

Katedra parazitologie  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Karlova v Praze



DIPLOMOVÁ PRÁCE

GLYKOSYLACE, ULTRASTRUKTURA A  
ANTIGENY POVRCHU LAREV MOTOLIC

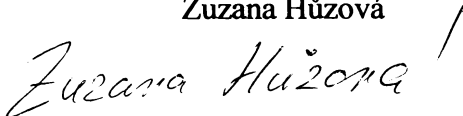
Zuzana Hůzová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Libor Mikeš Ph.D.  
Praha 2006

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

V Praze dne 01. 05. 2006

Zuzana Hůzová

Handwritten signature of Zuzana Hůzová in cursive script, written in black ink.

Poděkování na tomto místě patří lidem mě nejblížejším a mé rodině, bez jejichž podpory by tato práce nemohla vzniknout. Stejně tak patří poděkování i mému školiteli Liborovi Mikešovi za jeho čas, trpělivost, ochotu, připomínky a cenné rady. Věřte, ničeho z toho nebylo málo.

## OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled a cíle práce .....	7
2.1. Lektiny .....	7
2.1.1. Výskyt lektinů.....	7
2.1.2. Biologická aktivita lektinů.....	9
2.1.3. Využití lektinů .....	10
2.2. Tegument motolic .....	11
2.2.1. Základní stavba tegumentu .....	11
2.2.2. Funkce tegumentu.....	11
2.3. Ultrastrukturální změny tegumentu .....	11
2.3.1. Ultrastrukturální změny u <i>Schistosoma mansoni</i> .....	11
2.3.2. Ultrastrukturální změny u ptačí schistosomy <i>Trichobilharzia szidati</i> .....	17
2.4. Glykokalyx a změny v glykosylaci povrchu motolic .....	18
2.4.1. Funkce glykokalyxu.....	18
2.4.2. Glykokalyx u schistosomul <i>Schistosoma mansoni</i> .....	18
2.4.3. Změny v glykosylaci stádií miracidium až sporocysta.....	18
2.4.4. Změny v glykosylaci cercárie a následujících stádií .....	22
2.5. Antigeny lidských schistosom .....	26
2.5.1. Cercárieová dermatitida .....	27
2.6. Cíle práce .....	29
3. Materiál a metodika .....	30
3.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> a <i>Sanguinicola inermis</i> .....	35
3.1.1. Charakterizace sacharidových epitopů larev <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> a <i>Sanguinicola inermis</i> pomocí FITC značených lektinů.....	36
3.1.2. Imobilizace cercárií různých druhů motolic pomocí anestetika procain.....	37
3.1.3. Vliv cathepsinu L na penetraci cercárií <i>D. pseudospathaceum</i> do hostitele a na svlékání jejich glykokalyxu .....	38
3.1.4. Ultrastrukturální změny tegumentu larev a povrchové membrány druhu <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> a <i>Sanguinicola inermis</i> .....	40
3.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic .....	42
3.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> .....	42
4. Výsledky .....	46
4.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> a <i>Sanguinicola inermis</i> .....	46
4.1.1. Charakterizace sacharidových epitopů larev pomocí FITC značených lektinů.....	46
4.1.2. Imobilizace cercárií různých druhů motolic pomocí procainu.....	50
4.1.3. Vliv cathepsinu L na penetraci cercárií <i>D. pseudospathaceum</i> .....	52
a na svlékání jejich glykokalyxu.....	52
4.1.4. Ultrastrukturální změny tegumentu larev <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> a <i>Sanguinicola inermis</i> během transformace.....	53
4.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic .....	60
4.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce ptačími schistosomami.....	65
4.3.1. Antigeny <i>Trichobilharzia regenti</i> .....	65
4.3.2. Antigeny <i>Trichobilharzia szidati</i> .....	72



5. Diskuse.....	74
5.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev vybraných druhů motolic.....	74
5.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic.....	80
5.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> .....	82
6. Závěr.....	86
7. Použitá literatura.....	88
8. Příloha – abstrakty z konferencí.....	98
8.1. Změny ultrastruktury a glykosylace tegumentu cercárií motolic během penetrace.....	98
8.2. Labelled lectins as a tool for differentiation of bird schistosome cercariae and for detection of changes in glycosylation during penetration of cercariae into their hosts.....	99

# 1. ÚVOD

Rozdílná životní prostředí, v nichž nalézáme jednotlivá stádia životního cyklu motolic jsou velmi různorodá a kladou tak značné nároky na schopnost motolic přizpůsobit se. Přizpůsobit se jak fyziologií, tak i povrchem těla podmínkám prostředí, v němž to které stádium motolice žije. Voda je například hlavním životním prostředím pro dvě zcela odlišná stádia. Jsou to miracídia, která se líhnou z vajíček, a cercárie, které se uvolňují z nakažených plžů. U většiny druhů tato stádia ve vodě aktivně vyhledávají následujícího hostitele, a právě přechod z vodního prostředí do zcela odlišných podmínek uvnitř těla hostitele vyžaduje pravděpodobně největší počet změn. Jsou to například změny osmotického potenciálu, teploty, ale hlavně změny související s kontaktem s obrannými mechanismy hostitele.

Významnou ochranou motolic proti nepříznivému vnějšímu prostředí je povrchový glykokalyx, který jim poskytuje především osmotickou ochranu. Na druhou stranu je však vysoce imunogenní, a proto dochází záhy po průniku do těla hostitele k jeho odvržení (Stein a Lumsden, 1973). Sacharidové složení glykokalyxu je jak druhově, tak i stadiálně značně rozmanité a pro jeho identifikaci a vzájemné porovnání se jeví jako nejvýhodnější použití FITC značených lektinů.

Další významnou ochranou motolic proti vnějšímu prostředí, ale především proti imunitním reakcím hostitele je jejich povrchová membrána. Druhy, které využívají v rámci svého životního cyklu krevní řečiště hostitele, si dokonce po průniku do hostitele tuto povrchovou bariéru zdvojují (Hockley a McLaren, 1977).

Právě problematice glykosylace a ultrastruktury povrchové membrány tegumentu u druhů *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* se věnuje většina předkládané diplomové práce. Oba zmíněné druhy (*D. pseudospathaceum* a *S. inermis*) jsou zástupci motolic využívající k migraci tělem hostitele jeho krevní řečiště. U druhu *Diplostomum pseudospathaceum* je krevní řečiště částečně cestou, jak dosáhnout orgánu konečné lokalizace metacerkárií – oční čočky ryb (Karvonen a kol., 2002). Od této lokalizace se odvíjí i patogenita tohoto druhu – působí částečnou až úplnou slepotu nakažených hostitelů. Ryba hyne v důsledku neschopnosti vyhledávat si potravu a unikat nebezpečí, například v podobě rybožravých ptáků apod. *Sanguinicola inermis* je naopak motolice, která se v krevním řečišti přímo vyvíjí. Vyskytuje se zejména u některých mladých kaprovitých ryb a kumulací jejich vajíček v žábřácích ryb i poškozováním dalších orgánů se tato motolice stává významným patogenem v aquakulturách.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED A CÍLE PRÁCE

### 2.1. Lektiny

Slovo lektin je odvozeno z latinského *legere* (vázat) což vyjadřuje schopnost těchto proteinů vázat sacharidy (Boyd a Shapleigh, 1954 citace dle Vasta, 1991). Lektiny jsou neenzymové a neimunoglobulinové proteiny, schopné specificky rozeznávat a vázat sacharidy (Rini, 1995).

Objev lektinů lze datovat k roku 1940, kdy Boyd, Requera a Renkonen objevili aglutininy specifické pro lidské krevní skupiny (Sharon a Lis, 1989). Lektiny je možné dle povahy jejich sacharidových ligandů, závislosti funkce na přítomnosti kovového prvku, lokalizace v buňce či dle povahy biologických procesů, na kterých se podílí, rozdělit do několika skupin. Rozdělení lektinů do tří hlavních skupin (P, C a S) vzniklo na základě srovnání primární sekvence CRD domén (carbohydrate-recognition domain) (Drickamer, 1994).

Nejpočetnější skupinou jsou lektiny C-typu, pro jejichž aktivitu je nezbytná přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Drickamer, 1988). Tento typ lektinů je dále dělen na osm podskupin dle své lokalizace a specifity. Příkladem jsou selektiny, přítomné v endotelových buňkách a leukocytech (Cummings a Smith, 1992).

Aktivita S-typu lektinů je často závislá na přítomnosti redukčního činidla. Lektiny S-typu nevyžadují kationty pro svou aktivitu a jsou specifické pro  $\beta$ -galaktosidy (Drickamer a Taylor, 1993).

P-typ lektinů zprostředkovává přenos hydrolas z Golgiho komplexu do lysozomů a je specifický pro manoso-6-fosfát (Drickamer, 1994). K živočišným lektinům pak dále nověji patří lektiny I-typu, vázající kyselinu sialovou (Hořejší a Bartůňková, 1998; Loris, 2002) a pentraxiny (Drickamer a Taylor, 1993; Drickamer, 1994).

Lektiny mohou obsahovat i vazebné místo pro nesacharidový ligand, příkladem je vazebné místo pro elastin (který je ovšem vázán hydrofobními vazbami) na 67 kDa proteinu, který se nalézá v plicích skotu. Protein má i specifitu pro D-galaktosu. Dalším příkladem je asialoglykoproteinový receptor hepatocytů savců (Barondes, 1988).

#### 2.1.1. Výskyt lektinů

Lektiny byly objeveny u většiny zkoumaných skupin organismů. Velké množství lektinů bylo lokalizováno v dělohách a endospermu rostlin, v organelách známých jako proteinová tělíska, či v embryu obilovin. Lektiny se rovněž mohou vyskytovat v hlízách (např. brambor) či

plodech (rajče, okurka aj.). Četné lektiny byly objeveny u virů a bakterií (Sharon a Lis, 1989; Danguy a Gabius, 1993). Například chřipkový virus má lektin specifický pro kyselinu sialovou, často se vyskytující jako součást povrchových glykosylovaných struktur cílových buněk, a má tedy funkci adhezinu (Wiley a Skehel, 1987)

Významným adhesinem je i lektin specifický pro D-galaktosu a N-acetyl-galaktosamin obou forem druhu *Entamoeba histolytica*. Další významný lektin, opět s funkcí adhezinu, byl nalezen u prvoků rodu *Giardia*. Merozoit *Plasmodium falciparum* má lektin se širší specifitou, který rozeznává povrchové sacharidy erytrocytů (Jacobson a Doyle, 1996).

U bezobratlých živočichů se lektiny nejčastěji vyskytují v hemolymfě, pohlavních orgánech, vejcích a hemocytech, byly popsány u mekkýšů, korýšů, hmyzu a u helmintů. U parazitických helmintů je přítomný lektin ve střevě *Ascaris suum* s dosud nejasnou funkcí (Čuperlovič a kol., 1988). Z infekční larvy *Toxocara canis* byl izolován 32 kDa protein, jehož aminokyselinová sekvence odpovídá CRD lektinů závislých na  $Ca^{2+}$  (Loukas a Maizels, 1999). Dále byl ze sekretů larev *Toxocara canis* vypurifikován 70 kDa protein patřící mezi C lektiny, který je podobný makrofágovému receptoru pro manosu a receptoru CD-23 (Loukas a kol., 2000). U dospělců *Ostertagia ostertagi* byl též zjištěn lektin s ne zcela jasnou funkcí, ale pravděpodobně se podílející na regulaci imunitní odpovědi hostitele (Klesius, 1993). U dospělců *Necator americanus* byl nalezen lektin C typu, velmi podobný P selektinu savců (Daub a kol., 2000).

U druhu *Schistosoma mansoni* bylo popsáno několik lektinů. U mateřské sporocysty se vyskytuje povrchový lektin se specifitou k D-galaktose, D-glukose, D-manose, N-acetyl-D-galaktosaminu, N-acetyl-D-glukosaminu a manoso-6-fosfátu (Zelck, 1993). V jejich exkrementně-sekrecčních produktech byl nalezen lektin specifický pro D-galaktosu a N-acetyl-D-galaktosamin (Davids a Yoshino, 1995). Na tegumentu cercárií byl nalezen protein vázající D-manosu (Coelho-Castelo a kol., 2002), a na povrchu schistosomuly tohoto druhu byl objeven E-selektin, vázající Lewis X antigen (Trottein a kol., 1997).

U dvou zástupců plathelminů byl nalezen lektin v penetračních žlázách, jednalo se o motolice schopné penetrovat kůži, konkrétně o *Diplostomum pseudospathaceum* a *Trichobilharzia szidati*. Hemaglutinin z penetračních žláz *Diplostomum pseudospathaceum* má molekulovou hmotnost 22-24 kDa, vazebnou specifitu pro  $\beta$ -1,3 glukanové řetězce a některé jednoduché sacharidy. Jako nejlepší inhibitor se jevil heparin spolu s dalšími glykosaminoglykany, bakteriálními lipopolysacharidy, laminarinem a laktulosou. Lze předpokládat, že se tento žláznový lektin podílí na rozpoznávání hostitele a na penetraci cercárií do hostitele (Mikeš a Horák, 2001). Lektin vyskytující se ve žlázách a na povrchu

*Trichobilharzia szidati* o molekulové hmotnosti 48-52 kDa je specifický taktéž pro  $\beta$ -1,3 glukonové řetězce a některé jednoduché sacharidy. Inhibitorem je heparin, hyaluronová kyselina, lipopolysacharidy, laktulosa, laminarin a D-galakturonová kyselina. Tento lektin se nejspíš podílí na rozpoznávání hostitele a možná i na průniku do hostitele (Horák a kol., 1997a). Podobný lektin se nejspíše nalézá i v postacetabulárních žlázách a na povrchu *T. regenti* (Pyšová, 2002).

Lektiny C-typu a pentraxiny a P-typ lektinů byly nalezen pouze u savců (Arason, 1996). Lektiny pocházející ze živočichů lze dle jejich lokalizace rozdělit do dvou skupin. (i) lektiny rozpustné – tj. izolované ze séra (například *Anguilla anguilla*, *A. rostrata*), (ii) lektiny vázané na membrány – tj. asociované s plazmatickou membránou (například elektrický orgán, srdce, plíce *Electrophorus electricus*) (Sharon a Lis, 1989).

Ačkoliv bylo mnoho lektinů objeveno v tkáních živočichů, většina známých lektinů je rostlinného původu a počet charakterizovaných lektinů a lektinových skupin v posledních letech neustále stoupá (Drickamer, 1995). Důležité je, že lektiny, jejichž izolace se provádí pomocí afinitní chromatografie, jsou dnes již lehce komerčně dostupné ve velmi širokém spektru (Murray, 1993).

### 2.1.2. Biologická aktivita lektinů

Lektiny, jak již bylo řečeno, jsou proteiny specificky a reverzibilně vázající sacharidy. Tyto proteiny plní důležitou funkci při aglutinaci, adhezi, migraci (hlavně galektiny), aktivaci, fertilizaci a diferenciaci buněk (Rini, 1995; Ni a Tizard, 1996). V systému, kde chybí protilátky, lektiny dokonce nahrazují funkci imunoglobulinů. V některých případech se lektiny účastní fagocytosy jako opsoniny (Zelck a Becker, 1992; van der Knaap a Loker, 1990).

Lektiny mají různé funkce. Například povrchové lektiny některých parazitů pravděpodobně slouží k získání hostitelských glykosylovaných molekul, kterými se parazit maskuje, a tak uniká imunitní reakci (Zelck a Becker, 1992). Povrchové lektiny motolic nejspíš mohou mít i jinou funkci než jen únik před imunitním systémem, a to například vyhledávání hostitele, orientaci v hostiteli a výživu parazita. Některé lektiny, mohou být díky svým antigenním vlastnostem vhodným cílem diagnostiky či vývoje vakcín (Horák, 1996). Stejně tak se lektiny z penetračních žláz zřejmě podílí na rozeznání tkáně a na penetraci do hostitele (Horák a van der Knaap, 1997). Některé lektiny zároveň fungují jako proteasy (Mikeš a Man, 2003).

Pouze lektiny s C-typem CRD a pentraxiny se uplatňují v obranných mechanismech obratlovců. Vyskytují se v krevním séru a vážou sacharidy na povrchu bakterií (Arason, 1996). Některé C-typy lektinů slouží jako povrchové receptory buněk a mají klíčovou roli v aktivaci imunitního systému obratlovců (Loukas a Maizels, 2000). V tkáních savců hrají lektiny významnou roli při apoptose buněk i při fagocytose mikroorganismů (Ni a Tizard, 1996). Existují též lektiny napodobující insulinový efekt v tukových buňkách, to znamená, že stimulují lipogenesi, transport sacharidů, syntesu glykogenu a fosfokinasovou aktivitu a naopak inhibují lipolysu. Příkladem je lektin z *Canavalia ensiformis* a *Triticum vulgare*. Tyto dva lektiny, stejně tak jako mnohé další, například lektin z *Robinia pseudoaccacia*, jsou toxické pro savčí buňky (Sharon a Lis, 1989).

### 2.1.3. Využití lektinů

Lektiny jsou hojně používány ve výzkumu i v klinických laboratořích. K jejich přednostem patří kromě stability i jejich snadná komerční dostupnost.

Mnohé deriváty lektinů (radioaktivní, fluorescentní aj.) byly syntetizovány pro detekci sacharidů v orgánech, buňkách a buněčných organelách. Reakce s použitím lektinů značených fluoresceinem (FITC), radioaktivním izotopem vodíku (TRITC), enzymy či koloidním zlatem jsou jednoduchým důkazem, že polymer, hormon, neurotransmitter atd. obsahují sacharidy (Sharon a Lis, 1989).

Lektiny mohou být využity při vazbě k makromolekulám pro modifikovaný western blott pro zjištění glykosylace jednotlivých frakcí. Lektiny se též uplatňují jako markery při zjišťování jednotlivých fází životních cyklů parazitů. S jejich pomocí lze snadno sledovat produkci glykokonjugátů u monogeneí (Schabussová a kol., 2003; Schabussová a kol., 2004) i u řady trematod (viz 4.1.1.). Rozdílná exprese glykokonjugátů v průběhu životního cyklu byla pozorována také u prvoka *Entamoeba invadens* (Ribeiro a kol., 1997). Důležité je také využití lektinů při rozlišování patogenních a nepatogenních organismů (Jacobson a Doyle, 1996).

FITC značené lektinové próby byly využity k odlišení *Bacillus anthracis* od dalších druhů rodu *Bacillus* (Cole a kol., 1984). Lektiny též posloužily k druhové determinaci morfologicky shodných toxických dinoflagelát (*Gymnodinium mikimotoi*, *G. pulchellum*, a *G. breve*) (Rhodes a Haywood, 1995). Podobně byly odlišeny jednotlivé druhy rodu *Pseudonitzschia*, z nichž byla řada zástupců vysoce toxická (Rhodes, 1998). Stejně byly aplikovány lektiny pro rozlišení tří vysoce toxických izolátů dinoflagelát *Alexandrium tamarense* (Cho a kol., 2001).

## 2.2. Tegument motolic

Tegument, čili neodermis, je vnější povrch motolic, tudíž mimo jiné i mechanická bariéra mezi organismem a vnějším prostředím. Tato bariéra je důležitou adaptací motolic na jejich životní prostředí (Smith a kol., 1969; Morris, 1971).

### 2.2.1. Základní stavba tegumentu

Součástí tegumentu jsou (viz obrázek 1): povrchová membrána čili vnější plasmalema syncytialní cytoplasmy, syncytialní cytoplasma, ostny, vnitřní syncytialní plasmalema, pokleslé perikaryony a cytoplasmatické spoje. U některých stádií je součástí tegumentu ještě povrchový obal – glykokalyx. Celým tegumentem pak prostupují četné nervové buňky tvořící sensorické papily. Jsou známé značné rozdíly těchto struktur mezi jednotlivými druhy ale i mezi jednotlivými stádii životního cyklu motolic.

### 2.2.2. Funkce tegumentu

Motolice mají dvě struktury, které mohou sloužit k příjmu živin. Jednou je epitel střeva a druhou je tegument. Tegument hraje významnou roli při vstřebávání jednoduchých složek potravy, například jednoduchých cukrů jako je glukosa, nebo aminokyseliny. Tegument má také ochrannou funkci, chrání před enzymy a imunitní reakcí hostitele. Plní však i funkci vnější kostry, účastní se biosyntézy, exkrece, osmoregulace a má důležitou sensorickou funkci. Tegument je důležitý i díky navázaným inhibitorům pepsinu, trypsinu a serinových proteas intestinálních druhů motolic. Obsahuje i vlastní proteasy a má schopnost na sebe vázat vysokomolekulární látky a MHC-antigeny (Thompson, 1997). Pro druhy migrující krevním řečištěm hostitele je přestavba tegumentu nezbytná pro přežití v těchto podmínkách (Hockley a McLaren, 1977).

