them, approximately 40 species of bird schistosomes belonging to the genus *Trichobilharzia* can be found (Blair and Islam 1983).

Although members of the genus *Trichobilharzia* are bird schistosomes, and their natural definitive hosts are birds, infective larvae (cercariae) can infect also mammals including humans. Cercariae penetrating into the host skin from water milieu are responsible for subsequent local inflammatory immune reaction known as cercarial dermatitis or swimmer's itch. These symptoms are reported from many countries all over the world, including those in temperate zone (Kolářová *et al.* 1999). The number of outbreaks in new regions increases during the last years, and cercarial dermatitis can therefore be regarded as an emerging disease (Horák and Kolářová 2011).

The above mentioned host immune reaction can entrap and eliminate parasites in the skin (Kouřilová *et al.* 2004), but not all parasites are always destroyed. Under certain circumstances some of them may continue with their migration (Horák *et al.* 1999, Hrádková and Horák 2002). While migration in specific host is usually terminated by adulthood of parasites, larvae penetrating into an accidental host develop slower without reaching maturity (Blažová and Horák 2005). In species where the migratory way leads through vital organs the infection can cause serious problems to the host.

This is also the case of *T. regenti*. This species belongs to a small group of schistosomatid species where definitive localization of adult worms is in the nasal tissue (Horák *et al.* 1998a), and it is the only one where a strong affinity of larvae to the nervous system was confirmed (Horák *et al.* 1999). After penetration of *T. regenti* cercariae into the host skin, they transform to schistosomula and migrate through the peripheral nerves to the central nervous system. They feed on nervous tissue and destroy it mechanically by migration. This can be manifested by neuromotor disorders or leg paralysis in the specific avian as well as accidental mammalian hosts (Horák *et al.* 1999, Kolářová *et al.* 2001, Kouřilová *et al.* 2004).

Trichobilharzia regenti as a potentially dangerous pathogen with confirmed distribution in many European regions (Jouet *et al.* 2010) is an attractive target for research.

Till now, *T. regenti* was studied in detail mainly in the stage of cercaria and schistosomulum, i.e. stages that are responsible for infection of vertebrate hosts and pathology connected with intravertebrate migration through the nervous tissue. No or little attention has been paid to the other stages, for which data about ultrastructure of surface and morphology of muscles were incomplete or missing. Contrary to the immunological, pathological, taxonomical, behavioral and biochemical approaches applied to *T. regenti* in previous studies, the introductory part of the thesis presents a complex data about ultrastructure of surface, arrangement of body musculature and changes of these characteristics during ontogenetic development, from egg to adult worm.

Surface layer of schistosomes undergoes dramatic changes during development. At one moment it is adapted to the water environment, at another time to the milieu of molluscan digestive gland or vertebrate host tissue. Parasite surface represents an effective protection against unfavorable conditions outside the body, but it is also the border for transfer of various substances, mainly between host/parasite tissues or male/female worms.

Musculature of body wall underlies surface and is responsible for active movements of the worms. Radial musculature which is present inside the body of some stages probably helps with maintenance of body shape and allows keeping of internal organs in a stable position. Organs of attachment with highly developed musculature enable attachment, migration and food intake, but can be completely absent in some stages (e.g. in sporocysts).

Trichobilharzia regenti exhibits many features different from those in human schistosomes (hatching of miracidium inside the host tissue, migration of schistosomulum through the nervous tissue, predominantly extravascular localization of schistosomula and adult worms, short lifespan, low degree of sexual dimorphism, different mating strategy, etc.). Comparison of ultrastructural and morphological characteristics of our model organism with human schistosomes could help to understand particular adaptations, used by schistosomes with various life strategies.

AIMS OF THE THESIS

Trichobilharzia regenti represents extraordinary schistosome species which was studied mainly in relation to cercarial dermatitis of humans and neuropathological signs observed during migration of schistosomula through the nervous tissue of vertebrate hosts.

Bodies of cercariae, schistosomula and adult worms are known to contain various highly immunogenic molecules which are responsible for host immune reactions against parasitic worms. Nevertheless, till now, details about origin, localization and abundance of these immunogenic molecules on ultrastructural level were missing for *T. regenti*.