## 2.3. Ultrastrukturální změny tegumentu

### 2.3.1. Ultrastrukturální změny u *Schistosoma mansoni*

Druh *Schistosoma mansoni* je z ultrastrukturálního hlediska asi nejlépe prostudovan. Lze na něm dokumentovat změny v ultrastruktuře, ke kterým dochází ve stádiu cercárií, schistosomul různého stáří a dospělých jedinců.

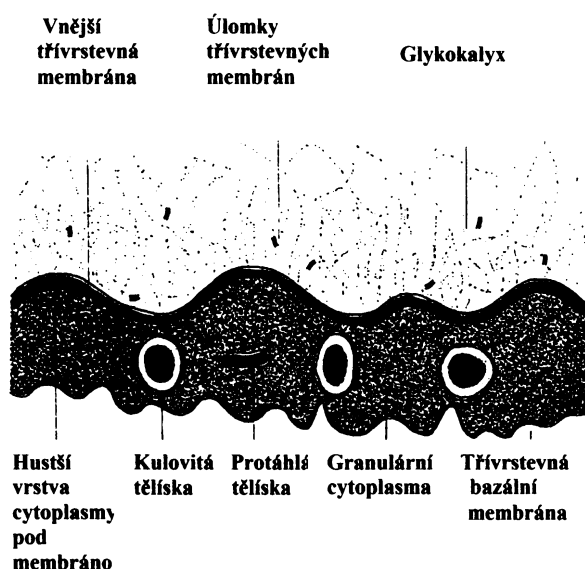
## Cerkárie před opuštěním sporocysty

Cerkárie v průběhu vývoje uvnitř sporocysty mají na svém povrchu primární epitel, pod kterým se začíná tvořit definitivní tegument. Ten vznikne z mnoha plochých buněk, které se pospojují do syncytia (Hockley, 1970). Definitivní tegument obsahuje velké množství jader, ribosomů a mitochondrií. Nejčastější jsou v tomto stadiu dva typy tělísek, první s výraznou membránou a hustým zrnitým obsahem a druhý bez patrné membrány a s méně hustým zrnitým obsahem, pocházející v obou případech z Golgiho komplexu. Vývojem ztrácí syncytium jednotlivé organely a akumuluje hustý granulární materiál pod povrchovou membránou. Postupně se objevují trny, které se ukotvují na vnitřní plasmalemě (Hockley, 1972). Krátce před opuštěním sporocysty se také vytvoří sacharidová vrstvička na povrchu tegumentu zvaná glykokalyx (Hockley a McLaren, 1971; Hockley, 1972).

Glykokalyx vzniká jako granulární a fibrilární (obsahuje filamenta glykosaminoglykanů, glykolipidů, polysacharidů a glykoproteinů) vrstva o tloušťce 0,5  $\mu\text{m}$  (Kemp, 1970). Glykokalyx se primárně zakládá kolmo k povrchu tegumentu, poté se vlákna začnou větvit a propojovat v síť. Glykokalyx zahaluje celý povrch cercárií velmi těsně, ale nepokrývá vyústění sensorických papil (Hockley, 1972; Hockley a McLaren, 1973).

## Cerkárie

Dalším krokem ve vývoji motolice je uvolnění cercárií ze sporocysty. Cerkárie je uzpůsobena k aktivnímu pohybu, k nalezení hostitele, penetraci, migraci a po další proměně k následnému zrání v pohlavně dospělou schistosomu. Cerkárie po celou dobu svého pohybu ve vodě nepřijímá potravu a je tedy závislá čistě na svých energetických zásobách z předchozího vývoje (Dorsey a kol., 2001). Vnější membrána tegumentu cercárií je opticky třívrstevná (Morris, 1971; Kemp 1970), její dvě elektrondensní hydrofilní vrstvy jsou odděleny jednou elektronlucentní hydrofobní vrstvou (tj.



**Obrázek 1:** Tegument cercárií.  
Hockley a McLaren, 1973 (upraveno)



klasická jednotková membrána). Celková tloušťka takovéto membrány je 8,5 nm, vnitřní hustší vrstva bývá poněkud tlustší než vnější. Perikaryony tegumentu volně žijících cercárií leží v parenchymu a těla buněk se protahují směrem k povrchu cercárií (Smith a kol., 1969). Existují čtyři druhy buněk jejichž, perikaryony jsou asociována s tegumentem. Tyto buňky jsou označovány jako subtegumentální buňky typu I, II, III a IV. Rozdělení buněk do jednotlivých typů se odvíjí od lokalizace, morfologie a velikosti jejich inkluzí (Dorsey a kol., 2001).

V glykokalyxu cercárií lze najít kousky povrchové třívrstevné membrány, které mají rozměry přibližně 30 x 9 nm (Dorsey a kol., 2001). Pod membránou je vrstva hustého, zrnitého materiálu, který se spojuje v zrnitou cytoplasmu tegumentu (viz obrázek 1). Typickým a nejčastějším obsahem tegumentu cercárie jsou kulovitá tělíska s elektrondensním centrem a lucentní periferií o průměru 120 nm a podlouhlá tělíska s třívrstevnou membránou a zrnitým obsahem o rozměrech 120 x 20 nm (Hockley a McLaren, 1973; Cousin a kol., 1981).

Pro pokračování životního cyklu tohoto druhu je nezbytný kontakt aktivně plovoucích cercárií s hostitelem a následná penetrace cercárií do jeho těla.

### **Transformace cercárií**

Transformace cercárií motolice nastává po vstupu do definitivního hostitele, kdy je nezbytné přizpůsobit se novému prostředí. Transformovaná larva čeledi Schistosomatidae se nazývá schistosomula.

Během transformace cercárie v schistosomulu dochází ke změnám metabolismu, morfologie a stavby povrchu parazita na úrovni ultrastrukturální i molekulární. Tyto změny umožňují přežití parazita v hostiteli.

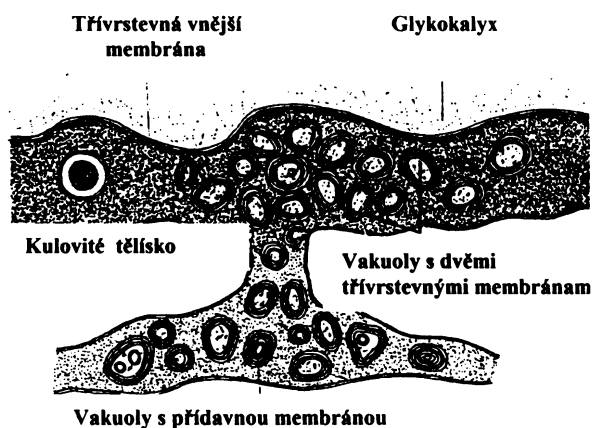
Nejnápadnějším projevem transformace je ztráta ocasu cercárie, dále pak neschopnost přežít ve vodním prostředí. Dalším nezanedbatelným projevem transformace je změna aerobního metabolismu v anaerobní a vyprázdnění penetračních žláz cercárie. Tvorba mikrokloků na povrchu larvy v prvních minutách po penetraci naznačuje přestavbu povrchové membrány a svlékání glykokalyxu (Samuelson a Stein, 1989 citace dle Basch, 1991).

Pokusy na druhu *Schistosoma mansoni* ukázaly, že cercárie jsou citlivé na změnu osmotické hodnoty prostředí. Dle míry zvýšení osmotického tlaku probíhá transformace u 60 až 95 % cercárií. Důležitá je i iontová aktivita solí. Konkrétně změna salinity z 18 mOsm typických pro vodu v nádržích na 300 mOsm savčí krve je dostatečným signálem pro transformaci ve schistosomulu. Stejně tak je důležitá i změna teploty z nižší hodnoty v nádrži na 37 °C v těle obratlovce (Wiest a kol., 1989).

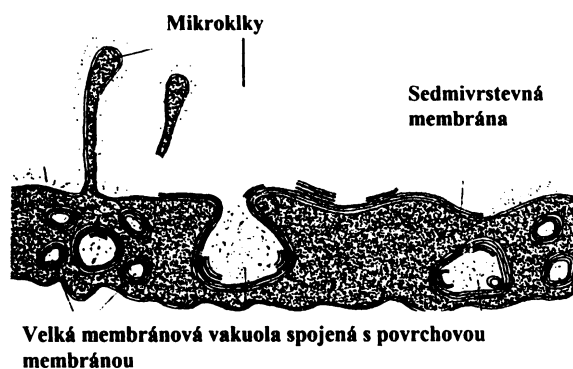
Transformaci cercárie lze vyvolat i *in vitro*. James a Taylor (1976) popisují šest různých technik transformace. První možností je inkubace v izotonickém médiu, dále transformace pomocí průniku cercárií membránou či izolovanou kůží nebo stimulace transformace pomocí lektinů. Další metodou je mechanické porušení povrchu motolice a odlomení ocásků pomocí několikanásobného nasátí injekční jehlou či použití vortexu v kombinaci s transformací pomocí jehly následované inkubací v médiu.

### Třicet minut stará schistosomula

Poté, co cercárie najde hostitele a penetruje do jeho kůže, začne výrazná ultrastrukturální přestavba cercárie na schistosomulu. Ještě třicet minut po penetraci je vnější membrána schistosomuly podobná cercáriové, která je třívrstevná. Typický tegument 30 minut staré schistosomuly obsahuje méně kulovitých a protáhlých tělísek než tegument cercárií, ale objevuje se zde ve velkém počtu nový typ vakuol. Tyto vakuoly jsou kulovité a mají 100 až 150 nm v průměru. Většinou jsou obaleny dvěma k sobě těsně přilehlými třívrstevnými membránami. Vakuoly s granulárním materiálem jsou lokalizovány hlavně v blízkosti spojů mezi buňkami tegumentu a subtegumentu (viz obrázek 2). Vakuoly a tělíska v buňkách subtegumentu jsou podobné tegumentálním, ačkoliv některé z nich jsou větší a mají více membrán (Hockley a McLaren, 1973).



Obrázek 2: Tegument 30 minut staré schistosomuly. Hockley a McLaren, 1973 (upraveno)



Obrázek 3: Tegument 60 minut staré schistosomuly. Hockley a McLaren, 1973 (upraveno)

### **Šedesát minut stará schistosomula**

Šedesát minut po penetraci se vnější membrána schistosomuly stává opticky sedmivrstevnou. Tato membrána je složena ze čtyř elektrondensních a tří elektronlucentních vrstev, které jsou přibližně stejně silné. Celková tloušťka sedmivrstevné membrány je asi 17 nm. V některých místech však mají tyto schistosomuly ještě třívrstevnou membránu. Na vnější membráně schistosomul lze pozorovat výběžky z povrchu tegumentu podobné mikroklkům. Tyto mikroklky jsou dlouhé asi 1500 nm a 50 nm široké. Cytoplasma tegumentu schistosomul v tomto stadiu je hustá a granulární, obsahuje málo pro cercárie typických inkluzí, ale poměrně mnoho malých vakuol pozorovaných u třicetiminutových schistosomul.

Charakteristickými tělísky šedesátiminutových schistosomul jsou velké vakuoly. Tyto vakuoly jsou limitovány sedmivrstevnou membránou, mají 300 nm v průměru a obsahují granulární materiál s kousky membrán (viz obrázek 3). Některé vakuoly časem dosáhnou vnější membrány tegumentu a vnitřek vakuoly se otevře směrem ven, čímž se sedmivrstevná limitující membrána vakuol stane vnější membránou tegumentu (Hockley a McLaren, 1973).

### **Tři hodiny stará schistosomula**

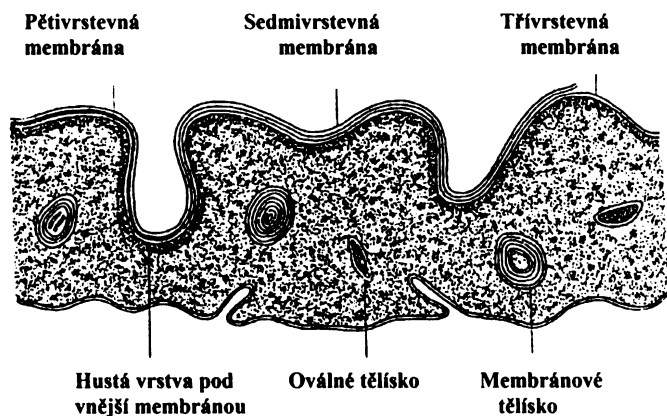
Typická membrána schistosomul po třech hodinách od transformace je sedmivrstevná. Občas lze pozorovat, že dvě vnitřní elektrondensní vrstvy splynou a vytvoří jednu silnější vrstvu. Takováto membrána je pak pětivrstevná. Některé řídce se vyskytující úseky membrány však mají stále pouze tři vrstvy, tyto úseky vznikly ze sedmivrstevné membrány, která se rozdělila ve dvě.

Místa jsou třívrstevné fragmenty membrány umístěny na povrchu neporušené povrchové membrány a vytvářejí tak spolu devítivrstevnou povrchovou membránu o celkové tloušťce 22 nm. Na povrchu jsou často další kousky sedmivrstevné či pětivrstevné membrány uzavřené do smyček, které někdy obsahují granulární materiál. Jsou podobné velkým vakuolám pozorovaným u schistosomul po šedesáti minutách. Rozdíl je v jejich četnosti, na povrch tříhodinových schistosomul obsahuje výrazně méně vakuol než vnitřek mladších schistosomul. V buňkách tegumentu a subtegumentu jsou malá tělíška, asi 100 nm v průměru, která se podobají tělíškům pozorovaným u třicetiminutových schistosomul. Zde jsou však zastoupena mnohem početněji. V tegumentu schistosomul po třech hodinách jsou i protáhlá tělíška (Hockley a McLaren, 1973).

### Jeden až dva dny stará schistosomula

Schistosomuly po 24 a 48 hodinách byly pozorovány pouze *in vitro*. Tyto schistosomuly mají na svém povrchu tenkou vrstvu granulárního materiálu, ale zdá se, že tento materiál pochází z média, nikoliv z povrchu schistosomul. Vnější membrána těchto schistosomul je více zvrásněna než u mladších červů. Sedmivrstevná membrána pokrývá většinu povrchu, ale stále je možné nalézt i úseky s třemi či pěti vrstvami.

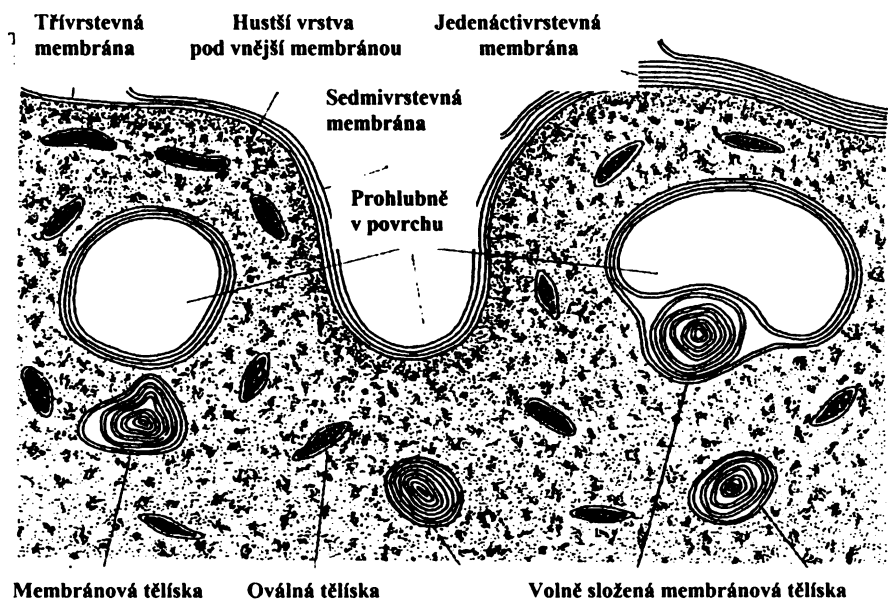
Cytoplasma je granulovaná, ale granula jsou umístěna v nespojitých skupinkách, tudíž se tegument zdá méně elektrondensní než u cercárií a mladších schistosomul. Těsně pod vnější membránou je tenká vrstva hustě nahromaděných granul (viz obrázek 4). Tegument obsahuje mnoho protáhlých oválných tělísek (Hockley a McLaren, 1973).



Obrázek 4 : Tegument 24 hodin staré schistosomuly  
Hockley a McLaren 1973 (upraveno)

### Dospělý jedinec

Povrch dospělého jedince obsahuje hodně prohlubní. Vnější membrána je převážně sedmi - vrstevná o celkové tloušťce 17 nm, ale je možné najít také malé úseky s třívrstevnou membránou. Pěti - vrstevná membrána se objevuje méně často než u mladších červů. Stejně tak jako



Obrázek 5: Tegument dospělé motolic Hockley a McLaren, 1973  
(upraveno)

u schistosomul jsou na povrchu dospělců malé kousky tří - vrstevné membrány.

Cytoplasma tegumentu je hustá a granulární. Charakteristickými inkluzemi tegumentu jsou membránová a oválná tělíška, přičemž oválná tělíška jsou zde extrémně početná (viz obrázek 5). Oba typy tělíšek jsou rovnoměrně rozmístěny v tegumentu, ale žádná nejsou v hustší vrstvě těsně pod membránou. Některá membránová tělíška jsou těsně či volně zabalena pravidelnou kulovitou membránou (Hockley a McLaren, 1973).

### **2.3.2. Ultrastrukturální změny u ptačí schistosomy *Trichobilharzia szidati***

Povrch cercárií *T. szidati* je pokryt třívrstevnou membránou a silnou vrstvou glykokalyxu. Tegument cercárií obsahuje četné trny, oválná a elektronodensní tělíška. Během transformace v schistosomulu mizí glykokalyx a v Golgiho aparátu se vytváří nové, různě kompaktní měchýřky. Většina z těchto měchýřků má sedmivrstevnou membránu, která po dokončení migrace tegumentem splývá s povrchem motolice. Třívrstevná membrána cercárií se tímto procesem stává sedmivrstevnou, místy poměrně hluboce zvrásněnou. Plně vyvinutý povrch transformované schistosomuly *T. szidati* je kompletně pokryt sedmivrstevnou membránou s četnými prohlubněmi a obsahuje mnoho inkluzí, oválných a membránových tělíšek. Tyto změny byly pozorovány u *T. szidati in vivo* i *in vitro* (Horák a kol., 1997b).

Ultrastrukturální změny během transformace u *T. szidati* (Horák a kol., 1997b) se značně podobají změnám popsaným u lidské *S. mansoni* (Hockley a McLaren, 1973) a zdá se, že oba tyto druhy využívají stejnou strategii úniku imunitnímu systému hostitele.

Zdvojená fosfolipidová dvouvrstva na povrchu transformovaných červů čeledi Schistosomatidae není unikátem této skupiny. Najdeme ji i u dalších čeledí motolic žijících v krevním řečišti. Jsou to Aporocotylidae – parazité ryb [tato čeleď je v současnosti považována za součást čeledi Sanguinicolidae (Smith, 2002)] a Spirorchiidae – parazité želv. Dvojitá membrána je nejspíše významnou ochranou proti imunitní odpovědi hostitele která je v krevním řečišti obzvláště intenzivní. Ostatní druhy žijící v tělních dutinách a střevech hostitele mají na svém povrchu pouze jednu fosfolipidovou dvouvrstvu (Hockley a McLaren, 1977).

## 2.4. Glykokalyx a změny v glykosylaci povrchu motolic

### 2.4.1. Funkce glykokalyxu

Glykokalyx, sacharidový obal na povrchu tegumentu motolic, chrání proti nepříznivým vnějším podmínkám. Tato struktura se v průběhu životního cyklu motolic značně mění. Glykokalyx zajišťuje především osmotickou ochranu volně žijících stádií motolic (Smith a kol., 1969). Byl prokázán vliv glykokalyxu cercárií na navození humorální odpovědi hostitele. Jelikož se předpokládá, že je glykokalyx dobrým aktivátorem alternativní dráhy komplementu, může být jeho odvrhování v průběhu penetrace výhodnou strategií motolic pro únik před imunitním systémem hostitele (Kolářová a kol., 1994). Nicméně je pravděpodobné, že doposud nebyly odhaleny všechny děje na kterých se glykokalyx podílí.