While cercariae of *T. regenti* can be obtained repeatedly in big amounts from infected snails, number of accessible schistosomula is limited by use of experimental vertebrate hosts. This limitation could be eliminated by introduction of confirmed cultivation methods which should allow mass production of early *T. regenti* schistosomula *in vitro* without necessity of vertebrate hosts infections.

Surface ultrastructure and arrangement of body musculature importantly differ in particular stages of parasitic worms according to external environment and role of appropriate stage in the life cycle. Mentioned characteristics were newly described and/or summarized for all developmental stages of *T. regenti* and other (especially human) schistosomes. These observations also represent the main body of introductory part of the thesis.

Particular aims of the thesis

- Localization of dominant antigenic structures on the surface and in the body of cercariae, schistosomula and adult worms of *T. regenti* using iTEM
- Evaluation of *in vitro* methods of *T. regenti* schistosomula cultivation, including ultrastructural characterization of surface changes during *in vitro* transformation of cercariae to schistosomula
- Characterization of surface ultrastructure and topography of *T. regenti* developmental stages by SEM and TEM
- Description of musculature of body wall and organs of attachment in particular stages of *T. regenti* by TEM and CLSM
- Comparison between *T. regenti* and other (especially human) schistosomes in terms of developmental changes of surface ultrastructure and arrangement of body musculature

MATERIAL AND METHODS

Present thesis is focused on ultrastructural features of surface in particular developmental stages of *T. regenti*, studied predominantly by electron microscopy. Other approach was applied for morphological characterization of musculature, where methods of immunocytochemistry and subsequent confocal microscopy were used.

Used methods can be listed as follows:

- Scanning electron microscopy (SEM)
- Transmission electron microscopy (TEM)
- Immuno-gold-labelling in TEM (iTEM)
- Freezing methods of sample preparation for TEM as high pressure freezing (HPF) and freeze substitution (FS)
- Immunocytochemistry in whole mounted specimens
- Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

LIST OF ORIGINAL PAPERS

- **Chanová M., Bulantová J., Máslo P., Horák P.** (2009): *In vitro* cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research* **104**: 1445–1452.
- **Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P.** (2011): *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *Micron* **42**: 47–54.
- **Chanová M., Lichtenbergová L., Bulantová J., Mikeš L., Horák P.** (2012): *Trichobilharzia regenti*: Antigenic structures of intravertebrate stages. *Central European Journal of Biology* **7**: 83–90.

CONCLUSIONS

Surface and body musculature of *T. regenti* were characterized in terms of their arrangement, ultrastructure, immunoreactivity and changes accompanying development of *T. regenti* during life cycle. Observed characteristics were then compared to that of other schistosomes.

Immunogenic molecules were ultrastructurally confirmed i.a. in various tegumental bodies which originate in subtegumental cells of *T. regenti* cercariae, schistosomula and adult worms. These informations could be used during characterization of content of mentioned bodies or subsequent elucidation of purpose of these bodies for host/parasite interactions. Successful cultivation of early schistosomula of bird schistosomes including *T. regenti* allowed production of these intravertebrate stages in a large amount, without use of experimental animals. Our research on *T. regenti* body musculature showed some new aspects of the development, organization and function of schistosome muscles.

Comparison of observed characteristics between *T. regenti* and other schistosomes revealed peculiarities of *T. regenti*, and also some neglected features which are probably typical for the family Schistosomatidae as a whole.

The most important findings of the thesis can be sorted into three categories:

Localization of immunogenic structures

- Sera of animals infected with *T. regenti* strongly reacted with glycocalyx of cercariae. The other structures with a lower immunoreactivity were penetration glands of cercariae and tegumental bodies inside tegument and subtegumental cells of cercariae, schistosomula and adult worms.
- Comparison of immunoreactivity of *T. regenti* cercariae, schistosomula and adult worms with host sera showed a gradual decrease in antigen abundance during intravertebrate development.

Transformation and cultivation *in vitro*

- Cultivation media commonly used for human schistosomes were also suitable for bird schistosomes with migration through the vascular (*T. szidati*) or the nervous (*T. regenti*) systems of vertebrate hosts.
- Contrary to *T. regenti*, surface changes during the *in vitro* transformation of *T. szidati* cercariae to schistosomula were accompanied by formation of surface “bubbles” of shed cercarial membranes.