### 2.4.2. Glykokalyx u schistosomul *Schistosoma mansoni*

Skutečnost, že glykokalyx je zredukován u *in vitro* transformovaných schistosomul, byla prokázána sérologicky (Stirewalt a Kruidenier, 1961 citace dle Bash, 1991), histochemicky (Gilbert a kol., 1972 citace dle Bash, 1991) a ultrastrukturálně (Smith a kol., 1969; Bruce a kol., 1970; Morris, 1971; Hockley, 1972; Hockley a McLaren, 1973). Již u schistosomul 15 až 30 minut starých je glykokalyx odhazován, jeho zbytky jsou však stále viditelné po barvení PAS (Periodic acid-Schiff) (Bruce a kol., 1970).

V následující části se pokusím shrnout výsledky dosavadních výzkumů glykokalyxu u jednotlivých druhů. Data mapující sacharidové složení glykokalyxu byla získána pomocí fluorescenčně značených lektinů převážně rostlinného původu. Tyto studie ukazují, že se sacharidový obal motolic neliší pouze mezi druhy, ale také mezi jednotlivými životními stádii. Přehled lektinů a jejich inhibitorů použitých v těchto studiích viz kapitola 3.

### 2.4.3. Změny v glykosylaci stádií miracidium až sporocysta

Miracidium, první larvální stádium uvolňující se z vajíčka, žije u většiny druhů volně a aktivně se pohybuje vodním prostředím. Miracidia mají na svém povrchu výrazné ciliární destičky a aciliární mezibuněčné valy které umožňují v dalším vývoji vznik tegumentu. Cílem miracidia je nalezení a následná penetrace do prvního meziphostitele – měkkýše, v kterém se

mění na sporocystu. Glykosylace těchto stádií, charakterizovaná pomocí fluorescenčně značených lektinů, vykazuje četné rozdíly mezi jednotlivými druhy.

### ***Schistosoma mansoni***

Specifická vazba FITC značených lektinů na povrch těla miracidí *Schistosoma mansoni* byla pozorována u pěti lektinů. Silná interakce byla pozorována pouze u dvou z nich, a to u lektinů specifických pro D-galaktosu (PNA) a D-mannosu/D-glukosu (ConA). Všechny ostatní lektiny (specifické pro sialovou kyselinu – LFA, LPA – a N-acetyl-D-glukosamin –WGA reagovaly také, ale slaběji (Coles a kol., 1987).

V pokusech s *in vitro* transformovanými sporocystami byla zjištěna silná specifická vazba sedmi lektinů z jedenácti testovaných. Byly to lektiny specificky vázající N-acetyl-D-glukosamin (PWM, WGA), D-galaktosu (PNA), D-mannosu/D-glukosu (ConA, LCA), N-acetyl-D-galaktosamin (SBA) a L-fukosu (APA). Slabší reakce byla pozorována u lektinu, jehož inhibítorem je L-fukosa (UEA-I). Žádná reakce nebyla prokázána u lektinů se specifitou pro N-acetylmuramovou kyselinu (MAA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA) (Uchikawa a Loker, 1991).

### ***Schistosoma margrebowiei***

Povrch miracidí a sporocyst *S. margrebowiei* vykazuje také značné rozdíly. Na miracidia se vážou lektiny, jejichž inhibítorem je D-galaktosa (RCA, PNA). Sporocysty vážou lektiny se specifitou pro D-mannosu/D-glukosu (ConA) a N-acetyl-D-glukosamin (WGA) (Daniel a kol., 1991).

### **„Komplex“ *Trichobilharzia ocellata***

Systematika „komplexu“ z čeledi Schistosomatidae je dosti složitá. *Trichobilharzia ocellata* a *Trichobilharzia szidati* dříve považované za rozdílné druhy se dnes díky znalost sekvencí ITS považují za jeden druh (Rudolfová a kol., 2005). Popisu glykosylace těchto druhů se zatím věnovaly dvě laboratoře. Laboratoř v Amsterdamu (Gerhardus a kol., 1990) studovala „*T. ocellata*“ a laboratoř v Praze (Horák, 1995; Horák a kol., 1997a) studovala *T. szidati*. Výsledky těchto dvou pracovišť se mírně rozcházejí (viz tabulka 1), i když by se mělo jednat o jeden druh motolice. Rozdíly mohly vzniknout použitím jiného kmene motolic či jiné šarže lektinů.

Studie prováděná v Praze prokázala, že se na glykokalyx u různých stádií vážou rozdílné lektiny. Mezibuněčné valy miracidí reagovaly silně pozitivně pouze se dvěma z testovaných lektinů, a to specifickými pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA) a pro L-fukosu (LTA). Slabší reakce valů byla zaznamenána s lektinem specifickým pro D-galaktosu (PNA). Ciliární destičky miracidí však reagovaly i s lektiny specifickými pro D-mannosu/D-glukosu (PSA, ConA), N-acetyl-D-glukosamin (BS-II), N-acetyl-D-galaktosamin (SBA) a D-galaktosu (RCA). Sporocysty *Trichobilharzia szidati* reagovaly silně s lektiny, jejichž inhibítorem je D-mannosa (PSA, LCA, ConA), N-acetyl-D-glukosamin (BS-II, WGA) a D-galaktosa (PNA). Sporocysty slaběji reagovaly s lektiny specifickými pro N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA), pro L-fukosu (UEA-I) a D-galaktosu (RCA) (Horák a kol., 1997a).

Pro pokusy s „*Trichobilharzia ocellata*“ byla použita sada devíti lektinů. Miracidia reagovala se sedmi z nich a sporocysty pouze se třemi. Dle této studie mají miracidia na svém povrchu D-mannosu/D-glukosu (ConA), N-acetyl-D-glukosamin (WGA), D-galaktosu (RCA, ECA, PNA) a N-acetyl-D-galaktosamin (SBA, DBA). Sporocysty mají pouze N-acetyl-D-glukosamin (WGA), D-mannosu/D-glukosu (ConA) a D-galaktosu (PNA). Studie sacharidového povrchu miracidí a *in vitro* vytvořených sporocyst „*Trichobilharzia ocellata*“ rovněž potvrdila, že různá vývojová stádia mají odlišné sacharidové složení glykokalyxu (Gerhardus a kol., 1990).

Tyto dvě výše uvedené studie se rozcházejí u pěti ze sedmi společně testovaných lektinů v případě miracidí a sporocyst. Rozpory mezi výsledky jsou u miracidí v reakcích s lektiny SBA, RCA, ConA a LTA podle pořadí specifických pro N-acetyl-D-glukosamin, D-galaktosu, D-mannosu/D-glukosu a L-fukosu. Sporocysty se neshodují ve výsledcích u lektinů SBA, HPA a RCA.



**Tabulka 1:** Glykosylace miracidíí a sporocyst. Shrnutí pěti studií.

LEKTIN	S.mn.		S.mr. <sup>3</sup>		T.s. <sup>4</sup>		T.o. <sup>5</sup>		E.p. <sup>2</sup>
	Mir <sup>1</sup>	Spo <sup>2</sup>	Mir	Spo	Mir	Spo	Mir	Spo	Spo
APA	0	++	0	0	0	0	0	0	-
BSA	0	0	0	0	-	++	0	0	-
Con-A	++	++	-	++	-	++	+	+	++
DBA	0	0	0	0	0	0	+	-	0
ECA	0	0	0	0	0	0	+	-	0
HPA	0	-	0	0	-	+	-	-	+
LCA	0	++	0	0	-	++	0	0	++
LFA	+	0	0	0	0	0	0	0	0
LPA	+	0	0	0	0	0	0	0	0
LTA	0	0	0	0	++	-	-	-	0
MAA	0	-	0	0	0	0	0	0	+
PNA	++	++	++	-	+	++	+	+	++
PSA	0	0	0	0	-	++	0	0	0
PWM	0	++	0	0	0	+	0	0	-
RCA-I	0	0	++	-	-	+	+	-	0
SBA	0	++	0	0	-	+	+	-	+
UEA-I	0	+	0	0	-	+	0	0	-
WGA	+	++	-	++	++	++	+	+	++

**Motolice:** S.mn. – *Schistosoma mansoni*; S.mr. – *Schistosoma margrebowiei*; T. s. – *Trichobilharzia szidati*; T.o. – *Trichobilharzia ocelata*; E.p. – *Echinostoma paraensei*; Mir – miracidium; Spo – sporocysta

**Lektiny:** ++ silná reakce, + slabá reakce, - žádná reakce, 0 netestováno; V případě miracidíí jsou v tabulce zaznamenány pouze reakce mezibuněčných valů.

**Citace:** <sup>1</sup>Coles a kol., 1987; <sup>2</sup>Uchikawa a Loker, 1991; <sup>3</sup>Daniel a kol., 1991; <sup>4</sup>Horák a kol., 1997a; <sup>5</sup>Gerhardus a kol., 1990.

### ***Echinostoma paraensei***

V pokusech s *in vitro* transformovanými sporocystami byla zjištěna pozitivní specifická vazba se sedmi lektiny z jedenácti testovaných. Silná reakce byla zaznamenána s lektiny specifickými pro D-galaktosu (PNA), pro D-mannosu/D-glukosu (LCA, ConA) a N-acetyl-D-glukosamin (WGA).

Slabá reakce byla pozorována u lektinů specifických pro galaktosamin (HPA, SBA) a N-acetylmuramovou kyselinu (MAA). Žádná reakce nebyla pozorována u lektinů specifických pro L-fukosu (UEA-I, APA) (Uchikawa a Loker, 1991).

Z porovnání všech předchozích výsledků vyplývá skutečnost, že miracidia *Trichobilharzia szidati*, *Schistosoma mansoni* a *Schistosoma margrebowiei* mají, lze-li soudit z dostupných dat, dosti rozdílný sacharidový povrch. Jediným společným sacharidem se zdá být

pravděpodobně D-galaktosa prokázaná pomocí lektinu PNA. Dostupná data jsou však značně neúplná.

Sporocysty všech dosud studovaných druhů (*Echinostoma paraensei*, *Schistosoma margrebowiei*, *Schistosoma mansoni* a *Trichobilharzia szidati*) vykazují shodné reakce s lektiny ConA, WGA (specifita pro D-mannosu/D-glukosu, N-acetyl-D-glukosamin). S výjimkou *Schistosoma margrebowiei* (netestováno) reagovaly tyto druhy i s lektinem LCA, specifickým pro D-mannosu/D-glukosu. Z dostupných dat o glykosylaci sporocyst však nelze určit sacharidy specifické pro čeleď Schistosomatidae a čeleď Echinostomatidae.

#### 2.4.4. Změny v glykosylaci cercárie a následujících stádií

Cercárie je larvální stádium uvolňující se z plže – prvního mezihostitele – u většiny druhů do vodního prostředí. Cercárie buď penetruje do následujícího hostitele, a v případě čeledi Schistosomatidae se vyvíjí v dospělého jedince přes stádium zvané schistosomula, nebo po penetraci do následujícího mezihostitele tvoří metacercárie, tj. klidová stádia (Echinostomatidae). Další variantou vývoje je encystace cercárie rovnou ve vnějším prostředí (Fasciolidae). Cercárie penetrující do hostitele odhazují ocásek, jeho glykosylace tedy není pro naše potřeby i vzhledem k imunitní odpovědi hostitele podstatná (Samuelson a Caulfield, 1985 citace dle Nanduri, 1991).

#### *Schistosoma mansoni*

V pokusech na cercáriích *Schistosoma mansoni*, v nichž se zvlášť hodnotilo tělo a zvlášť ocásek cercárie, byla zjištěna silná reakce těla s lektiny vázajícími N-acetyl-D-glukosamin (WGA), D-mannosu/D-glukosu (ConA), N-acetyl-D-galaktosamin (SBA, HPA, WFA, BS-II) a D-galaktosu (RCA). Naopak žádná reakce na těle nebyla pozorována při použití lektinů vázajících D-galaktosu (PNA) a L-fukosu (LTA, UEA-I). Na ocásku cercárií nebyla pozorována reakce u žádného z těchto lektinů (Linder, 1984). Nanduri (1991) za použití mírně odlišné metodiky dokumentuje pozitivní reakci těla cercárií s lektinem LTA. Tento výsledek není do tabulky 2 zahrnut.

Studie schistosomul tohoto druhu ukazují na přítomnost D-mannosy (ConA), D-galaktosy (RCA), L-fukosy (LTA, UEA), N-acetyl-D-galaktosaminu (SBA, PNA, DBA) a N-acetyl-D-glukosaminu (WGA) (Andrew a kol., 1983).

### ***Schistosoma margrebowiei***

Cerkárie *Schistosoma margrebowiei* vázaly pouze lektiny specifické pro L-fukosu (APA). Žádná reakce cercárií nebyla pozorována s lektiny specifickými pro D-galaktosu (RCA, PNA), D-mannosu/D-glukosu (ConA) a N-acetyl-D-glukosamin (WGA). U tohoto druhu byla také prokázána rozdílná glykosylace u stádia cercárie a schistosomuly (Daniel a kol., 1991). Pro malé množství testovaných lektinů není tato studie zahrnuta v tabulce 2.

### ***Trichobilharzia szidati***

Silně pozitivní reakce v pokusech s cercáriemi byly získány s lektiny specifickými pro D-mannosu/D-glukosu (PSA), D-galaktosu (RCA) a L-fukosu (LTA, UEA-I), kde stejně reagovalo tělo i ocásek cercárie. V případě lektinu specifického pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA) reagovalo silně pouze tělo cercárie, ocásek nereagoval vůbec. Slabší reakce těla i ocásku byla zjištěna v případě N-acetyl-D-glukosaminu (PWM) a D-mannosu (LCA). V případě N-acetyl-D-galaktosaminu (SBA) se lektin vázal slabě, a to pouze na tělo (Horák, 1995).

K *in vitro* transformovaným schistosomulám se silně vázalo pět lektinů; šlo o lektiny inhibovatelné pomocí D-mannosu (PSA, ConA), N-acetyl-D-glukosaminu (WGA), D-galaktosu (PNA) a L-fukosu (UEA-I, LTA). Slabou reakci vykazovaly lektiny se specifitou k N-acetyl-D-glukosaminu (PWM) a D-galaktose (RCA-I).

Schistosomuly pocházející z kůže myši reagovaly silně pouze s lektinem specifickým pro L-fukosu (UEA-I, LTA), slaběji pak pro D-mannosu/D-glukosu (ConA, PSA), N-acetyl-D-glukosamin (WGA), D-galaktosu (PNA, RCA-I). Schistosomuly z plic myši po pěti a více hodinách už nereagovaly s žádným z lektinů. Podobná byla situace i u schistosomul z kachen. V kůži slabě reagovaly lektiny pro D-mannosu/D-glukosu (ConA, PSA), pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA, PWM, BS-II), D-galaktosu (RCA-I, PNA), N-acetyl-D-galaktosamin (SBA, HPA) a L-fukosu (LTA, UEA-I). S povrchem schistosomuly izolované po pěti dnech z plic slabě reagovaly pouze lektiny specifické pro D-mannosu/D-glukosu (Horák a kol., 1997a). Je patrné, že larvy transformované *in vivo* mají více redukované sacharidové epitopy než larvy transformované *in vitro*. Tyto rozdíly jsou patrné z tabulky 2.

Tyto studie prokázaly během transformace cercárií *in vitro* částečnou redukci sacharidových složek glykokalyxu (Horák a kol., 1997a). Potvrdila se i možnost využití lektinů jako markerů transformace. Konkrétně během transformace *Trichobilharzia szidati* v schistosomulu se začínají na povrchu červů objevovat sacharidy rozpoznatelné pomocí

ConA a PNA. Naopak z povrchu cercárií *T. szidati* mizí sacharidy rozeznatelné pomocí LCA (Horák, 1995).

### ***Echinostoma revolutum***

Následujících pět druhů pocházejí ze shodného mezihostitele kterým je *L. stagnalis*. Popis glykosylace stádií následujících po cercáriích však není k dispozici. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

Cerkárie tohoto druhu silně reagovaly s lektiny, jejichž inhibítozem je D-galaktosa (PNA, RCA), N-acetyl-D-glukosamin (WGA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA). Reakce s lektiny specifickými pro L-fukosu (TPA), D-mannosu/D-glukosu (PSA, LCA, ConA) a N-acetyl-D-glukosamin (BS-II) byly negativní (Horák a Mikeš, 1995).

### ***Paryphostomum sp.***

Cerkárie *Paryphostomum sp.* reagovaly s lektiny jejichž inhibítozem je D-galaktosa (PNA, RCA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA), tedy podobně jako v případě *Echinostoma revolutum* (viz tabulka 3). Navíc je zde slabší reakce s lektinem specifickým pro D-mannosu/D-glukosu (PSA) (Horák a Mikeš, 1995).

### ***Echinoparyphium aconiatum***

Cerkárie dalšího druhu z čeledi Echinostomatidae mají na svém povrchu pravděpodobně D-mannosu/D-glukosu (viz reakce s PSA, LCA, ConA), N-acetyl-D-glukosamin (WGA, BS-II) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA). Reakce s ostatními lektiny byly negativní (Horák a Mikeš, 1995).

### ***Hypoderaeum conoideum***

Cerkárie tohoto druhu reagovaly s lektiny specifickými pro D-mannosu/D-glukosu (ConA), N-acetyl-D-glukosamin (WGA, BS-II), N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA) a D-galaktosu (PNA) (Horák a Mikeš, 1995).

### ***Diplostomum pseudospathaceum***

Dle studie Horáka a Mikeše (1995) reagují cercárie *Diplostomum pseudospathaceum* silně s lektiny, jejichž inhibitory jsou N-acetyl-D-glukosamin (WGA), D-galaktosa (PNA), a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA), slaběji s lektinem specifickým pro D-mannosu/D-glukosu (PSA).

**Tabulka 2:** Glykosylace cercárií a schistosomul. Shrnutí pěti studií.

LEKTIN	<i>T. szidati</i>		<i>S. mansoni</i>		<sup>5</sup> <i>T. regenti</i>	
	<sup>1</sup> Cerkárie	<sup>2</sup> Schistosomula	<sup>3</sup> Cerkárie	<sup>4</sup> Schistosomula	Cerkárie	Schistosomula
	Tělo/ Ocas	<i>In vitro</i> 5 h / Kachna 12 h	Tělo/ Ocas	Myš 1 h	Tělo/ Ocas	
BS-II	-/-	-/+	+/-	0	0	0
ConA	-/-	+++	+/-	+	+	±
DBA	0	0	-/-	+	0	0
HPA	-/-	-/+	+/-	0	0	0
LCA	+/+	-/	0	0	0	0
LTA	+++	++/±	-/-	+	0	0
PNA	-/-	+++	-/-	+	0	0
PSA	+++	+++	0	0	++	+
PWM	+/+	+/+	0	0	0	0
RCA-I	+++	+/±	+/-	+	0	0
SBA	+/-	-/+	+/-	+	0	0
UEA-I	+++	+++	-/-	+	++	-
WGA	++/-	++/±	+/-	+	0	0
WFA	0	0	+/-	0	0	0

Lektiny: ++ silná reakce, + slabá reakce, ± velmi slabá reakce, - žádná reakce, 0 netestováno

Citace: <sup>1</sup>Horák a kol., 1997a; <sup>2</sup>Horák, 1995; <sup>3</sup>Linder, 1984; <sup>4</sup>Andrew a kol., 1983; <sup>5</sup>Blažová a Horák, 2005.

**Tabulka 3:** Porovnání cercárií sedmi druhů motolic pomocí lektinových prób. Shrnutí tří studií.

LEKTIN	<i>S.m.</i> <sup>1</sup>	<i>T.s.</i> <sup>2,3</sup>	<i>E.r.</i> <sup>2</sup>	<i>P.sp.</i> <sup>2</sup>	<i>H.c.</i> <sup>2</sup>	<i>E.a.</i> <sup>2</sup>	<i>D.p.</i> <sup>2</sup>
BS-II	++	-	-	-	++	++	-
ConA	+	-	-	+	++	++	-
HPA	+	++	++	++	++	++	++
LCA	0	++	-	-	-	++	-
LTA	-	++	0	0	0	0	0
PNA	-	-	++	++	++	-	++
PSA	0	++	-	-	-	++	+
PWM	++	+	0	0	0	0	0
RCA-I	+	++	++	++	-	-	-
SBA	+	-	++	++	++	+	++
UEA-I	-	++	0	0	0	0	0
WGA	+	++	++	-	++	++	++
TPA	0	++	-	-	-	-	-

Lektiny: ++ silná reakce, + slabá reakce, ± velmi slabá reakce, - žádná reakce, 0 netestováno.