Observation of surface and body musculature

- Egg shell pores known for human schistosomes were not detected in *T. regenti* eggs by conventional TEM techniques, although their presence is probable due to a strong immune reaction around mature eggs, and growth of the ageing eggs.
- Number and arrangement of surface receptors differed between *T. regenti* and *T. szidati* miracidia and represented, therefore, valuable criteria for species determination.
- Head organ of *T. regenti* cercariae with musculature separated from the body by lamina basalis transformed to a cup-shaped oral sucker of schistosomula.
- Sparse fibers of radial musculature were observed for the first time in the stage of cercaria. The number of radial muscle fibers increased with development of intestine and reproductive organs of schistosomula and adult worms. That corresponds with expected function of radial musculature which probably serves for maintenance of a stable position of internal organs of the worms.
- In relation to the body mass of intravertebrate stages, acetabulum of *T. regenti* schistosomula and adult worms were smaller than that of human schistosomes. This could be related to threadlike body shape and different migratory route of *T. regenti* which probably do not use ventral sucker for anchoring the worms in the bloodstream as human blood-dwelling schistosomes.
- Contrary to human schistosomes, tegumental ultrastructure of *T. regenti* adult worms was similar in both genders. It confirmed a low degree of sexual dimorphism.

Czech version / Česká verze

ABSTRAKT

Popis nového druhu ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti* v roce 1998 byl prvním krokem k poznání tohoto výjimečného parazita. Přírodními hostiteli *T. regenti* jsou vrubozobí ptáci; infekční larvy – cercárie – jsou však schopné náhodně penetrovat i do savčích hostitelů včetně lidí, u kterých pak způsobují hypersenzitivní kožní imunitní reakci zvanou cercáriová dermatitida.

Na rozdíl od ostatních schistosom se miracidia *T. regenti* líhnou z vajíček přímo ve tkáni definitivních hostitelů. Schistosomula migrují nervovou soustavou obratlovců a stejně jako dospělí červi se v tělech definitivních hostitelů vyskytují takřka výhradně extravaskulárně. Dospělí červi se dožívají pouze nízkého věku a je u nich jen málo rozvinutý pohlavní dimorfismus. S tím souvisí i nižší závislost dospělých samic na trvalém kontaktu se samci.

Během životního cyklu se *T. regenti* vyskytuje ve třech odlišných typech prostředí (voda, tkáň mezihostitelského plže, tkáň obratlovčího hostitele). Každé ze sedmi stadií plní v životě parazitického červa odlišnou funkci, a tomu odpovídají i rozdíly v uspořádání různých orgánových soustav jednotlivých stadií.

Úvodní část dizertační práce je zaměřena výhradně na porovnání výsledků studia ontogeneze povrchu a tělní svaloviny u jednotlivých stadií *T. regenti* a ostatních druhů schistosom, zejména těch lidských. Předložené publikace se pak detailněji zabývají *in vitro* transformací tegumentu schistosomul *T. regenti*, změnami v uspořádání tělní svaloviny během životního cyklu *T. regenti*, a lokalizací imunodominantních antigenů na povrchu i v tělech cercárií, schistosomul a dospělců *T. regenti*.

Vzhledem k taxonomické příbuznosti a podobnému životnímu cyklu se *T. regenti* v mnoha charakteristikách povrchového tegumentu i podpovrchové svaloviny podobá lidským schistosomám. Zcela nově byl u *T. regenti* popsán proces postupné přeměny hlavového orgánu cercárií na ústní přísavku schistosomul, nebo distribuce radiální svaloviny v tělech cercárií a její nárůst u schistosomul a dospělců. Na základě fotodokumentace z dostupných publikací lze ale předpokládat, že výše zmíněná pozorování změn v uspořádání svaloviny se netýkají pouze *T. regenti*, ale celé čeledi Schistosomatidae.

Nejvýznamnější rozdíly mezi tegumentem lidských schistosom a ptačí schistosomy *T. regenti* jsou patrné u dospělých červů. Zatímco u lidských schistosom mívá tegument samců oproti samičímu složitější topografii, u *T. regenti* si je ultrastruktura tegumentu u obou pohlaví vzájemně velmi podobná.

ÚVOD

Schistosomy patří mezi nejvýznamnější parazitické helminty s vážným negativním dopadem na zdraví a život miliónů lidí z tropických oblastí celého světa. Kromě lidských schistosom obsahuje čeleď Schistosomatidae také početné zástupce parazitující v dospělosti u širokého spektra teplokrevných obratlovců. Najdeme mezi nimi i cca 40 druhů ptačích schistosom, které spadají do rodu *Trichobilharzia* (Blair and Islam 1983).

Ačkoli zástupci rodu *Trichobilharzia* jsou označováni jako ptačí schistosomy a jejich přirození definitivní hostitelé jsou ptáci, infekční larvy (cerkárie) mohou napadat i savčí hostitele včetně lidí. Cerkárie, které pronikají do kůže hostitelů z vodního prostředí, jsou zodpovědné za následnou lokální zánětlivou imunitní reakci známou také jako cercáriová dermatitida. Příznaky cercáriové dermatitidy jsou evidovány celosvětově z mnoha zemí, a to včetně těch, které se nacházejí v mírném podnebném pásmu (Kolářová *et al.* 1999). Počet hlášení z nových oblastí v posledních letech přibývá a cercáriová dermatitida je proto řazena mezi tzv. “emerging diseases” (Horák and Kolářová 2011).

Výše zmíněná imunitní reakce hostitelského organismu dokáže zachytit a zneškodnit parazitické červy v kůži (Kouřilová *et al.* 2004), ale nebývá tomu tak vždy. Za určitých okolností může část parazitů v dalším vývoji uvnitř obratlovčího hostitele pokračovat (Horák *et al.* 1999, Hrádková and Horák 2002). Zatímco migrace specifickým hostitelem je obvykle završena dosažením dospělosti parazitických červů, larvy, které proniknou do náhodného hostitele, se vyvíjejí pomaleji a nedospívají (Blažová and Horák 2005). U druhů, jejichž migrační cesta vede přes životně důležité orgány, může infekce hostiteli způsobit vážné zdravotní problémy.

To je také případ *T. regenti*. Tento druh patří do malé skupiny schistosom, u kterých dospělci obývají nosní dutinu definitivních hostitelů (Horák *et al.* 1998a). *Trichobilharzia regenti* je také jediným druhem schistosomy, u které byla potvrzena silná afinita larev k nervové soustavě hostitele (Horák *et al.* 1999). Po penetraci cercárií *T. regenti* do kůže hostitele dochází k transformaci cercárií na schistosomula, která migrují podél periferních nervů do centrální nervové soustavy. Živí se tkání nervové soustavy a ničí ji i mechanicky během migrace. To se může projevovat neuromotorickými poruchami nebo parálzami končetin u přirozených ptačích i náhodných savčích hostitelů (Horák *et al.* 1999, Kolářová *et al.* 2001, Kouřilová *et al.* 2004).

Trichobilharzia regenti se jako potenciálně nebezpečný patogen s potvrzeným rozšířením v mnoha oblastech Evropy (Jouet *et al.* 2010) stala atraktivním cílem pro výzkum.

Doposud byl tento parazit podrobněji studován zejména ve stadiu cercarie a schistosomula, což jsou stadia zodpovědná za infekci obratlovčího hostitele a patologické projevy spojené s migrací jeho nervovou soustavou. Ostatní stadia byla v některých ohledech probádána jen velmi málo nebo vůbec, a údaje o ultrastruktuře povrchu nebo morfologii svaloviny tak byly nekompletní nebo zcela chyběly. Předchozí výzkumy se *T. regenti* věnovaly nejčastěji z hlediska imunologického, patologického, taxonomického, behaviorálního nebo biochemického. Úvodní část předkládané dizertační práce oproti tomu představuje komplexní ultrastrukturální a morfologickou studii tělního povrchu a svaloviny během celého ontogenetického vývoje *T. regenti* od stadia vajíčka po dospělého červa.

Povrch schistosom prochází během vývoje dramatickými změnami. V jednu chvíli je povrch přizpůsobený vodnímu prostředí, jindy vnitřnímu prostředí hepatopankreatu plže nebo tkáni obratlovčího hostitele. Povrch parazitického červa představuje účinnou ochrannou bariéru před nepříznivými vnějšími podmínkami, ale je také hranicí pro přenos nejrůznějších látek mezi hostitelem a parazitem nebo mezi červy samčího a samičího pohlaví.