Motolice: *S.m.* – *Schistosoma mansoni*; *T.s.* – *Trichobilharzia szidati*; *E.r.* – *Echinostoma revolutum*; *P.sp.* – *Paryphostomum sp.*; *H.c.* – *Hypoderaeum conoideum*; *E.a.* – *Echinoparyphium aconiatum*; *D.p.* – *Diplostomum pseudospathaceum*

Citace: <sup>1</sup>Linder, 1984; <sup>2</sup>Horák a Mikeš, 1995; <sup>3</sup>Horák a kol., 1997

Z porovnání výsledků získaných na cercáriích vyplývá, že zástupci čeledi Schistosomatidae (*Trichobilharzia szidati* a *Schistosoma mansoni*) reagovali shodně s pěti z deseti lektinů testovaných u obou druhů. Byly to lektiny specifické pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA, PWM), D-galaktosu (RCA, PNA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA).

Jmenované druhy z čeledi Echinostomatidae (*Echinostoma revolutum*, *Paryphostomum* sp., *Hypoderaeum conoideum* a *Echinoparyphium aconiatum*) se shodovaly pouze u třech z deseti společně testovaných lektinů. Tyto lektiny byly specifické pro N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA) a L-fukosu (TPA). Tyto výsledky nasvědčují jistým rozdílnostem na úrovni rodu v rámci jedné čeledi.

Porovnáním druhů *Trichobilharzia szidati* a *Diplostomum pseudospathaceum* zjistíme shodu v pěti lektinech z deseti. Těmito lektiny jsou PSA, ConA, BS-II, WGA a HPA.

Schistosomuly byly studovány pouze u druhů *Trichobilharzia szidati* a *Schistosoma mansoni*. Z porovnání těchto druhů z jedné čeledi je patrná shoda reakce šesti lektinů ze sedmi společně testovaných. Těmito lektiny byly WGA, UEA-I, RCA, LTA, PNA a ConA.

## 2.5. Antigeny lidských schistosom

Vzhledem ke značně silnému antigennímu působení glykalyxu cercárií ((Marikovsky, Fishelson a Arnon, 1988) je nutné tento přehled doplnit o krátkou kapitolu věnovanou významným, již dobře známým schistosomním antigenům (původem nejen z glykokalyxu) a cercárie dermatitidě. Charakterizovat hlavní antigeny druhů *T. regenti* a *T. szidati* se pokoušíme v kapitole 4.3. této práce.

Antigenem vyvolávajícím imunitní reakci hostitele při nákaze lidskými schistosomami je například glyceraldehyd-3 fosfát dehydrogenasa (GAPDH) asociovaná s povrchem dospělých červů a schistosomul. U schistosomul se též vyskytuje imunogenní fosfoglycerát kinasa (PGK) (Abath a Werkhauser, 1996). Dále pak N,N'-diacetyllactosediain (LDN, případně LDN-F s navázanou fucosou) což je N-glykan exprimovaný dospělými červy (Wuhrer a kol., 2005). Pak imunogenní Lewis X antigen z povrchových glykoproteinů dospělých červů a mnoho jiných O-glykanů či glykolipidů. Ačkoliv se s těmito (LDN, Lewis X) strukturami setkáme i u člověka a jiných savců, přítomnost Fuc $\alpha$ 1-2Fuc elementu u těchto struktur se zdá být specifická pro schistosomy a jim příbuzné druhy (Hokke a Deelder, 2001).

Za významné antigeny a současně i kandidáty pro vývoj vakcíny proti schistosomose, (jíž trpí celkově asi 200 milionů lidí) lze považovat sedm struktur (viz Capron a kol., 1992). Jednou je glutathion-S-transferasa, 28 kDa enzym, který se nachází u dospělých jedinců schistosom. Kandidátem je i paramyosin, 97 kDa svalový protein přítomný u schistosomul a dospělých jedinců motolic, který byl recentně objeven i v postacetabulárních žlázách cercárií (Pearce a kol., 1988). Také irradiation-associated vaccine (IrV-5) antigen, 62 kDa svalový protein přítomný u všech stádií je vhodným kandidátem. Dalším je triosa-fosfát isomerasa, 28 kDa glykolytický enzym vyskytující se u všech stádií na povrchu a u některých stádií i ve střevě. Adeptem je také asparaginyl peptidasa (Sm 23), membránový a střevní antigen o velikosti 23 kDa, který je také přítomný u všech stádií. Dalším antigenem je mastné kyseliny vázající protein (FABP), 14 kDa membránový protein nalezený u schistosomul. Možností je také využití povrchových sacharidových antigenů (Review viz Hokke a Deelder, 2001) pro tvorbu anti-idiotypové vakcíny (Taylor, 1994).

Antigeny stimulující časnou imunitní reakci v případě *Trichobilharzia regenti*, původce lidské cercáriové dermatitidy, by mohly být, jak hypotetizuje Dvořák a kol. (2005), cysteinové proteasy cercáriového původu a povrchové glykany asociované s lipidy či proteiny exprimované u různých stádií parazita, včetně cercárií [glykokalyx cercárií motolic obsahuje filamenta glykosaminoglykanů, glykolipidů, polysacharidů a glykoproteinů (Kemp a kol., 1970)] a vajec. Jedná se tedy o stádia, se kterými se může hostitel opakovaně setkat.

Opakované infekce ptáků mohou za určitých podmínek vyústit až v rezistenci tohoto kompatibilního hostitele vůči infekci trichobilharziemi. Rozvoj efektivní imunitní odpovědi vůči ptačím schistosomám je zřejmě příčinou, proč v přírodě detekujeme tyto motolice spíše u mladších ptáků (Guth a kol., 1979).

V případě infekce nekompetentního hostitele (savce) většina parazitů hyne v kůži a vzniká tzv. cercáriová dermatitida.

### **2.5.1. Cercáriová dermatitida**

Cercáriová dermatitida je často opomíjené onemocnění, o mechanismech infekce se však i přes vzrůstající zájem v posledních letech mnoho neví.

Již z počátku dvacátého století pocházejí první údaje o vyrážce, která se vyskytuje u osob koupajících se v přírodních vodních nádržích. Tato vyrážka byla způsobena cercáriemi různých druhů ptačích schistosom (Cort, 1928 citace dle Chamot a kol., 1998). O něco později bylo objeveno, že vznik vyrážky je podmíněn senzibilizací hostitele, která se vyvíjí opakovaným kontaktem s ptačími schistosomami (Olivier, 1949 citace dle Chamot a kol.,

1998). Cercáriová dermatitida se projevuje jako rychle nastupující kožní zánět a je hlavním mechanismem likvidace parazitů záhy po průniku do hostitele (Chamot a kol., 1998).

Počátek infekce se projevuje slabým svěděním, které se objevuje již pár minut po penetraci cercárií do hostitele. Zhruba do jednoho dne po infekci se dostaví velmi silné svědění a objeví se makuly a papuly. Tato vyrážka zmizí i bez léčby do dvou týdnů, ale pigmentové skvrny mohou přetrvávat i několik měsíců. U silných infekcí může být nákaza doprovázena zvýšenou teplotou, edémy a zduřením lymfatických uzlin (Chamot a kol., 1998). Primoinfekce vyvolává jen slabou imunitní reakci, ale i tak není většina parazitů schopna proniknout do krevního řečiště či periferních nervů a pokračovat ve svém vývoji. Většina parazitů hyne již v kůži hostitele. U *T. regenti* dosáhne pouze cca 10 % z celkového počtu schistosomul, které vniknou do kůže, CNS specifického hostitele (Hrádková a Horák, 2002). Podrobně se mechanismům imunitní reakce nekompetentního hostitele infikovaného druhem *T. regenti* věnuje Kouřilová a kol. (2004). V této práci bylo zjištěno, že se na vzniku cercáriové dermatitidy u myši podílí kožní hypersensitivní reakce časného, ale také pozdního typu. Antigeny podílející se na vzniku těchto reakcí pocházejí nejspíše z glykokylyx, případně jsou žlázového původu. Blažová a Horák (2005) srovnávají vývoj *T. regenti* v přirozeném a abnormálním (nekompetentním) hostiteli.



## 2.6. Cíle práce

- Charakterizace sacharidových epitopů cercárií a transformovaných larev *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* a definice lektinových markerů transformace těchto druhů. V případě *D. pseudospathaceum* využití této znalosti k vyhodnocení vlivu cercáriového cathepsinu L na svlékání glykokalyxu cercárií *D. pseudospathaceum*.
- Popis ultrastrukturálních změn během transformace cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* se zaměřením na povrchovou membránu tegumentu.
- Charakterizace sacharidových epitopů cercárií *Echinostoma spiniferum*, *Echinostoma revolutum*, *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia szidati*, popřípadě i *Trichobilharzia franki* a zhodnocení využitelnosti těchto výsledků pro druhovou determinaci uvedených, v některých případech (*T.regenti*, *T.szidati*, *T. franki*) morfologicky obtížně odlišitelných druhů.
- Zhodnocení kvalitativních změn protilátkové odpovědi specifického hostitele v závislosti na trvání infekce druhem *Trichobilharzia regenti* a *Trichobilharzia szidati*. Lokalizace antigenů v těle cercárií.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### Sběr materiálu v přírodě a laboratorní cykly motolic

Pro zajištění dostatku materiálu pro pokusy byli sbíráni plži ve vodních nádržích s ideálním porostem makrofyt. Sběry probíhaly v okolí Veselí nad Lužnicí (rybníky Švarecberk, Vlkovský rybník, Velký Dubovec) ale i v okolí hlavního města (Šeberák, Labské tůně, Kyjský rybník, Hostavický rybník). Sběr byl zaměřen na mezihostitele sledovaných motolic, tedy na zástupce čeledi Lymnaeidae (*Lymnea stagnalis* – mezihostitel druhů *Diplostomum pseudospathaceum*, *Echinoparyphium aconiatum* a *Echinostoma revolutum*. *Radix auricularia* – mezihostitel druhů *Sanguinicola inermis* a *Trichobilharzia franki* a *R. peregra* – mezihostitel druhu *Sanguinicola inermis*). Dále na čeleď Planorbidae (*Planorbarius corneus* – mezihostitel druhu *Echinostoma spiniferum*). Celkem bylo vyšetřeno 6300 plžů tří rodů z devíti opakovaně navštěvovaných lokalit.

Infikovaní plži v patentní periodě byli ponecháni za laboratorní teploty jednotlivě ve skleněné nádobě s odstátou čistou vodou pod 70 W žárovkou či při přirozeném osvětlení alespoň po dobu jedné hodiny. Voda s cercáriemi byla odebrána a zbavena nečistot. Cercárie byly zkoncentrovány pomocí centrifugace (1200 g po 3 min). U druhů, jež nelze snadno zkoncentrovat pouze pomocí centrifugace (rod *Trichobilharzia*) se osvědčilo použití alternativní metody:

Po cca hodinové expozici šneků na světle, byl celý objem vody s cercáriemi přelit do baňky obalené, krom hrdla, alobalem. Baňka pak byla ještě na deset minut nasvícena a cercárie, migrující k hrdlu za světlem byly sbírány do 50 ml centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly následně ochlazeny při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu cca 15 minut, stočeny v předem vychlazené centrifuze ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) při 16100 g/10 minut. Sedimentované cercárie byly odebrány a přeneseny do malé centrifugační zkumavky a opět stočeny ve vychlazené centrifuze při 16100 g po 10 minut. Sedimentované cercárie byly dále využity v pokusech.

Chov motolic druhů *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati* v laboratorních podmínkách je již v naší laboratoři zaveden. Plži *Radix peregra* z laboratorních chovů – chov v akváriích s provzdušňovanou a filtrovanou vodou obohacenou  $\text{CaCO}_3$ , krmení hlávkovým salátem – byli nakaženi v průměru čtyřmi miracidii. Po cca 30 dnech začínají plži vylučovat cercárie. Do vody s 1000 – 2000 cercáriemi byla umístěna týden stará kachňata *Anas platyrhynchos* f. *domestica* na cca jednu hodinu. *T. regenti* se dále vyvíjí v kachně a po 22 dnech – když počet vajíček motolic dosahuje maxima – je vypitvána její nasální sliznice s vajíčky, z nichž se ve vodě uvolňují miracidia, opět použitá k nákaze plžů. *T. szidati* se v kachně vyvíjí déle a vzhledem k tomu že se jedná o viscerální druh, jsou vajíčka a z nichž se uvolňující miracidia získávána z trusu kachen.

## **Roztoky, pufrы a lektiny**

### Rybí fyziologický roztok

111 mM NaCl

5,3 mM KCl

1 mM CaCl

0,6 mM MgSO<sub>4</sub>

5 mM Hepes

pH 7,3

### Hepes pufr

10 mM Hepes

1 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MnCl<sub>2</sub>

pH 7,8

### Kakodylátový pufr

Zásobní roztok:

A: 0,2 M roztok sodného kakodylátu (42,8 g Na(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O v 1000 ml)

B: 0,2 M NaOH

Pro pH 7,4 : 50 ml A + 2,7 ml B doplněné do 200 ml

### Sodnofosfátový pufr

Zásobní roztok:

A: 0,2 M roztok H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (27,8 g v 1000 ml)

B: 0,2 M roztok Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (53,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O nebo 71,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O v 1000 ml)

Pro pH 7,8 : 8,5 ml A + 91,5 ml B doplněné do 200 ml

### Elektroforetický SDS pufr

25 mM Tris

192 mM glycin

0,1% SDS

pH 8,3

### Blotovací pufr

Elektroforetický SDS pufr

Metanol (výsledná koncentrace 20%)

### Ponceau

100 mg Ponceau červeně

100 ml 1% kyseliny octové

### Substrátový roztok (pro western-blotting)

20 ml TRIS-HCl pH 7,6

10 mg 3,3-diaminobenzidin

Těsně před použitím přidat 6  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Bouinova fixáž

150 dílů nasyceného vodního roztoku kyseliny pikrové

50 dílů 40% formaldehydu

Těsně před použitím 10 dílů kyseliny octové

### TRIS-HCl pufr

20 mM TRIS-HCl

150 mM NaCl

pH 7,6

### TRIS - Tween (T-Tw)

0,05% Tween v 20 mM TRIS-HCl pH 7,6

### Pufrovaný glycerol

1 díl pufru TRIS-HCl pH 7,6

1 díl glycerolu

## **Použité zkratky**

**BSA** – bovine serum albumin

**BCA** – bicinchoninic acid

**TEM** – transmisní elektronová mikroskopie

**GA** – glutaraldehyd

**T – Tw** – 0,05 % Tween v 20 mM TRIS – HCl pH 7,6

## Sacharidy

**Fuc** - L-fukosa

**Gal** - D-galaktosa

**GalNAc** - N-acetyl-D-galaktosamin

**Glc** - D-glukosa

**GlcNAc** - N-acetyl-D-glukosamin

**Lac** - laktosa

**Man** - D-mannosa

**MetGlc** -  $\alpha$ -D-methylglukopyranosid

**MetMan** -  $\alpha$ -D-methylmannopyranosid

## Inhibitory proteas

**E – 64** – Trans-epixysuccinyl-L-leucylamido ( 4 guanidino)-butan

**EDTA** – Ethylenediaminetetraacetic acid

**TLCK** – Tosyl-lysin-chloromethylketon

**Tabulka 4:** Seznam lektinů použitých v pokusech a uváděných v textu

LEKTIN	PŮVOD	SPECIFITA	INHIBITOR
APA*	<i>Asparagus pea</i>	Fuc $\alpha$ 1-	$\alpha$ -L-Fuc
BS-II	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	GlcNAc
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i>	GalNAc $\alpha$ -	Lac
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GalNAc $\alpha$ -	Gal, GalNAc
HPA	<i>Helix pomatia</i>	GalNAc $\alpha$ 1-GalNAc-	GalNAc
JAC	<i>Artocarpus integrifolia</i>	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
LCA	<i>Lens culinaris</i>	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
LFA*	<i>Limax flavus</i>	Neu NAc	Sialová kyselina
LTA, TPA	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc $\alpha$ 1- 2Gal $\beta$ 1-	$\alpha$ -L-Fuc
MAA*	<i>Maakia amurensis</i>	NeuNAc $\alpha$ -	NeuNAc
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Komplexní specifita	0
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Komplexní specifita	0
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-	Gal
PSA	<i>Pisum sativum</i>	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
PWM	<i>Phytolacca americana</i>	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	Lac
SBA	<i>Glycine max</i>	GalNAc $\alpha$ , $\beta$ 1-	GalNAc
SJA	<i>Sophora japonica</i>	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc $\alpha$ 1- 2Gal $\beta$ 1	$\alpha$ -L-Fuc
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc
WGA-suc	<i>Triticum vulgaris</i>	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc

Vysvětlivky k tabulce 4: Gal – D-galaktosa, GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin, Glc – D-glukosa, GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin, Lac – laktosa, Fuc – L-fukosa, Man – D-mannosa, MetMan –  $\alpha$ -D-methylmannopyranosid, Neu NAc – sialová kyselina, MetGlc –  $\alpha$ -D-methylglukopyranosid; \*Lektiny použité jinými autory v pracích citovaných v kapitole 2.

### 3.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis*

#### Transformace cercárií *in vitro*

Transformované larvy pro další pokusy byly získávány převážně v systému *in vitro*, který nevyžaduje usmrcení obratlovce a rychle poskytuje požadované množství transformovaných larev. Jako kontrola funkčnosti tohoto systému sloužily larvy transformované *in vivo*.

Zkoncentrované cercárie zbavené nečistot ve vodě byly vloženy do media L-15 Leibowitz (Sigma) v poměru 2 : 8 (používáno v případě *S. inermis*) či do média RPMI (Sigma) v poměru 1 : 9 (používáno v případě *D. pseudospathaceum*) a inkubovány 24 hodin při teplotě 23 °C. Do obou médií byla přidána antibiotika penicilin (100 IU/ml) a streptomycin (100 µg/ml) (Sigma). Po 24 hodinách byly cercárie propláchnuty v rybím fyziologickém roztoku a použity k dalším pokusům.

#### Transformace cercárií *in vivo*

Jako kontrola, pro srovnání s larvami transformovanými *in vitro*, sloužily larvy transformované v přirozeném systému *in vivo*.

*Diplostomum pseudospathaceum*: Kaprovitá ryba (*Cyprinus carpio* či *Carassius auratus*) o rozměrech 4-15 cm byla ponechána v nádobě s vodou a cca 3000 cercáriemi čerstvě vyloučenými z plže *Lymnea stagnalis* v klidném a temném prostředí po dobu 60 minut. Následně byla ryba přenesena do vody bez cercárií a za dalších 30 minut dekapitována. Kůže ryby byla stažena, roztrhána na drobné kousky a v síťce vyrobené z monofilu vložena do ryбіho fyziologického roztoku, v němž se do hodiny začaly objevovat transformované larvy – diplostomuly.

*Sanguinicola inermis*: 4 cm velký kapr (*Cyprinus carpio*) byl vložen do vody s cca 1500 cercáriemi uvolněnými z plže *Radix auricularia* po dobu 60 minut, pak byl přenesen do nádoby bez cercárií a za dalších 60 minut dekapitován. Vypitvaná žábra byla roztrhána a v síťce z monofilu vložena do ryбіho fyziologického roztoku, z něhož byly do hodiny a půl pod mikroskopem vybrány transformované larvy.

### **3.1.1. Charakterizace sacharidových epitopů larev *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* pomocí FITC značených lektinů**

#### **Vazba FITC značených lektinů na povrch larev motolic**

K charakterizaci sacharidových epitopů zkoumaných larev bylo využito vazeb FITC-značených lektinů (Sigma, Vector, Molecular Probes).

Cerkárie či transformované larvy v 10 mM Hepes pufru pH 7,3 s 1 mM CaCl<sub>2</sub> a 1 mM MnCl<sub>2</sub> byly v temnu inkubovány 20 minut s lektiny (seznam lektinů viz Tabulka 4) v koncentraci 20 μg/ml a při teplotě 4 °C. Po této době byly živé larvy přeneseny na podložní sklíčka a prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX 51). Jako kontrola sloužily larvy s lektinem, ke kterému byl přidán specifický inhibitor (sacharid) o koncentraci 0,5 M. Pokusy byly minimálně třikrát opakovány.



**Tabulka 5: Seznam lektinů použitých v pokusech**

LEKTIN	SPECIFITA	INHIBITOR
BS-II	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	GlcNAc
ConA	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
DBA	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
ECL	GalNAc $\alpha$ -	Lac
GSL-I	GalNAc $\alpha$ -	Gal, GalNAc
HPA	GalNAc $\alpha$ 1-GalNAc-	GalNAc
JAC	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
LCA	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
LTA, TPA	Fuc $\alpha$ 1- 2Gal $\beta$ 1-	$\alpha$ -L-Fuc
PHA-E	Komplexní specifita	0
PHA-L	Komplexní specifita	0
PNA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-	Gal
PSA	Man $\alpha$ 1-;Glc $\alpha$ 1-	MetMan, MetGlc
PWM	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc
RCA-I	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	Lac
SBA	GalNAc $\alpha$ , $\beta$ 1-	GalNAc
SJA	GalNAc $\alpha$ -	GalNAc
UEA-I	Fuc $\alpha$ 1- 2Gal $\beta$ 1	$\alpha$ -L-Fuc
WGA	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc
WGA-suc	(GlcNAc $\beta$ 1-4) <sub>n</sub>	oligo- GlcNAc

Vysvětlivky k tabulce 4: Gal – D-galaktosa, GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin, Glc – D-glukosa, GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin, Lac – laktosa, Fuc – L-fukosa, Man – D-mannosa, MetMan –  $\alpha$ -D-methylmannopyranosid, MetGlc –  $\alpha$ -D-methylglukopyranosid.

### 3.1.2. Imobilizace cercárií různých druhů motolic pomocí anestetika procain

#### Aplikace procainu k cercáriím různých druhů

Fotografování živých cercárií je díky jejich značné pohyblivosti obtížné. Proto jsme hledali látku která by cercárie znehybnila, ale nezabila. Tyto vlastnosti má kokain, který nám ale nebyl dostupný. Vytipovali jsme tedy Procain Léčiva 1 % (Zentiva) což je syntetický ester kyseliny p-aminobenzoové, používaný jako lokální anestetikum s krátkodobým účinkem.

Procain byl aplikován v různých koncentracích (0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,05% a 0,025%) k živým cercáriím druhů *E. aconiatum*, *T. regenti*, *T. franki* a *D. pseudospathaceum*. Cercárie byly pozorovány pod světelným mikroskopem (Olympus CX 21). Poté, co byla stanovena minimální dávka potřebná k imobilizaci cercárií, byl sledován vliv procainu na vyhodnocování pokusů s lektinovými próbami. Sledována byla síla reakce u intaktních cercárií a u cercárií inaktivovaných procainem. Byl sledován vliv procainu na fluorescenční značení lektinů které je citlivé na posun pH k nižším hodnotám. Pokusy byly opakovány třikrát.

### **3.1.3. Vliv cathepsinu L na penetraci cercárií *D. pseudospathaceum* do hostitele a na svlékání jejich glykokalyxu**

Cathepsin L byl izolován pomocí afinitní a ionexové chromatografie z penetračních žláz cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* (Mikeš a Man, 2003). Jeho role se předpokládá při rozpoznávání hostitelských tkání, při penetraci do hostitele a při odvrhování glykokalyxu cercárií (Mikeš a Horák, 2001; Mikeš a Man, 2003).

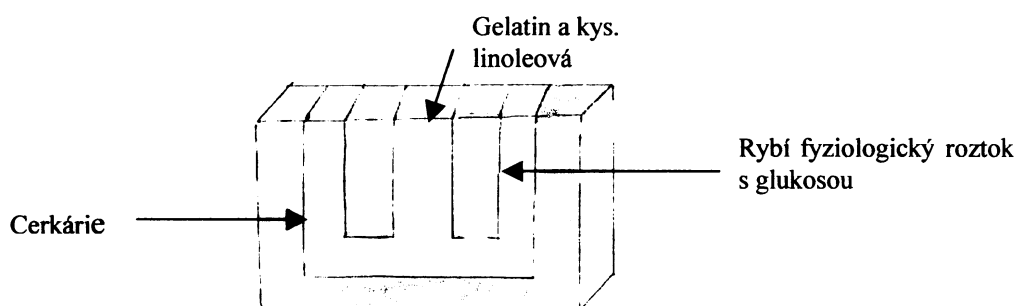
#### **Migrace cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* kapří kůži**

Aby bylo možné ověřit předpokládanou účast cathepsinu L na penetraci do hostitele bylo zapotřebí vytvořit systém podobný přirozeným podmínkám.

V případě použití kapří kůže se jedná o migraci *ex vivo*. Na 50 ml centrifugační zkumavku s rybím fyziologickým roztokem byla přichycena část kůže o rozměrech 5x5 cm z cca dvoukilogramového kapra či 5 cm velkých závojnatek. Na kůži byly nakapány zkoncentrované cercárie *Diplostomum pseudospathaceum* a po dvě hodiny byl celý systém ponechán při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byl obsah zkumavky zcentrifugován a transformovanost získaných larev byla posouzena pomocí lektinových markerů transformace (lektin RCA a Con-A). Pokus byl opakován třikrát pokaždé s novou kůží.

### **Migrace cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* W komůrkou**

Alternativní způsob migrace *in vitro* nabízí migrační komůrka ve tvaru W. Komůrka byla rozdělena na dvě části pomocí 5% gelatinu (Serva) s 0,1  $\mu\text{l/ml}$  kyseliny linolové (Sigma). Do krajní části byly vloženy zkoncentrované cercárie *Diplostomum pseudospathaceum* a do druhé krajní části byl aplikován rybí fyziologický roztok s přídavkem glukosy. Larvy byly dvě hodiny ponechány v tomto systému a výsledek byl pozorován pod světelným mikroskopem. Transformovanost larev byla posouzena pomocí markerů transformace (lektin RCA a Con-A).



### **Ověření proteasové aktivity cathepsinu L na černobílém fotografickém filmu**

Nosič citlivé vrstvy fotografického filmu exponováním a vyvoláním zčerná a tuto vrstvu lze pak snadno použít jako substrát pro průkaz proteolytické (gelatinolytické) aktivity. Na film byly nanесeny 3  $\mu\text{l}$  purifikované proteasy o koncentraci 1,1 mg/ml a jako kontrola 3  $\mu\text{l}$  pufru. Film byl vložen na 12 hodin do vlhké komůrky v laboratorní teplotě. Aktivita proteasy se projevila jako průhledné zlyzované místo v černé želatinové vrstvě filmu.

### **Posouzení vlivu cathepsinu L na svlékání glykokalyxu cercárií *Diplostomum pseudospathaceum***

Pro zjištění, zda má tato proteasa vliv na svlékání glykokalyxu cercárií, byl použit jednoduchý pokus. Cercárie ve 100  $\mu\text{l}$  vody byly vystaveny působení proteasy v množství 1,1 – 3,3  $\mu\text{g}$  po dobu 30 až 120 minut na podložním skle. Po celou dobu pokusu byly cercárie vizuálně kontrolovány pod světelným mikroskopem. Jako kontrola sloužily cercárie bez přídavku proteasy. Cercárie pak byly inkubovány s lektiny a na základě reakcí s lektinovými markery transformace (RCA, ConA) bylo posouzeno, zda měla proteasa vliv na odvržení glykokalyxu cercárií. Pokus byl třikrát opakován.

### **Inhibice penetrace cercárií *Diplostomum pseudospathaceum***

Podílí-li se daná cathepsin L (Mikeš a Man, 2003) na penetraci cercárií do hostitele, je pravděpodobné, že zablokováním jeho aktivity pomocí E-64 dojde k inhibici penetrace cercárií do hostitele. E-64 je širokospektrý inhibitor cysteinových proteas (Trans-epixysuccinyl-L-leucylamido ( 4 guanidino)-butan) který již byl jako inhibitor cathepsinu L ve zmíněné studii otestován.

K pokusu byla použita kůže ze závojnatek (cca 5 cm velké) zbavená šupin i veškeré svaloviny. Kůže byla 60 minut inkubována v 100 až 500  $\mu\text{M}$  inhibitoru proteas E-64 a poté byla napnuta na 50 ml centrifugační zkumavku naplněnou rybím fyziologickým roztokem. Zkoncentrované cercárie s 1 až 5  $\mu\text{M}$  E-64 byly nanесeny na tuto membránu a spolu s kontrolou (kůže inkubovaná ve fyziologickém roztoku a cercárie bez E-64) umístěny do vlhké komůrky. Po 120 minutách byl obsah zkumavky zcentrifugován a pod mikroskopem pozorován výsledek penetrace. Pomocí lektinových markerů bylo posouzeno, zda se jedná o larvy transformované. Pokus byl třikrát opakován.

### **3.1.4. Ultrastrukturální změny tegumentu larev a povrchové membrány druhu**

#### ***Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis***

##### **Nákaza ryb cercáriemi**

Podobně jako při popisu povrchové glykosylace jsme se nevěnovali pouze cercáriím ale i *in vivo* a *in vitro* transformovaným larvám. Tyto larvy pro ultrastrukturální pozorování byly získávány shodným způsobem jako pro pokusy s FITC značenými lektiny. Ultrastrukturální pozorování však bylo rozšířeno o stádium pozdní diplostomuly neboli metacercárie *D. pseudospathaceum* a dospělce *S. inermis*. Tato stádia byla získávána následujícími způsoby:

Diplostomuly byly získávány z oční čočky *Carassius auratus*. Každá ze čtyř použitých závojnatek (7 až 8 cm) byla po jednu hodinu exponována v nádobě s vodou 60 cercáriím *Diplostomum pseudospathaceum*. Po této době byly ryby umístěny ve vzduchovaném akváriu a po osm týdnů krmeny komerčně dostupným krmivem. Po osmi týdnech byly ryby usmrceny dekapitací a z jejich očí byly získány metacercárie motolice *Diplostomum pseudospathaceum* pro zpracování na elektronovou mikroskopii.

Pro získání dospělců *S. inermis* byl kapr *Cyprinus carpio* exponován ve vodě 500 cercáriím po dobu 60 minut. Třicet dní byl následně držen ve vzduchovaném akváriu a krměn komerčně dostupným krmivem. Po 30 dnech byla ryba dekapitována a do rybiho fyziologického roztoku bylo vloženo její srdce a žábra. V *bulbus arteriosus* se vyskytují

dospělí červi a v žábřácích vajíčka motolice. Vajíčka z žaber byla použita k infekci plžů *Radix peregra*. Plži by po dalším měsíci měli vylučovat cercárie *S. inermis*.

### **Fixace materiálu**

Pro získání ultrastrukturálních dat, konkrétně pro zhodnocení změn na povrchových membránách během transformace, jsme používali standardní metody transmisní elektronové mikroskopie.

Cercárie či transformované larvy byly fixovány v 2,5% glutaraldehydu (Sigma) v 400 mM HEPES pufru pH 7,6 s 150 mM NaCl a 1% taninem (Sigma) 2 -12 hodin při teplotě 4 °C. Larvy pak byly postfixovány v 1% OsO<sub>4</sub> v 300 mM HEPES pufru pH 7,6 po 1 hodinu při laboratorní teplotě (modifikovaná metodika dle Horáka a kol., 1997b).

Alternativní fixace:

- 2,5% glutaraldehyd (GA) v 0,05 M sodnofosfátovém pufru (pH 7,3) s 4% sacharosou. V 4 °C přes noc. Postfixace 1% OsO<sub>4</sub> ve vodě po 1 hodinu (Wiest, Kossmann a Tartakov, 1989).
- 3% GA v 0,1 M sodném kakodylátovém pufru. V 4 °C po 2 hodiny. Postfixace 1% OsO<sub>4</sub> 1 hodinu v daném pufru (Göbel a Pan, 1985).
- 2,5% GA v 0,1 M sodném kakodylátovém pufru (pH 7,4) po 1 hodinu, 12 hodin promývat pufrům, postfixace 1% OsO<sub>4</sub> v pufru 30 minut (Yoshino a Laursen, 1995).
- 2% paraformaldehyd v 0,1 M sodném kakodylátovém pufru (pH 7,4) po 1 hodinu, 12 hodin promývat pufrům, postfixace 1% OsO<sub>4</sub> v pufru 30 minut (Yoshino a Laursen, 1995).

### **Zalévání materiálu**

Materiál po fixaci byl proprán v pufru, odvodněn etanolovou řadou (50% – 15 minut, 70% – 30 minut, 80% – 15 minut, 96% – 15 minut, 100% – 15 minut). Další dehydratace proběhla ve 100% acetonu (3 x 15 minut). Následovalo prosycování zalévací pryskyřicí Poly/Bed 812/ Araldite 502 (Polysciences, Inc) ředěné 100% acetonem – připravené dle návodu od výrobce, a následně převedení do čisté pryskyřice. Čistá pryskyřice byla po 12 hodinách třikrát vyměněna. Poté byl vzorek v pryskyřici zalit do formy a nechán polymerovat 48 hodin při teplotě 65 °C.

## **Řezání materiálu**

Řezání bločků na polosilné řezy 0,5-0,9  $\mu\text{m}$  na ultramikrotomu bylo zadáváno pracovišti ELMI při PaÚ AVČR v Českých Budějovicích. Ultratenké řezy nebylo údajně možné rezat z důvodů přítomnosti vápenatých tělísek.

## **3.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic**

### **Druhová determinace cercárií pomocí FITC značených lektinů**

Cerkárie ptačích schistosom jsou těžko rozlišitelné. Chetotaxe, pomocí které se zdají tyto cercárie odlišitelné (Podhorský, osobní sdělení), je značně náročnou metodou a výsledky jsou často obtížně reprodukovatelné a interpretovatelné. Cercárie dvou druhů rodu *Echinostoma* (*E. spiniferum* a *E. revolutum*) které jsou rozlišitelné pomocí intravitálního barvení sloužily pro porovnání.

Pro druhovou determinaci cercárií ptačích schistosom jsme paralelně srovnali reakce FITC značených lektinů s glykokalyxem tří druhů (*Trichobilharzia szidati*, *T. regenti* a *T. franki*). Pokusy probíhaly shodně jako v kapitole 3.1. Stejně tomu bylo v případě kontrol. Důraz byl kladen na zhodnocení rozdílů mezi druhy a na nalezení lektinu, pomocí kterého bude možné jednoznačně tyto druhy cercárií během půl hodiny odlišit.

## **3.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce *T. regenti* a *T. szidati***

Imunitní reakce nespecifických hostitelů proti ptačím schistosomám je v souvislosti s cercáriovou dermatidou aktivně studována. Nic se ale neví o protilátkové odpovědi specifického hostitele. Pokusy tedy směřovaly k nalezení antigenů ptačích schistosom navozujících protilátkovou odpověď u experimentálně infikovaných kachen a jejich lokalizaci v těle cercárií.

### **Imunizace kachen**

Pro získání kachních krevních sér s vysokou hladinou nespecifických imunoglobulinů (kontrolní sérum) byla kachna (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) od druhého týdne života imunizována prasečím  $\gamma$ -globulinem (Sigma 62512-106) ve Freundově nekompletním

adjuvans (Sigma). V intervalech dvou týdnů bylo celkem 3x podkožně aplikováno po 150 µg prasečího  $\gamma$ -globulinu.

Pro získání krevních sér z opakovaně infikovaných kachen byla týden stará kachňata nakažena třikrát v týdenních intervalech cercáriemi *Trichobilharzia regenti*. Dávka cercárií musela být dostatečně nízká (odpovídající cca 200 cercáriím), aby nedošlo k ochrnutí kachen, jedná se totiž o nazální neuropatogenní druh. Po týdnu od poslední infekce byl kachnám odebrán cca 1 ml krve z *vena metatarsalis superficialis medialis externa*, která byla zpracována na sérum pro další pokusy.

Krev jednorázově infikovaných kachen (*T. regenti* a *T. szidati*) byla odebírána v týdenních intervalech z *vena metatarsalis superficialis medialis externa* či pouze po dokončení cyklu z krční tepny. Krev byla odebírána i kachnám, které v důsledku infekce *T. regenti* ochruly.

Krev se nechala koagulovat 1 hodinu při 37 °C, poté byla zcentrifugována (1000 g po dobu 5 minut) a získané sérum bylo zamraženo při -20 °C.

#### **Příprava materiálu (proteinu) na elektroforesu v polyakrylamidovém gelu**

Cercárie vyloučené z plže byly zkoncentrovány (viz 3.1.), z centrifugační mikrozkuřavky byla odebrána voda a nahrazena 20 mM TRIS-HCl puřrem se 150 mM NaCl. Následovalo stočení při 16100 g po dvě minuty a zbavení přeřbtku puřru. Cercárie byly sonikovány pomocí přístroje VIBRA CELL 3 x 30 sekund při amplitudě 60. K dalšímu použití sloužil buď takto připravený homogenát, nebo se tento homogenát centrifugoval ve vychlazené centrifuge (4 °C) 16100 g po deset minut a vzniklý supernatant byl odebrán a opět centrifugován. Supernatant i pelet z cercárií byl samostatně zamražen při -70 °C. K materiálu byly přidány inhibitory proteas E-64 (10 µM), TLCK (100 µM) a EDTA (10 µM).

#### **Měření koncentrace proteinu**

Pro měření koncentrace proteinu byl použit BICINCHONINIC ACID (BCA) PROTEIN ASSAY KIT (Sigma) dle návodu od výrobce v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách s plochým dnem. Kalibrační řada byla vytvořena z 1 mg/ml zásobního roztoku BSA (Sigma). Získaná data byla dále zpracována v programu Standard Curves či Excel.

## **Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu**

Pro elektroforetickou separaci proteinů homogenátu cercárií v redukujícím vzorkovém pufru (supernatant a pelet po centrifugaci či kompletní protein bez centrifugace) byl použit 12% polyakrylamidový gel o tloušťce 0,75 mm (na aparatuře Owl 1,6 mm). Dělení proteinů probíhalo vertikálně na aparatuře Mini Protean III (Bio-Rad) – 50 µg celkového proteinu na 2D hřeben či na aparatuře Owl (Owl scientific) – 500 µg celkového proteinu na 2D hřeben.

## **Blotting**

Proteiny po elektroforetické separaci byly přeneseny na nitrocelulosovou (NC) membránu (Serva) či na PVDF membránu (Bio-Rad) pomocí přístroje Semi-dry transfer cell (Bio-Rad) za konstantního proudu 1 mA/cm<sup>2</sup> po 90 minut. Pro dočasné obarvení NC membrány byla použita Ponceau červeně. Pro barvení gelů či pro trvalé barvení PVDF membrán byla použita Coomassie Brilliant Blue R – 250.

Membrána pro Western blotting byla rozřezána na cca 4 mm široké proužky, blokována v 5% odtučněném mléce Blotting Grade Blocker Non-fat Dry Milk (Bio-Rad) v 0,05% Tweenu v 20 mM TRIS-HCl se 150 mM NaCl (dále jen T-Tw) po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byla membrána promyta 3 x 5 minut v T-Tw. Následovala inkubace s testovanými krevními séry infikovaných kachen v ředění 1 : 50 až 1 : 20 po jednu až tři hodiny a pak promytí v T-Tw (3 x 5 minut). Následovala inkubace se sekundárními kozími protilátkami značenými peroxidasou (KPL) v ředění 1 : 1000 až 1 : 500. U všech inkubačních kroků bylo použito 5 mg/ml laminarinu (Sigma) pro zablokování nespecifických reakcí (Horák a kol., 1997b). Po opakovaném promytí (3 x 5 minut v T-Tw) byla barevná reakce vyvolána inkubací v substrátovém roztoku s diaminobenzidinem a zastavena destilovanou vodou. Pro citlivější detekci byla použita sada Opti-4CN Substrate kit (Bio-Rad) či Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate kit (Pierce). U těchto metod byly dodržovány návody od výrobce, k poslední zmiňované metodě byl použit fotografický hyperfilm (Amersham Biosciences). Délka expozice byla jedna a dvě minuty. Pokus byl v v kompletním rozsahu opakován dvakrát na NC a PVDF membráně. Dílčí výsledky byly získány na NC membráně.

Je-li některý z nalezených antigenů glykosylovaný, mohl by pocházet z glykokalyxu. Glykosylaci antigenů jsme zjišťovali pomocí ligand blotu s lektiny které reagují s povrchem cercárií tohoto druhu (WGA<sub>suc</sub>, PSA, LCA, UEA-I, LTA).

Nitrocelulosová či PVDF membrána byla rozřezána na proužky, blokována 5% BSA (Sigma) v T-Tw po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byla membrána promyta 3 x 5



minut v T-Tw. Následovala inkubace s biotinylovanými lektiny o koncentraci 10 až 20 µg/ml a kontrolou (lektiny s přídavkem 0,5 M sacharidového inhibitoru). Po jedné hodině následovalo promytí v T-Tw (3 x 5 minut) a hodinová inkubace s peroxidasou značeným streptavidinem (Streptavidin peroxidase polymer, Sigma) v ředění 1 : 1000. Lektiny i streptavidin byly ředěny na požadovanou koncentraci v 1% BSA. Po opakovaném promytí (3 x 5 minut v T-Tw) byla barevná reakce vyvolána inkubací v Opti-4CN Substrate kit (Bio-Rad). Tento pokus byl z důvodu nedostatku materiálu opakován pouze dvakrát.