Pod povrchem je uložena svalovina, která je zodpovědná především za aktivní pohyb červů. Radiální svalovina uvnitř těla schistosom pak má pravděpodobně za úkol udržovat tvar těla a stabilní pozici vnitřních orgánů. Přichytné orgány s bohatě rozvinutou svalovinou umožňují přichycení a migraci na/v těle hostitele nebo příjem potravy, u některých stadií (např. u sporocyst) však mohou zcela chybět.

Trichobilharzia regenti se od lidských schistosom liší v mnoha ohledech (líhnutí miracidii uvnitř hostitelské tkáně, migrace schistosomula nervovou soustavou, výskyt schistosomul a dospělců převážně mimo cévy krevního řečiště, krátká doba života, nízký stupeň pohlavní dvojtvárnosti, odlišná strategie soužití samců a samic atd.). Srovnání vybraných charakteristik našeho modelového organismu a lidských schistosom může ukázat spektrum adaptací, které používají k úspěšnému přežití druhu schistosom s odlišnými životními strategiemi.

CÍLE PRÁCE

Trichobilharzia regenti je výjimečný druh schistosomy, který byl doposud zkoumán zejména v souvislosti s cercáriovou dermatitidou lidí a neuropatologickými příznaky, které se mohou projevit během migrace schistosomul míchou obratlovčích hostitelů.

Těla cercárií, schistosomul a dospělých schistosom prokazatelně obsahují vysoce imunogenní molekuly, které jsou zodpovědné za imunitní reakce hostitele proti parazitovi. Přesto nebyly u *T. regenti* až donedávna známe žádné údaje o původu, lokalizaci nebo množství těchto imunogenů na ultrastrukturální úrovni.

Zatímco cercárie *T. regenti* lze pro plánované experimenty opakovaně a ve velkých množstvích získávat z nakažených plžů, dostupnost schistosomul je limitovaná použitím experimentálních obratlovčích hostitelů. Toto omezení by bylo možné obejít po zavedení spolehlivých kultivačních metod, které by umožnily produkci velkého množství raných schistosomul *T. regenti* v podmínkách *in vitro* bez nutnosti infikovat obratlovce.

Ultrastruktura povrchu a uspořádání tělní svaloviny se významně liší u jednotlivých stadií schistosom. Červi se tak během vývoje přizpůsobují změnám podmínek vnějšího prostředí nebo odlišnému způsobu života. Rozdílům ve stavbě povrchu a svaloviny u různých vývojových stadií *T. regenti* ve srovnání s ostatními (zejména lidskými) schistosomami se podrobně věnuje úvodní část dizertační práce.

Dílčí cíle práce

- Lokalizace dominantních antigenů na povrchu nebo přímo v tělech cercárií, schistosomul a dospělých červů *T. regenti* pomocí iTEM
- Zhodnocení *in vitro* metod pro kultivace schistosomul *T. regenti* a popis ultrastrukturálních změn probíhajících během *in vitro* transformace cercárií na schistosomula
- Charakterizace ultrastruktury povrchu a jeho topografie u jednotlivých stadií *T. regenti* pomocí SEM a TEM
- Popis tělní svaloviny včetně svaloviny přichytných orgánů u jednotlivých vývojových stadií *T. regenti* pomocí TEM a CLSM
- Porovnání *T. regenti* a ostatních (zejména lidských) schistosom z hlediska vývojových změn v ultrastruktuře povrchu a uspořádání tělní svaloviny

MATERIÁL A METODIKA

Předkládaná práce je zaměřená na charakteristiku ultrastrukturálních znaků povrchů jednotlivých stadií *T. regenti*, které byly studovány zejména metodami elektronové mikroskopie. Jiný přístup byl zvolen pro morfologickou charakteristiku svaloviny, kde bylo využito imunocytochemických metod a konfokální mikroskopie.

Seznam používaných metodik:

- Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)
- Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)
- Imunohistochemické značení koloidním zlatem pro TEM (iTEM)
- Mrazové metody pro přípravu vzorků na TEM, jako jsou vysokotlaké zamražování (HPF) a mrazová substituce (FS)
- Imunocytochemie parazitů zpracovaných v celku bez krájení
- Konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM)

SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ

- **Chanová M., Bulantová J., Máslo P., Horák P.** (2009): *In vitro* cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research* **104**: 1445–1452.
- **Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P.** (2011): *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *Micron* **42**: 47–54.
- **Chanová M., Lichtenbergová L., Bulantová J., Mikeš L., Horák P.** (2012): *Trichobilharzia regenti*: Antigenic structures of intravertebrate stages. *Central European Journal of Biology* **7**: 83–90.

SOUHRN

Povrch těla a tělní svalovina *T. regenti* byly charakterizovány z hlediska uspořádání, ultrastruktury, imunoreaktivity a změn, které v nich probíhají během různých fází životního cyklu. Pozorované charakteristiky byly poté porovnány s údaji z ostatních schistosom.

Výchozí studie antigenních struktur u *T. regenti*, prokázala přítomnost imunogenních molekul v různých tělískách, která jsou vypouštěna z prostoru subtegumentálních buněk cercárií, schistosomul a dospělců do tegumentu. Tyto informace by bylo možné využít při snaze o charakterizaci obsahu tegumentálních tělísek a objasnění jejich role v interakcích mezi parazitem a hostitelem. Úspěšně zvládnuté kultivace ptačích schistosom včetně *T. regenti* umožnily získávat velká množství raných schistosomul bez použití experimentálních zvířat. Výzkum tělní svaloviny *T. regenti* odhalil nové poznatky, týkající se obecně vývoje, uspořádání a funkce svalů u schistosom.

Srovnání sledovaných charakteristik mezi *T. regenti* a ostatními schistosomami umožňuje odhalit zvláštnosti našeho modelového organismu, ale i opomíjené vlastnosti, které jsou pravděpodobně obecně platné pro celou čeleď Schistosomatidae.

Nejvýznamnější výsledky lze rozčlenit do tří kategorií:

Lokalizace imunogenních struktur

- Séra, která byla získána z hostitelů imunizovaných *T. regenti*, vykazovala silnou reakci s glykokalyxem cercárií. Méně výrazné reakce byly zaznamenány i v penetračních žlázách cercárií a tegumentálních tělískách tegumentu a subtegumentálních buněk cercárií, schistosomul a dospělců.
- Srovnání imunoreaktivity cercárií, schistosomul a dospělců *T. regenti* se séry imunizovaných hostitelů prokázalo postupný pokles množství antigenu v tělech parazitů během vývoje v obratlovci.

Transformace a kultivace *in vitro*

- Kultivační media běžně používaná pro lidské schistosomy byla vhodná i pro kultivace ptačích schistosom, a to druhů migrujících primárně krevním řečištěm obratlovčích hostitelů (*T. szidati*) i jejich nervovou soustavou (*T. regenti*).

- Transformace povrchu při přeměně cercárií na schistosomula v podmínkách *in vitro* byla u *T. szidati* na rozdíl od *T. regenti* doprovázena odlučováním velkých částí povrchové membrány v podobě četných „bublin“.

Povrch a tělní svalovina

- Přítomnost pórů vyskytujících se ve stěně skořápky vajíček lidských schistosom nebyla u *T. regenti* pomocí běžných technik TEM potvrzena, ačkoli na základě nepřímých důkazů (silná imunitní reakce okolo zralých vajíček a růst vajíček během vývoje) je pravděpodobná.
- Počet a uspořádání povrchových receptorů miracidí se liší u *T. regenti* a *T. szidati*, což může být využito pro druhovou determinaci.
- Hlavový orgán cercárií a jeho mohutná svalovina oddělená od zbytku těla vrstvou lamina basalis se po transformaci cercárií na schistosomula postupně mění na pohárkovitou ústní přísavku.
- Řídká vlákna radiální svaloviny byla poprvé objevena u cercárií. S vývojem střeva a pohlavních orgánů schistosomul a dospělců se počet vláken radiální svaloviny zvyšuje. To odpovídá i předpokládané funkci radiální svaloviny, která pravděpodobně souvisí s udržováním stabilní pozice vnitřních orgánů.
- V poměru k tělu schistosomul a dospělců je acetabulum *T. regenti* menší než je tomu u lidských schistosom. To zřejmě souvisí s extrémně tenkým tělem a způsobem migrace *T. regenti*, která pravděpodobně na rozdíl od lidských schistosom nevyužívá břišní přísavku pro kotvení červů v prostředí krevního řečiště hostitelů.
- Oproti lidským schistosomám nebyly v uspořádání tegumentu dospělých samců a samic našeho modelového organismu nalezeny žádné zřetelné rozdíly, což potvrzuje nízkou úroveň pohlavního dimorfismu u *T. regenti*.