### **Imunohistochemie**

Čerstvě uvolněné cercárie z plže *Radix peregra* byly fixovány Bouinovým roztokem (Denguy a Gabius, 1993) a zality do hydrofóbní glykolmetakrylátové pryskyřice JB-4 Plus (Polysciences, Inc.) dle návodu výrobce do želatinových kapslí. S využitím mikrotomu (Finesse ME, Shadon Scientific Limited) byly připraveny 4 µm silné řezy. Tyto řezy byly vypnuty na kapce destilované vody na důkladně odmaštěných podložních sklíčkách. Sklíčka byla ponechána na histologické plotýnce, kde došlo k vysušení vody a přilnutí řezu k podložnímu sklíčku.

Řezy byly blokovány 2% roztokem BSA v 20 mM TRIS-HCl se 150 mM NaCl pufru pH 7,6 šedesát minut a následně inkubovány s krevními séry infikovaných kachen v ředění 1 : 50 až 1 : 20 opět jednu hodinu. Řezy pak byly jemně vyprány ve stejném pufru a osušeny.

Takto upravené řezy byly dále inkubovány se sekundárními FITC značenými kachními protilátkami (KPL) v ředění 1 : 1000 až 1 : 500, dvakrát promyty v pufru, osušeny a pod kapkou pufrovaného glycerolu prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX 51). U všech inkubačních kroků byl použit laminarin (5 mg/ml) (Sigma) pro zablokování nespecifických reakcí, konkrétně pro zablokování vazby protilátek (glykosylovaných Ig) na cercáriový lektin (Horák a kol., 1997b). Pokus byl třikrát opakován.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis*

#### 4.1.1. Charakterizace sacharidových epitopů larev pomocí FITC značených lektinů

##### *Diplostomum pseudospathaceum*

Živé cercárie *D. pseudospathaceum* reagovaly s lektiny se specifitou pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA, DBA), N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, PNA, GSL, SBA, RCA-I a JAC) a D-mannosu/D-glukosu (ConA).

Tělo larev transformovaných *in vitro* reagovalo s lektiny specifickými pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA, DBA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, PNA – viz obrázek 11, GSL, SBA, JAC a slabě RCA-I).

Larvy transformované *in vivo* reagovaly s lektiny se specifitou pro N-acetyl-D-glukosamin (WGA, DBA) a N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, GSL a JAC). Ke každému testovanému lektinu byla přiřazena negativní kontrola se specifickým inhibitorem daného lektinu. Inhibice se nezdařila u lektinů GSL a JAC.

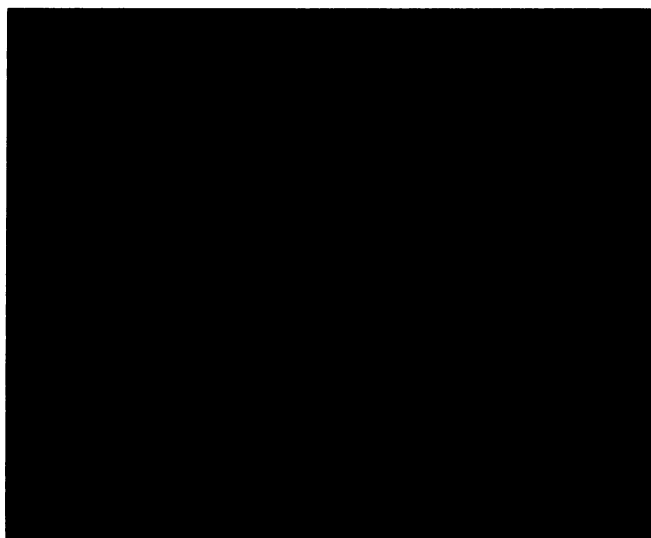
Na základě těchto výsledků jsme určili tři lektiny jako markery transformace. Tyto lektiny reagovaly rozdílně s cercáriemi a s diplostomulami v systému *in vitro* i *in vivo*. Jsou to lektiny SBA, RCA-I a ConA.

Jak je patrné z obrázků 6 až 9, jsou reakce lektinů u tohoto druhu velmi rozmanité. S lektinem ECL reaguje slabě pouze ocásek cercárie, s lektinem SBA reaguje pouze tělo cercárie. V případě GSL jde také jen o reakci těla, ale doprovázenou svlékáním glykokalyxu cercárie. Celé tělo i ocas cercárie reaguje shodně s lektinem PNA. Reakce PNA je dokonce doprovázena silnou aglutinací (viz obrázek 10) cercárií.

Cercárie s navázaným FITC lektinem nejeví v pufovaném prostředí žádné známky „nespokojenosti“. Některé lektiny však stimulovaly cercárie ke svlékání glykokalyxu. Tyto larvy se snažily mechanicky narušit a odvrhnout glykokalyx a postupně se ho směrem od hlavového orgánu zbavit. Toto nás rovněž přivedlo na myšlenku otestovat zapojení žlázového cathepsinu L v tomto procesu.

V tabulce 6 jsou zaneseny kromě našich výsledků i výsledky na cercáriích *D. pseudospathaceum*, které již byly publikovány jinými autory. Z porovnání výsledků je patrné,

že se s našimi rozcházejí pouze v případě lektinu ConA specifického pro D-mannosu/D-glukosu a v případě PNA specifického pro N-acetyl-D-galaktosamin.



**Obrázek 6:** Cerkária *D. pseudopathaceum* lektin ECL, zvětšeno 100x.



**Obrázek 7:** Cerkária *D. pseudopathaceum* lektin GSL, svlékání glykokalyxu, zvětšeno 100x.

**Tabulka 6:** Porovnání glykosylace tegumentu těl cerkárií a diplostomul *D. pseudopathaceum*

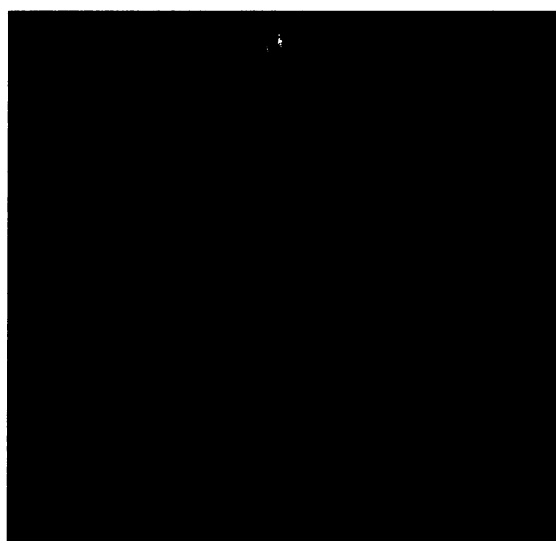
LEKTIN	Cerkárie <sup>1</sup>	Cerkárie	<i>In vitro</i> diplostomula	<i>In vivo</i> diplostomula
PWM	0	-	-	0
WGA	++	+	+	+
DBA	0	+	±	±
BS-II	-	-	-	0
LTA	-	-	-	-
UEA-I	0	-	-	-
HPA	++	++	++	++
PNA	++	+	+	-
GSL!	0	++	++	+
SBA	++	++	+	-
ECL	0	-	-	-
RCA-I	++	++	+	-
JAC!	0	++	++	++
ConA	-	-	-	-
ConB	-	-	-	-
ConC	-	+	-	-
PHA-E	0	-	-	-
PHA-L	0	-	-	-

**Lektiny:** ++ silná fluorescence; + slabá fluorescence; ± velmi slabá fluorescence; - žádná fluorescence; 0 netestováno; ! nespecifická reakce; Modrá – specifita pro N-acetyl-D-glukosamin, galaktosu, Ružová – specifita pro L-fukosu, Zelená – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin.

Černá – komplexní specifita. **Citace:** <sup>1</sup>Horák a Mikeš, 1995.



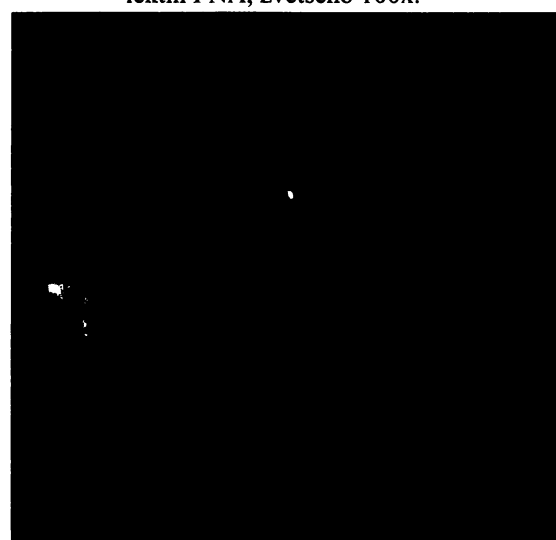
**Obrázek 8:** Cercárie *D. pseudospathaceum* lektin SBA, zvětšeno 100x.



**Obrázek 9:** Cercárie *D. pseudospathaceum* lektin PNA, zvětšeno 100x.



**Obrázek 10:** *D. pseudospathaceum* lektin PNA - aglutinace cercárií, zvětšeno 100x.



**Obrázek 11:** *D. pseudospathaceum* lektin PNA - diplostomula po transformaci *in vitro*, zvětšeno 200x.

### ***Sanguinicola inermis***

U cercárií druhu *S. inermis* reagoval tegument se čtyřmi lektiny z celkového počtu 17 testovaných. Lektiny byly specifické pro oligomerní N-acetyl-D-glukosamin (WGA) a D-mannosu/D-glukosu (LCA, ConA). Dále pak pro N-acetyl-D-galaktosamin (JAC). Tyto reakce ukazují obrázky 12 až 14. Cercáriím reagovalo tělo vždy shodně s ocáskem.

*In vivo* transformované larvy již vůbec nereagovaly s lektinem specifickým pro oligomerní N-acetyl-D-glukosamin. Reagovaly pouze s lektiny specifickými pro N-acetyl-D-galaktosamin (JAC) a D-mannosu/D-glukosu (ConA).

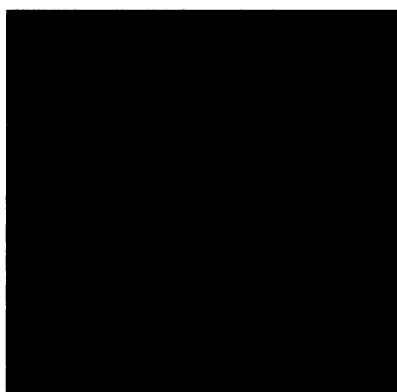
Je patrné že zde v případě lektinu WGA, LCA a ConA došlo po transformaci k zeslábení až vymizení reakce (viz tabulka 7), proto byly zmíněné tři lektiny označeny za markery transformace.

*In vitro* transformované larvy bylo velmi obtížné získat. Z toho důvodu nebyla jejich povrchová glykosylace studována.

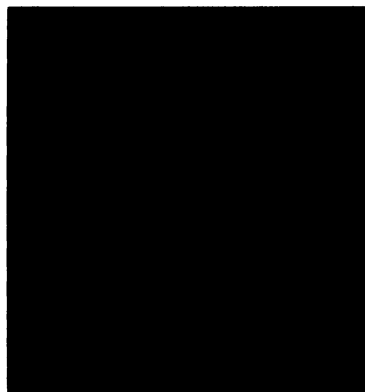
**Tabulka 7:** Glykosylace tegumentu cercárií a transformovaných larev *S. inermis*

LEKTIN	Cerkárie	Transformované larvy ( <i>in vitro</i> )
WGA	++	-
BS-II	-	-
DBA	-	-
LTA	-	-
UEA-I	-	-
HPA	-	-
PNA	-	-
GSI	-	-
SBA	-	-
FCL	-	-
RCA-I	-	-
JAC !	++	++
	-	-
	+	-
	++	+
PHA-E	-	-
PHA-L	-	-

**Lektiny:** ++ silná fluorescence; + slabá fluorescence; ± velmi slabá fluorescence; - žádná fluorescence; 0 netestováno; ! nespecifická reakce; Modrá – specifita pro N-acetyl-D-glukosamin, galaktosu. Růžová – specifita pro L-fukosu, Zelená – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin. Černá – komplexní specifita.



**Obrázek 12:** Cercárie *S. inermis* lektin ConA, zvětšeno 100x.



**Obrázek 13:** Cercárie *S. inermis* lektin JAC, zvětšeno 100x.



**Obrázek 14:** Cercárie *S. inermis* lektin WGA, zvětšeno 100x.

#### 4.1.2. Imobilizace cercárií různých druhů motolic pomocí procainu

Cerkárie druhů *Diplostomum pseudospathaceum* (viz obrázky 15, 16 a 19), *Trichobilharzia franki* (viz obrázek 17), *T. regenti* (viz obrázek 20) a *Echinoparyphium aconiatum* (viz obrázek 18) jsme vystavovali působení lokálního anestetika procain. Výsledky získané na těchto čtyřech druzích jsou naprosto shodné.

K cercáriím dané motolice jsme postupně přidávali procain v ředění 0,5 až 0,025% (viz tabulka 8). Dávka 0,5% procainu byla dosti velká, cercárie se hned po podání silně zmítaly, odhazovaly ocásky a do 4 minut byly v klidu. Vnitřní pohyby cercárií utlumeny nebyly.

Koncentrace 0,05% je dostačující, cercárie se bez zmítání do deseti minut zbavily ocásku a relaxovaně ležely.

Dávka procainu při koncentraci 0,025% je již příliš nízká. K imobilizaci cercárií nedojde do 20 minut od aplikace procainu. Ocásky cercárie odhodí také, ale tělíčka se stále pohybují.

Fluorescence fluoresceinu je optimální v mírně zásaditém pH. Aplikace procainu posouvá pH k nižším hodnotám (až 5,5), kde fluorescence značně klesá. Vyšší koncentrace procainu tedy nejsou pro fotografování s FITC lektiny vhodné, pH lze ale snadno upravit pomocí pufru.

**Tabulka 8:** Účinek a použitelnost jednotlivých ředění procainu

Ředění procainu	Nástup účinku	Odhození ocásku	Zmítání cercárií	Použitelnost při FITC značení
0,5%	4 min	Ano	Silné	Ne
0,25%	5 min	Ano	Silné	Ne
0,125%	6 min	Ano	Střední	Ano v pufru
0,05%	9 min	Ano	Slabé	Ano v pufru
0,025%	Ne	Ano	Slabé	Ano
0%	Ne	Ne	Ne	Ano



Obrázek 15: Cercárie *D. pseudospathaceum* procain, 0,025% , 10 minut, zvětšeno 100x.



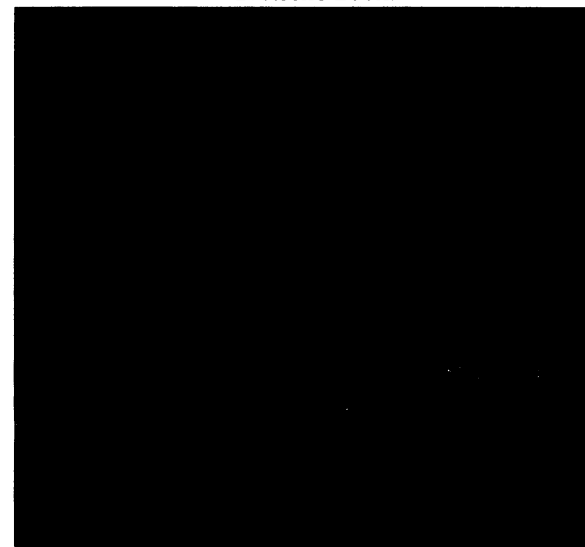
Obrázek 16: Cercárie *D. pseudospathaceum* 0,05%, 5 minut, zvětšeno 100x.



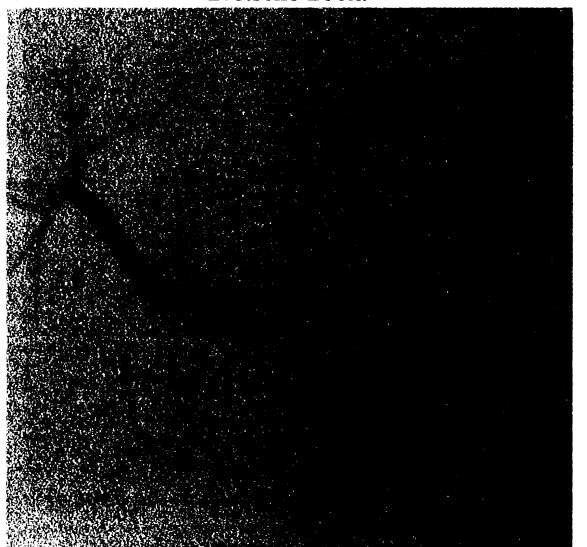
Obrázek 17: Cercárie *T. franki* 0,05%, 7 minut, zvětšeno 200x.



Obrázek 18: Cercárie *E. aconiatum* 0,05%, 9 minut, zvětšeno 200x.



Obrázek 19: : *D. pseudospathaceum* 0,25%, 2 minuty, zvětšeno 100x.



Obrázek 20: *T. regenti* 0,25%, 3 minuty, zvětšeno 40x.

### 4.1.3. Vliv cathepsinu L na penetraci cercárií *D. pseudopathaceum*

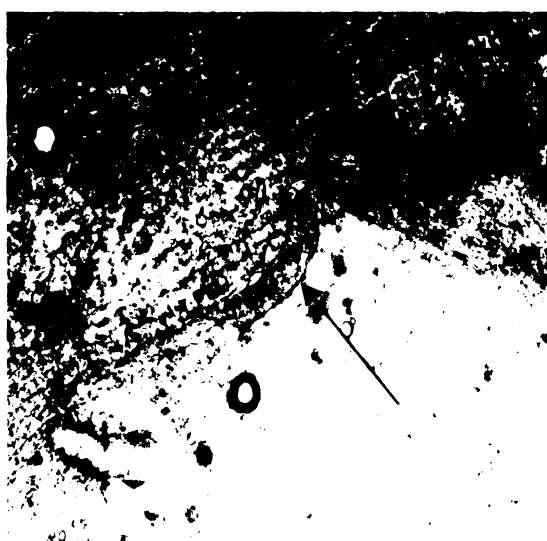
#### a na svlékání jejich glykokalyxu

Pomocí černobílého vyvolaného filmu jsme ověřili proteasovou aktivitu cathepsinu L purifikovaného v naší laboratoři. Proteasa zlyzovala želatinovou vrstvu filmu a bílým místem na vyvolaném filmu potvrdila svou aktivitu.

Cercárie *D. pseudopathaceum*, k nimž byl přidán cathepsin L izolovaný z penetračních žláz tohoto druhu, nejevily žádné známky svlékání glykokalyxu pozorovatelné pod světelným mikroskopem. Ke svlékání glykokalyxu skutečně nedošlo, což bylo ověřeno pomocí markerů transformace tohoto druhu.

Inhibice penetrace cercárií pomocí zablokování proteasové aktivity cathepsinu L byla prováděna *ex vivo*. Cercárie *D. pseudopathaceum*, ke kterým byl přidán inhibitor cysteinových proteas E-64, měly stále tendenci vnikat do kůže závojnatek, ale pouze v malém množství dokázaly skrz ní migrovat až do rybiho fyziologického roztoku. Tyto proniklé larvy se jevily jako transformované. Oproti předpokladu, u kontrolního vzorku bez inhibitoru nedošlo k žádnému průniku larev skrz kůži, i když jich bylo velké množství lokalizováno v kůži. Larvy se v kůži velmi aktivně pohybovaly a pohybem hlavového orgánu do stran a do předu si rychle vytvářely cestu kůží hostitele (viz obrázky 21 a 22).

Tento pokus byl však vzhledem k roční době a nedostatku materiálu prováděn pouze dvakrát. Pro objasnění celé problematiky bude nutné další opakování, případně volba jiné metodiky.



Obrázek 21: Diplostomula v kůži *Carassius auratus*, zvětšeno 100x.



Obrázek 22: Diplostomula v kůži *Carassius auratus*, zvětšeno 100x.



#### 4.1.4. Ultrastrukturální změny tegumentu larev *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* během transformace

##### *Diplostomum pseudospathaceum*

Výsledky našeho ultrastrukturálního pozorování zachycují vývoj tegumentu *D. pseudospathaceum* od stádia cercárie, přes diplostomulu, až po metacercárii. Je na nich možné dokumentovat aktivní přestavbu tegumentu, jeho zvětšující se zvrásnění a střídání typů vezikul a granulí migrujících k povrchu.