REFERENCES / SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- **Blair D., Islam K.S.** (1983): The life cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology* **5**: 89-117.
- **Blažová K., Horák P.** (2005): *Trichobilharzia regenti*: The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* **54**: 167-172.
- **Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L.** (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous system. *Parasitology* **119**: 577-581.
- **Horák P., Kolářová L.** (2011): Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology* **56**: 779-790.
- **Horák P., Kolářová L., Dvořák J.** (1998a): *Trichobilharzia regenti* n.sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* **5**: 349-357.
- **Hrádková K., Horák P.** (2002): Neurotropic behavior of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* **76**: 137-141.
- **Jouet D., Skírnisson K., Kolářová L., Ferté H.** (2010): Determination of the final hosts and variability of *Trichobilharzia regenti* under natural conditions. *Parasitology research* **107**: 923-930.
- **Kolářová L., Horák P., Čada F.** (2001): Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitology Research* **87**: 644-650.
- **Kolářová L., Skírnisson K., Horák P.** (1999): Schistosome cercariae as the causative agent of swimmer's itch in Iceland. *Journal of Helminthology* **73**: 215-220.
- **Kouřilová P., Syrůček M., Kolářová L.** (2004): The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research* **93**: 8-16.

CURRICULUM VITAE

Name / Jméno: Jana Bulantová

Birth date / Datum narození: 23rd October 1981

Nationality / Národnost: Czech

Contact Address / Kontaktní adresa:

Department of Parasitology
Faculty of Science
Charles University
Viničná 7
128 44
Prague 2
Czech Republic

Phone / Telefon: +420 728 067 075, +420 221 951 816

E-mail: bulantov@natur.cuni.cz

Education / Vzdělání

Gymnasium (1997–2000): Dačice, Czech Republic

Charles University MSc program (2000–2006):

Faculty of Sciences, Department of Parasitology, Prague, Czech Republic

Theme / Téma: Metazoan endoparasites of Green tree python *Morelia viridis*

Charles University PhD. program (2006–2012):

Faculty of Sciences, Department of Parasitology, Prague, Czech Republic

Theme / Téma: Development of surface and body musculature in the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*

Research team member / Člen řešitelského týmu

2003–2007 – The Wellcome Trust – Collaborative Research Initiative Grant No. 072255/Z/03/Z (University of York, UK – Charles University; A. P. Mountford and P. Horák – principal co–investigators): The biochemical and immunological properties of *Trichobilharzia* proteases.

2006–2008 – Czech Science Foundation (Grant No. 206/06/0777): *In vitro* cultivation of bird schistosomes as a tool for systematics and diagnostics (P. Horák – principal investigator).

2006–2011 – projects funded by the Czech Ministry of Education: MSM 0021620828 and MSM LC06009

2011–2012 – Czech Science Foundation (Grant No. P502/11/1621): Neuropathology of *Trichobilharzia regenti* infections in bird and mammals (P. Horák – principal investigator).

Papers / Publikace

- **Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P.** (2011) *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *Micron* **42**: 47–54.
- **Chanová M., Bulantová J., Máslo P., Horák P.** (2009): *In vitro* cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research* **104**: 1445–1452
- **Chanová M., Lichtenbergová L., Bulantová J., Mikeš L., Horák P.** (2012): *Trichobilharzia regenti*: Antigenic structures of intravertebrate stages. *Central European Journal of Biology* **7**: 83–90.
- **Ligasová A., Bulantová J., Šebesta O., Kašný M., Koberna K., Mikeš L.** (2011): Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*-ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. *Parasites and Vectors* **4**, 162.
- **Sloboda M., Kamler M., Bulantová J., Votýpka J., Modrý D.** (2008): Rodents as intermediate host of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? *Folia Parasitologica* **55**: 13–16.
- **Sloboda M., Kamler M., Bulantová J., Votýpka J., Modrý D.** (2007): A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology* **93**: 1189–1198.