Na řezech cercárií dobře patrná vnitřní struktura a přechod těla v kořen ocasu (viz obrázek 23 a 24). Při větším zvětšení byla patrná pro cercárie typická tělíska s elektrondensním jádrem a lucentní periferií o rozměrech 120 x 50 nm a glykokalyx nad povrchovou membránou (viz obrázek 25). Třívrstevná povrchová membrána je na tomto snímku dobře patrná stejně tak jako vnitřní ultrastruktura. Membrána byla dobře zachována a byla složena ze dvou výrazných elektrondensních a jedné elektronlucentní vrstvy. Nejlepších výsledků bylo dosaženo fixací v 2,5% GA v Hepes pufru s NaCl a taninem. Ostatní použité fixáže poskytovaly pouze průměrné, méně kontrastní a názorné výsledky. Prohlížení ale komplikovaly poměrně silné řezy.

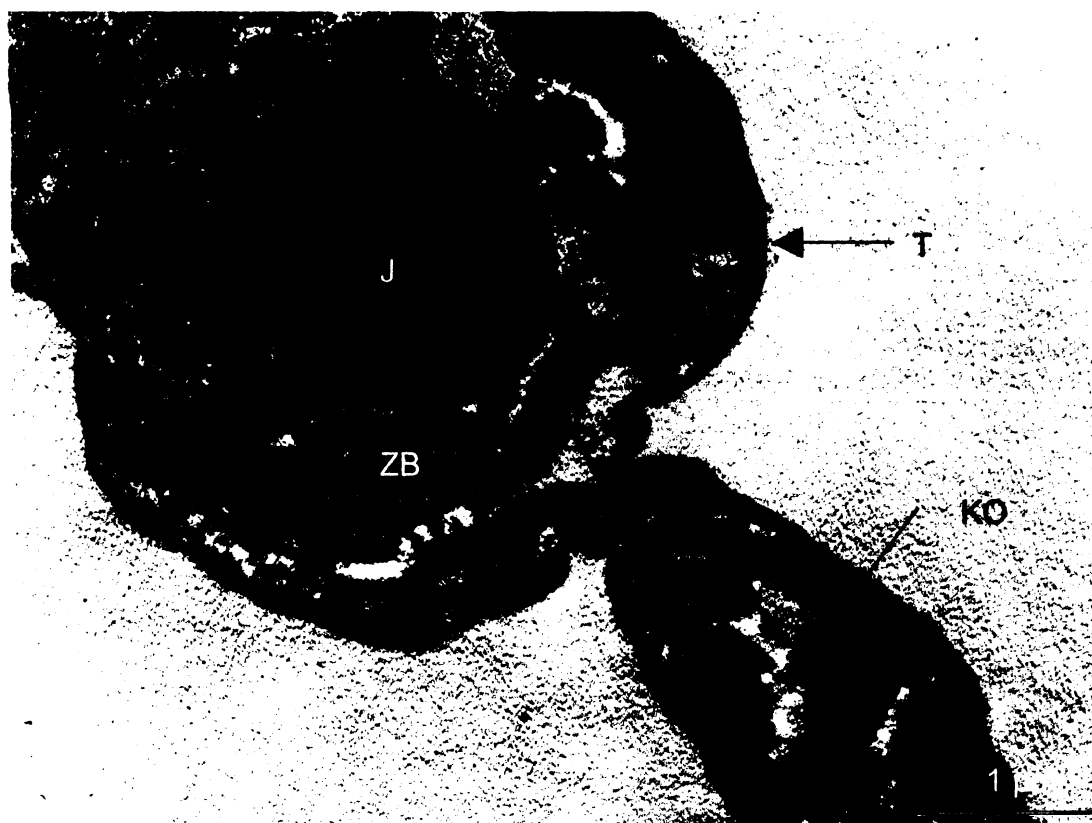
K pozorování transformovaných larev jsme využili metody transformace *in vitro* a *in vivo*. Transformace *in vitro* nabízela zisk velkého množství larev, ale povrchové membrány nebylo možné pozorovat pro jejich značně zlyzovaný stav. Shodných výsledků bylo dosaženo použitím fixáže z 2,5% GA v Hepes pufru a 2,5% GA v Hepes pufru s NaCl a taninem. Fotografie těchto larev zde nepřikládám.

Lepší situace byla s larvami transformovanými *in vivo* (viz obrázek 26). Larev bylo velmi málo, ale vnitřní struktura byla po fixaci v 2,5% GA v Hepes pufru s NaCl a taninem či 2,5% GA v kakodylátovém pufru dobře zachovaná. Povrchová membrána byla při větším zvětšení místy stále dobře rozeznatelná. Její vrstvy však nebylo možné spočítat. Na těchto larvách jsme také pozorovali střevo, vybíhající podobně jako tegument ve výrazné záhyby a penetrační žlázy, které mají pro tento druh, charakteristickém uspořádání 2 x 4. Dále byla patrná *lamina basalis*, výrazná podélná svalovina a nově se objevující membránové kulovité vezikuly o velikosti 150 nm (viz obrázek 27).

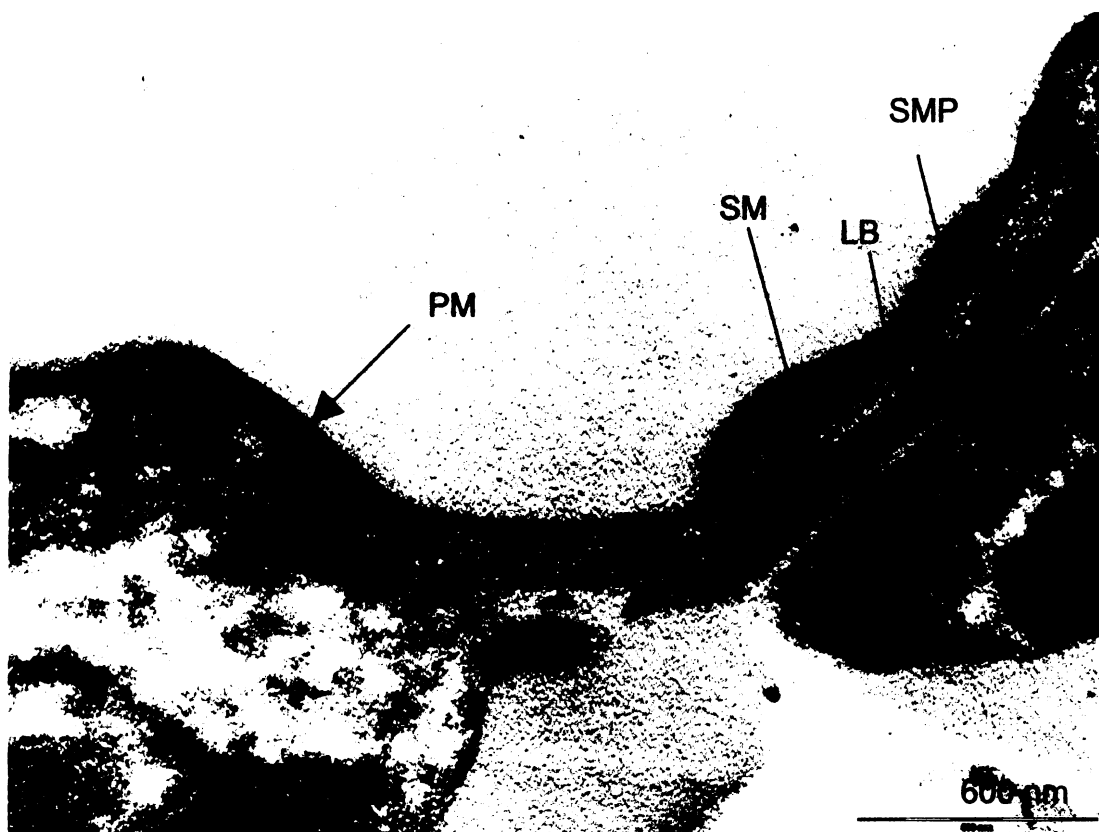
Tkáňová stádia tohoto parazita – pozdní diplostomula neboli metacercárie (viz obrázek 28) – jsme získali z oční čočky nakažených závojnatek. Po osmi týdnech infekce jsme u každé nakažené ryby našli alespoň pět metacercárií. Tyto larvy byly výrazně větší než předchozí stádia a lépe se s nimi pracovalo. U metacercárií se osvědčila zkrácená fixáž

s 2,5% GA, taninem a NaCl v Hepesu, ale i fixáž s 2,5% GA v kakodylátovém pufru. Na snímcích lze vidět výrazné záhyby tegumentu se sekrečními granuly prominujícími k povrchu. Dále pak perikaryony tegumentálního syncytia zanořené hluboko v tkáni parazita, svalovinu a četné sekreční žlázy (viz obrázek 29). A také jsme poprvé prokazatelně zdokumentovali jednovrstevnou povrchovou membránu u postcerkariálních *Diplostomum pseudospathaceum* (viz obrázky 30-31).

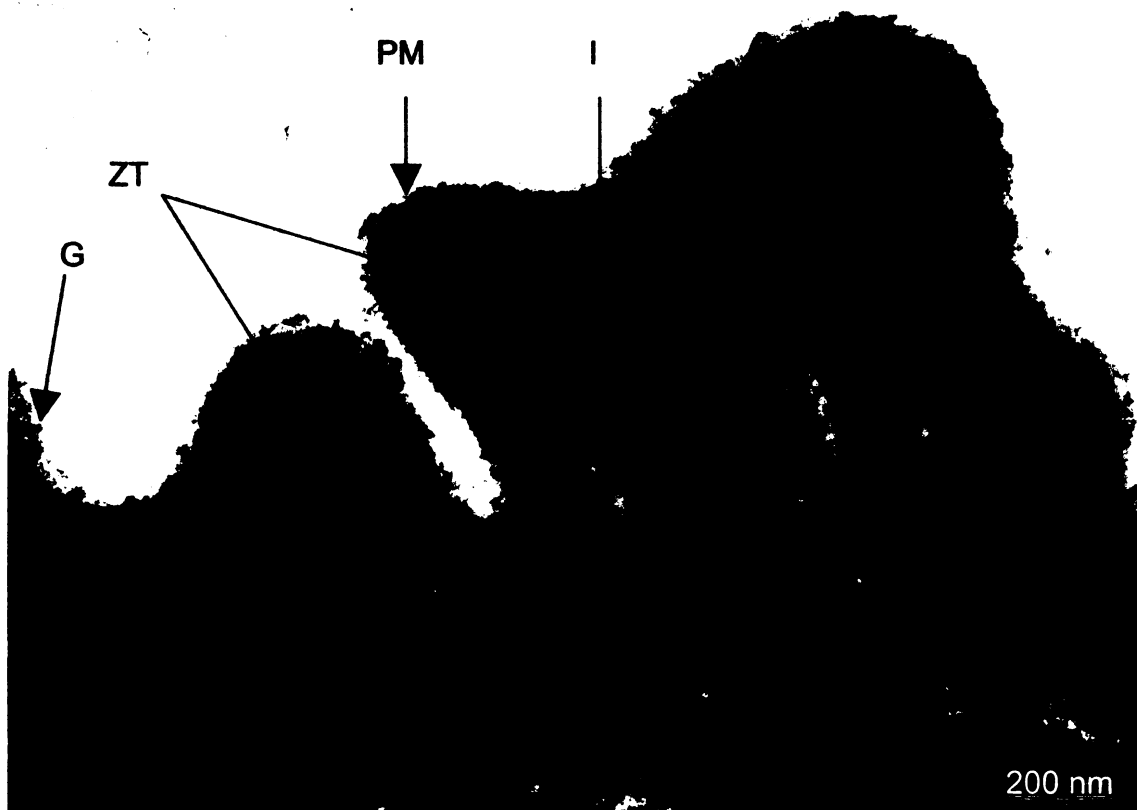
Obrázky 32 až 35 porovnávají výsledky získané použitím různých metod fixace materiálu, snímky 33 a 35 ukazují nejlepší dosažené výsledky.



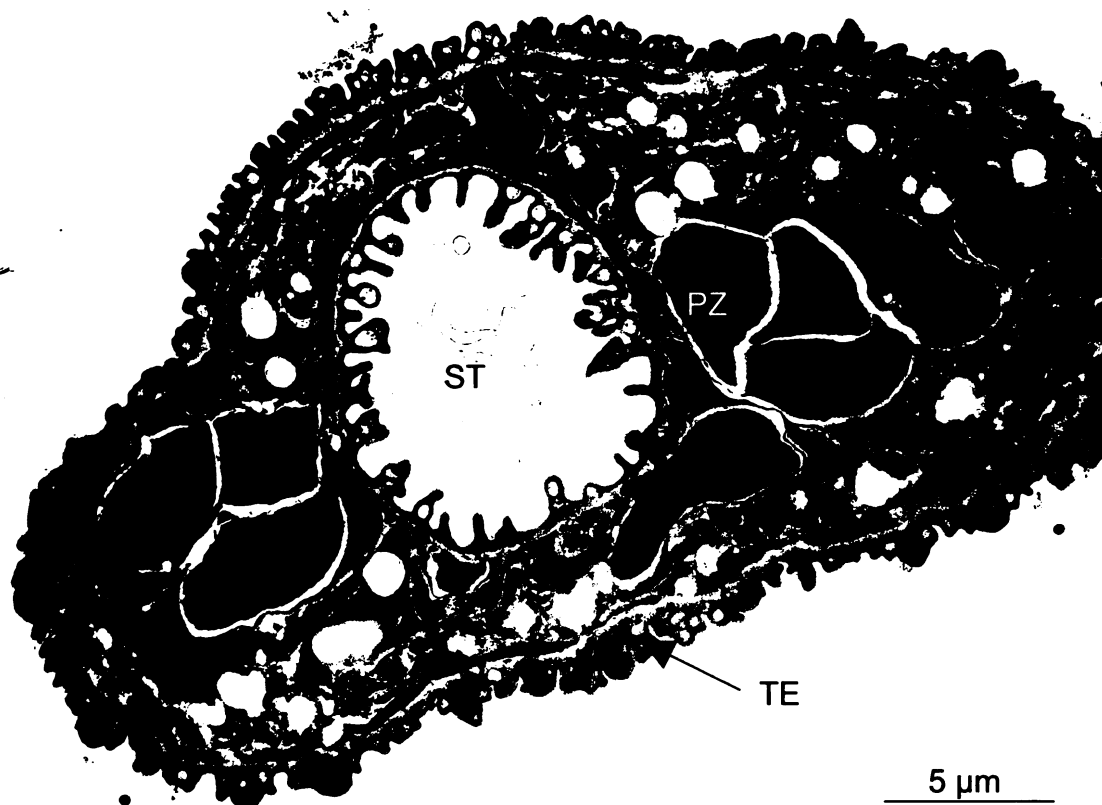
Obrázek 23: Cercárie *D. pseudospathaceum* – přechod těla v ocas. KO – kmen ocasu, T – tělo, J – jádro, ZB – žlazové buňky



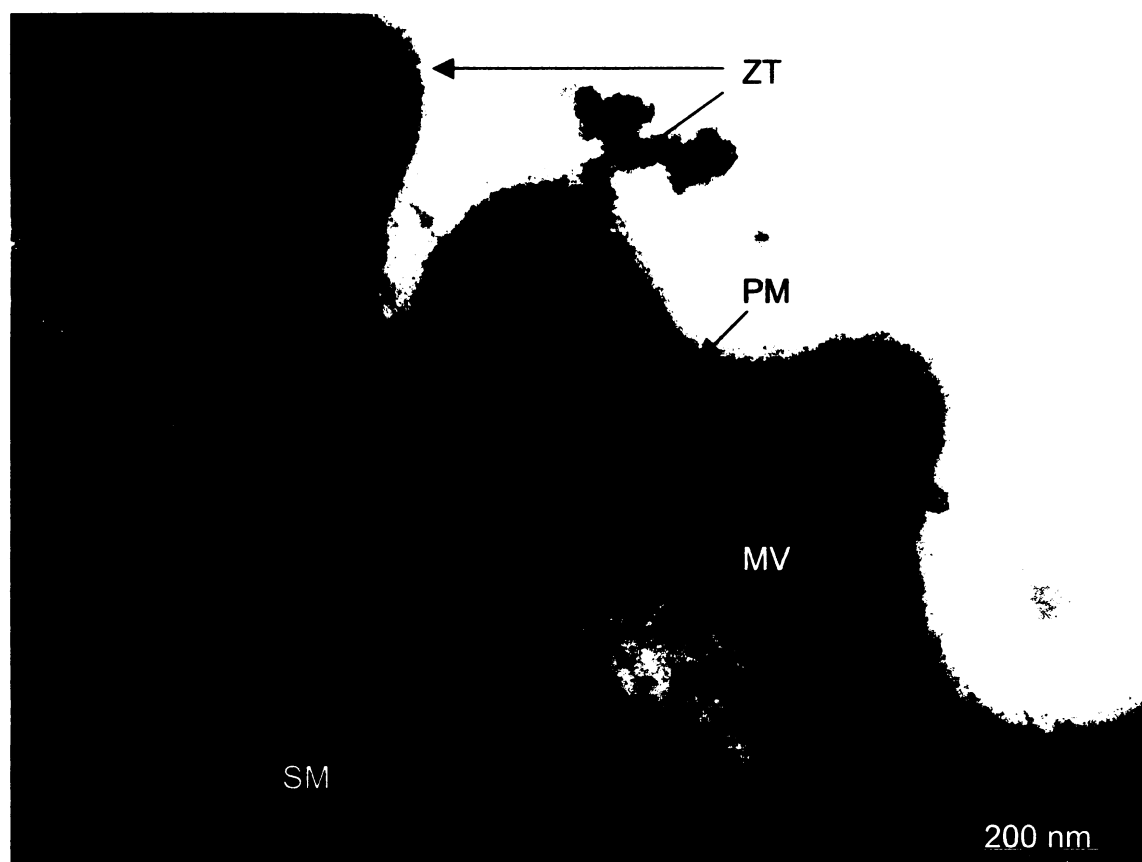
Obrázek 24: Cerkárie *D. pseudopathaceum* – detail. PM – povrchová membrána, LB – lamina basalis, SM – subtegumentální muskulatura podélná, SMP – subtegumentální muskulatura příčná



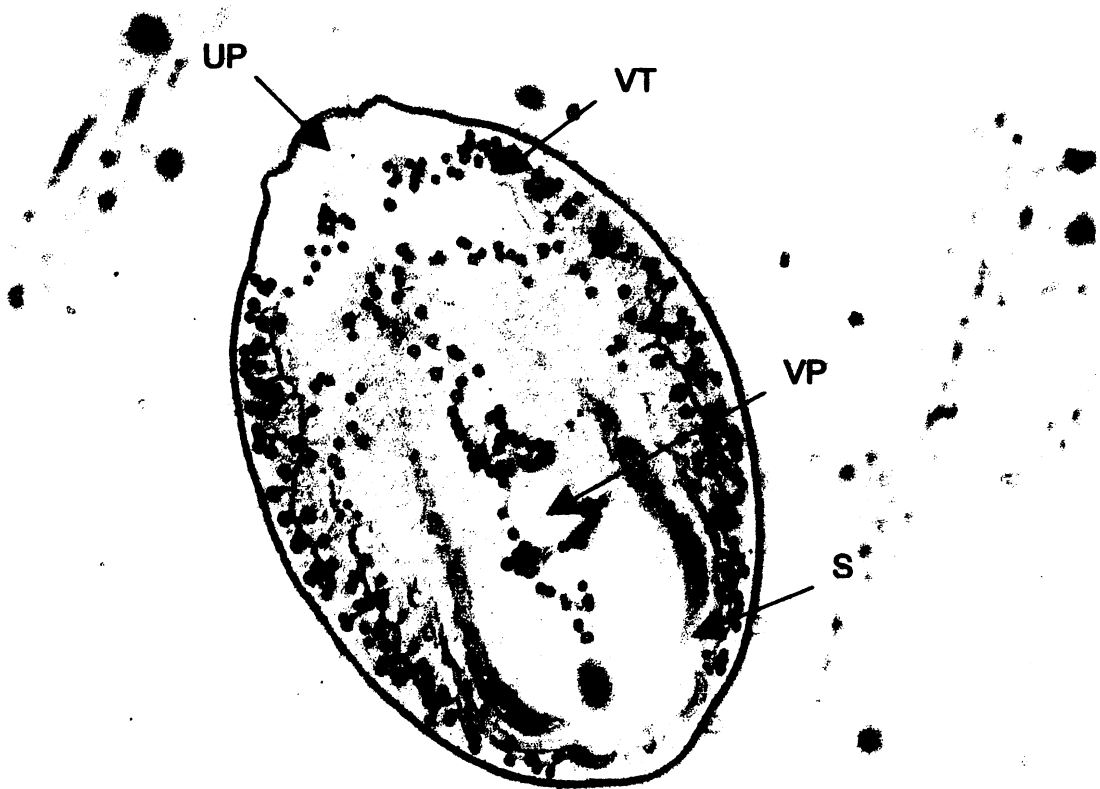
Obrázek 25: Povrch cercárie *D. pseudopathaceum*. PM – povrchová membrána, I – inkluze, ZT – záhyby tegumentu, G – glykokalyx