Conference Presentations / Konferenční příspěvky

- **Bulantová J., Mikeš L.** (2003): Nálezy helmintů u importovaných plazů. 12th *Helminthological Days* (5. – 8. 5. 2003), Dolní Věstonice, Česká republika.
- **Bulantová J., Mikeš L.** (2004): Paraziti importovaných plazů. *České a Slovenské parazitologické dny* (17. – 21. 5. 2004), Ostravice, Česká republika.
- **Bulantová J., Mikeš L.** (2005): Helminthofauna of *Chondropython (Morelia) viridis* and its treatment with antihelmintics. 13th *Helminthological Days* (9. – 13. 5. 2005), Ředkovec, Česká republika.
- **Bulantová J., Horák P.** (2007): Surface ultrastructure of developmental stages of bird schistosomes. 15th *Helminthological Days* (14. – 18. 5. 2007) Světlá nad Sázavou, Czech Republic (abstract p. 60).
- **Bulantová J., Horák P.** (2007): Surface ultrastructure of developmental stages of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*. 10th *International Helminthological Symposium* (9. – 14. 9. 2007) Stará Lesná, Slovak Republic (poster).

- **Bulantová J., Horák P.** (2008): Bird schistosome *Trichobilharzia regenti*: Ultrastructural observation of developmental changes. *16th Helminthological Days* (12. – 16. 5. 2008) Suchá Rudná, Czech Republic (abstract p. 87).
- **Chanová M., Bulantová J., Máslo P., Horák P.** (2008): *In vitro* transformation and cultivation of early schistosomula of bird schistosomes. *16th Helminthological Days* (12. – 16. 5. 2008) Suchá Rudná, Czech Republic (abstract p. 81).
- **Bulantová J., Horák P.** (2008): Změny v ultrastruktuře ptačích motolic *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) během ontogenetického vývoje. *8. České a Slovenské parazitologické dny* (19. – 23. 5. 2008) Sezimovo Ústí, Česká republika (abstrakt p. 12).
- **Bulantová J., Dolečková K., Kašný M., Horák P.** (2008): Ultrastructural characteristics of particular developmental stages of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*. *10th European Multicolloquium of Parasitology* (24. – 28. 8. 2008) Paris, France (abstract p. 99).
- **Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P.** (2009): *Trichobilharzia regenti*: Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *17th Helminthological Days* (11. – 15. 5. 2009) Vranov nad Dyjí, Czech Republic (abstract p. 27).
- **Houžvičková L., Bulantová J., Vostrý M., Horák P.** (2009) Sporocysts without snails: how to *in vitro* cultivate intramolluscan stages of *Trichobilharzia*. *17th Helminthological Days* (11. – 15. 5. 2009) Vranov nad Dyjí, Czech Republic (abstract p. 20).
- **Bulantová J., Chanová M., Horák P.** (2010): Vývoj a funkce nervové soustavy ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti*. *9. Slovenské a České parazitologické dni* (24. – 28. 5. 2010) Liptovský Ján, Slovenská republika (sborník abstraktů).
- **Bulantová J., Chanová M., Horák P.** (2010): Development and function of the nervous system of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*. *18th Helminthological Days* (10. – 14. 5. 2010) Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic (abstract p. 36).
- **Mikeš L., Koberna K., Ligasová A., Dolečková K., Bulantová, J.** (2010): Ultrastruktura, 3-D rekonstrukce a obsah žlázového aparátu cercárií ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti*. *9. Slovenské a České parazitologické dni* (24. – 28. 5. 2010) Liptovský Ján, Slovenská republika (sborník abstraktů).
- **Bulantová J., Pankrác J., Černý J., Horák P.** (2011): Fascinating flukes of the genus *Transversotrema*. *18th Helminthological Days* (10. – 14. 5. 2010) Rožnov pod Radhoštěm (abstract p. 36).
- **Chanová M., Lichtenbergová L., Bulantová J.** (2011): Immunoreactive structures of neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *19th Helminthological Days* (9. – 13. 5. 2011) Kunžak, Czech Republic (abstract p. 21).