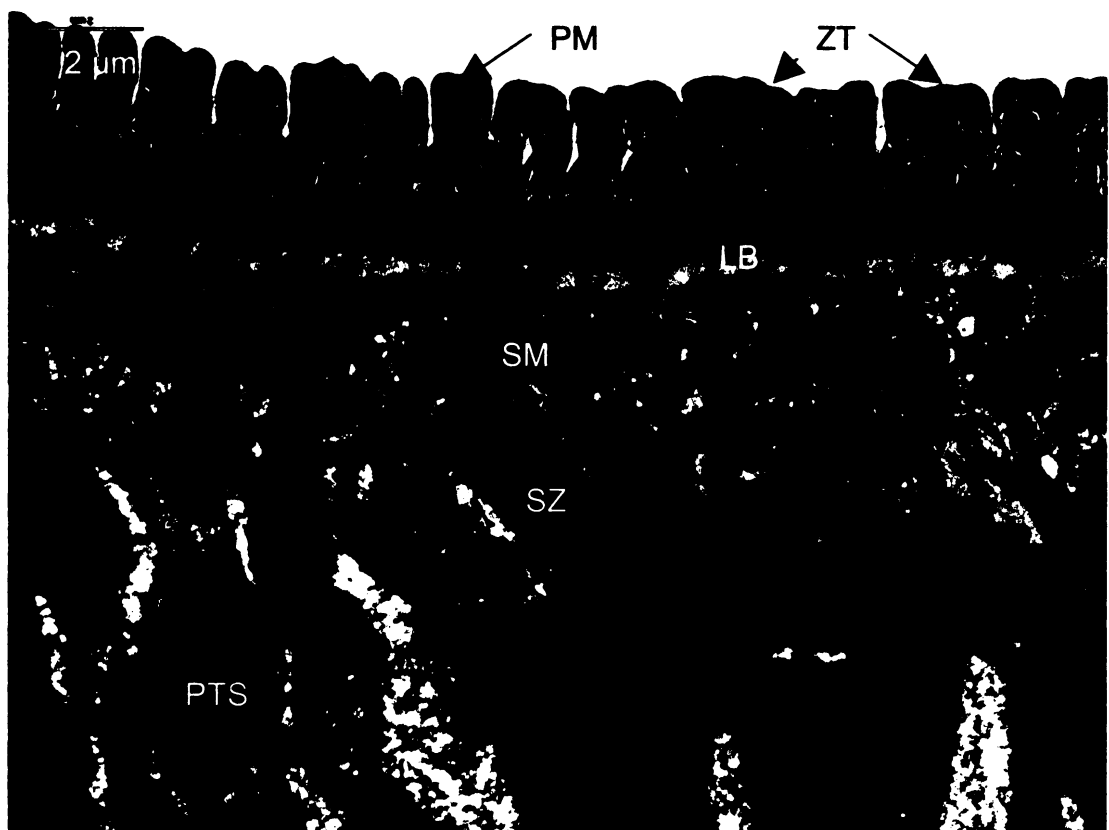
Obrázek 26: Diplostomula po transformaci *in vivo*. TE – tegument, ST – střevo, PZ – penetrační žlázy



Obrázek 27: Diplostomula po transformaci *in vivo*. PM – povrchová membrána, ZT – záhyby tegumentu, LB – lamina basalis, SM – subtegumentální muskulatura, MV – membránové vezikuly



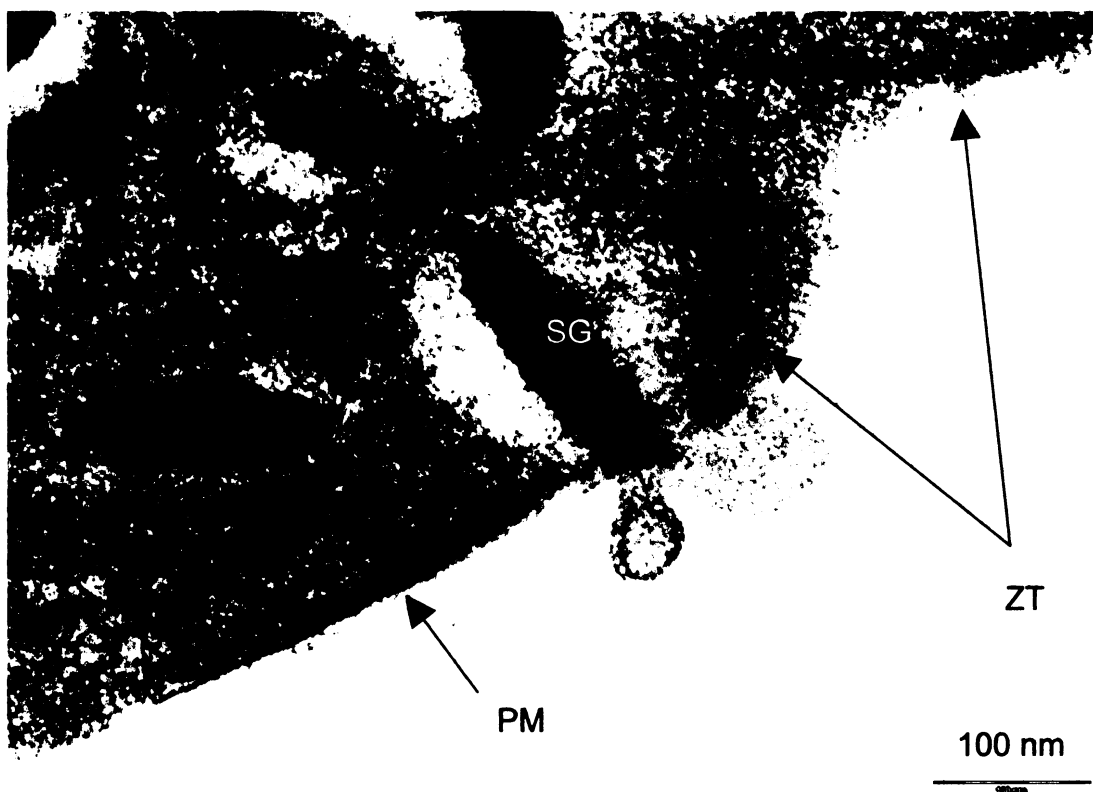
Obrázek 28: Živá metacerkárie *D. pseudospathaceum*. UP – ústní přísavka, VT – vápenatá těliska, VP – ventrální přísavka, S – střevo, zvětšeno 200x.



Obrázek 29: Tegument metacerkárie *D. pseudospathaceum*. PM – povrchová membrána, ZT – záhyby tegumentu, LB – lamina basalis, SM – subtegmentální muskulatura, PTS – perikaryony tegumentálního syncytia, SZ – sekreční žlázy



Obrázek 30: Metacerkárie *D. pseudospathaceum*. PM – povrchová membrána, ZT – záhyby tegumentu, SG – sekreční granula



Obrázek 31: Metacerkárie *D. pseudospathaceum*. Sekreční granula (SG) vyprazdňující svůj obsah do okolí. ZT – záhyb tegumentu, PM – povrchová membrána



Obrázek 32: Diplostomula, glutaraldehyd v Hapes pufru.



Obrázek 33: Pozdní diplostomula, glutaraldehyd v Hapes pufru s taninem.



Obrázek 34: Diplostomula, glutaraldehyd v sodnofosfátovém pufru se sacharosou.

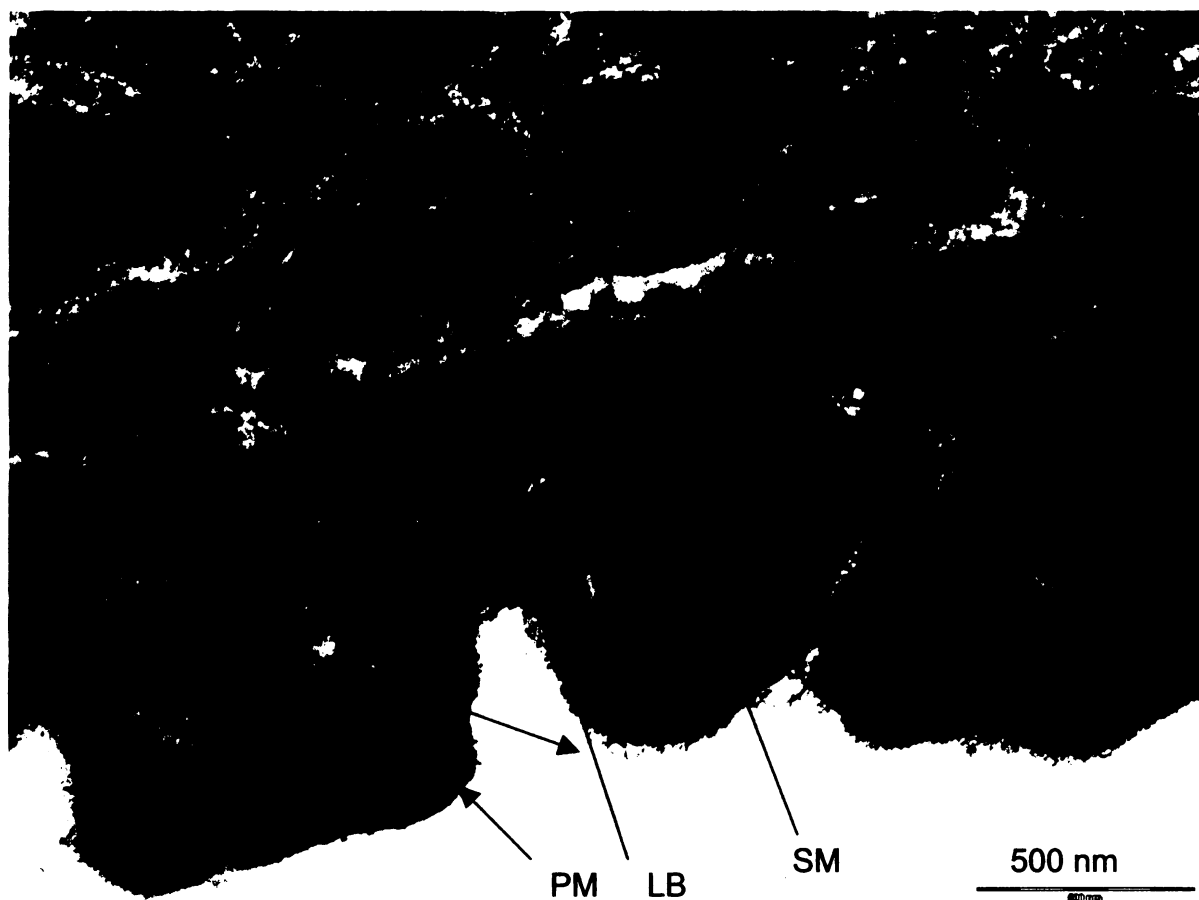


Obrázek 35: Diplostomula, glutaraldehyd v kakodylátovém pufru.

### *Sanguinicola inermis*

Ultrastrukturální pozorování druhu *Sanguinicola inermis* se dařilo pouze v případě cercárií. Transformované larvy *in vitro* se nám nepodařilo získat v dostatečném množství a larvy transformované *in vivo* se nepodařilo nafixovat a nařezat tak, aby bylo možné pozorovat jejich povrchové membrány. Problém se získáváním materiálu však značně komplikoval celou práci. Plži nakaženi *S. inermis* totiž velmi rychle hynou a vylučují velmi málo cercárií.

Na cercáriích bylo možné pozorovat jednoduchou povrchovou membránu složenou ze tří vrstev, *lamina basalis* a výraznou svalovinu (viz obrázek 36). Obecně jsou tyto struktury podobné strukturám pozorovaným u cercárií *D. pseudospathaceum* či *Schistosoma mansoni*. Výsledky získané na transformovaných larvách lze velmi obtížně interpretovat, protože tyto vzorky jsou velice tmavé v důsledku silných řezů. Jejich fotografie zde nepřikládám. Dospělé jedince pro ultrastrukturální pozorování se nám nepodařilo v *bulbus arteriosus* zachytit, našli jsme pouze vejce potvrzující infekci ryby.



Obrázek 36: Tegument cercárie *S. inermis*. PM – povrchová membrána, LB – lamina basalis, SM – subtegumentální muskulatura

## 4.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic

### Rod *Trichobilharzia*

U cercárií laboratorně drženého druhu *Trichobilharzia regenti* jsme zjistili silnou vazbu lektinů se specifitou pro L-fukosu (LTA, UEA-I), dále pak pro D-mannosu/D-glukosu (PSA, LCA – viz obrázek 38 – a slaběji ConA) a pro N-acetyl-D-galaktosamin (RCA – viz obrázek 37, JAC). S lektinem JAC velmi dobře reagovaly i E-S produkty cercárií.

Cercárie dalšího „laboratorního“ druhu *T. szidati* silně vázaly lektiny se specifitou pro L-fukosu (LTA a slabě UEA-I), dále pak pro D-mannosu/D-glukosu (PSA, LCA – viz obrázek 40 a ConA) a pro N-acetyl-D-galaktosamin (PNA, RCA – viz obrázek 39 a JAC). Pokusy na *T. regenti* a *T. szidati* byly prováděny paralelně. Z výsledků vyplývá téměř 100% podobnost obou druhů po stránce glykosylace tegumentu cercárií.



Druh *T. franki* byl nalezen v jižních Čechách v průběhu tří sezón pouze jedenkrát. Glykosylace tegumentu *T. franki* se velmi podobala glykosylaci předešlých dvou druhů. Cerkárie *T. franki* silně vázaly lektiny se specifitou pro L-fukosu (LTA, UEA-I kde docházelo k výrazná aglutinaci viz obrázek 41), dále pak pro D-mannosu/D-glukosu (PSA, slaběji ConA a LCA) a N-acetyl-D-galaktosamin (JAC a slabě RCA).

*T. szidati* vykazuje odlišnosti od ostatních studovaných druhů čeledi (viz tabulka 9, tabulka 10 na menší škále lektinů porovnává naše výsledky s publikovanými studiiemi) u lektinů UEA-I a ConA. U ConA se jedná pouze o rozdíl v síle reakce. V případě lektinu PNA je reakce ohodnocena „+“ oproti ostatním dvěma druhům kde je ohodnocena „-“.

Nejvýraznější rozdíly v povrchové glykosylaci jsou tedy v případě *T. franki*, kdy dva lektiny (LCA, RCA) reagují slaběji než u ostatních dvou druhů a naopak slabá reakce (+) je pozorována u lektinů ECL, SBA kde u ostatních druhů nedochází k reakci žádné.

**Tabulka 9:** Povrchová glykosylace cercárií *Trichobilharzia regenti*, *T. szidati* a *T. franki*. Rozšířené spektrum lektinů.

LEKTIN	<i>T. regenti</i>	<i>T. szidati</i>	<i>T. franki</i>
PWM	0	0	0
WGA	±/-	+/-	+/ $\pm$
WGA suc	±	+/-	±
DBA	-	-	-
BS-II	0	0	0
LTA	++	++	++
UEA-I	++	+	++
HPA	-	-	-
PNA	-	+	-
GSL	-	-	-
GSL II	-	-	-
SBA	-	-	+/-
SJA	-	-	-
ECL	-	-	±
RCA-I	++	++	+
JAC !	++	++	++
ConA	++	++	++
LCA	++	++	+
PSA	+	++	+
PHA-E	-	-	-
PHA-L	-	-	-

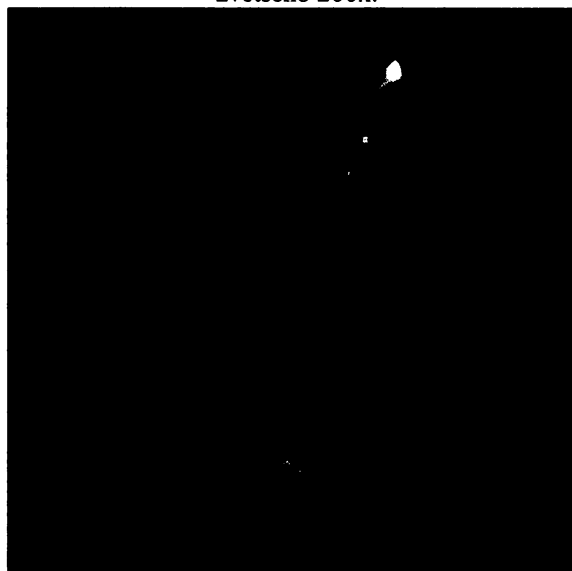
**Lektiny:** +/- tělo/ocas; ++ silná fluorescence; + slabá fluorescence; ± velmi slabá fluorescence; - žádná fluorescence; 0 netestováno; ! nespecifická reakce; PWM – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin, galaktosu, LTA – specifita pro L-fukosu, HPA – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin, ConA – specifita pro D-mannosu, PSA – specifita pro D-glukosu, PHA – komplexní specifita



**Obrázek 37:** Cercárie *T. regenti* lektin RCA, zvětšeno 200x.



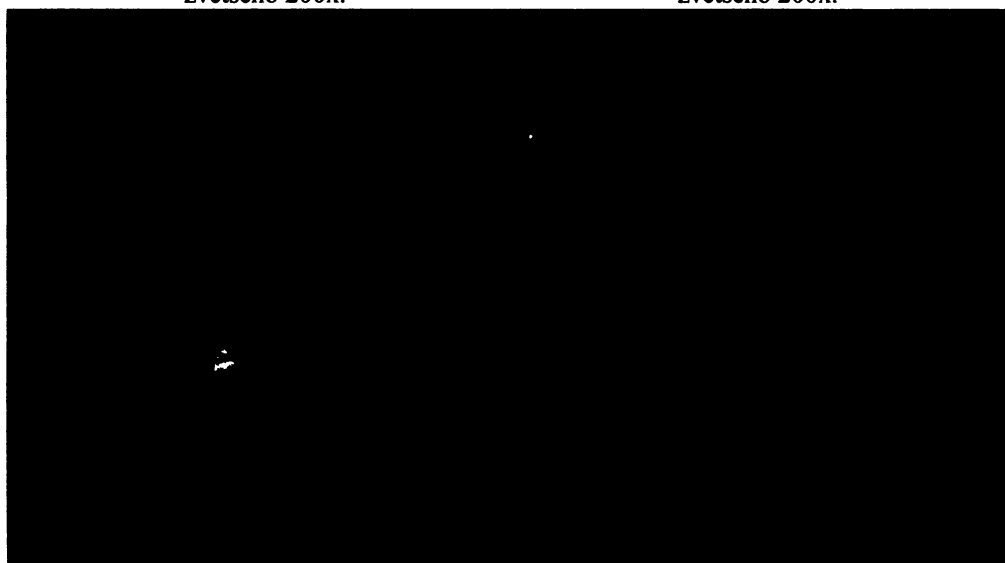
**Obrázek 38:** Cercárie *T. regenti* lektin LCA, svlékání glykokalyx, zvětšeno 200x.



**Obrázek 39:** Cercárie *T. szidati* lektin RCA, zvětšeno 200x.



**Obrázek 40:** Cercárie *T. szidati* lektin LCA, zvětšeno 200x.



**Tabulka 10:** Glykosylace cercárií čeledi Schistosomatidae. Shrnutí pěti studií a získaných výsledků. Užší paleta lektinů vyplývající z publikací.

LEKTIN	<i>T.s.</i> <sup>1,2</sup>		<i>S.m.</i> <sup>3</sup>		<i>T.r.</i> <sup>4,5</sup>		<i>T.f.</i>		<i>T.r.</i>		<i>T.s.</i>	
	Tělo	Ocas	Tělo	Ocas	Tělo	Tělo	Ocas	Tělo	Ocas	Tělo	Ocas	
PWM	+	+	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
WGA	++	-	+	-	-	+	±	±	-	+	-	-
DBA	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BS-II	-	-	+	-	-	0	0	0	0	0	0	0
LTA	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++
UEA-I	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+
HPA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SBA	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
WFA	0	0	+	-	0	0	0	0	0	0	0	0
RCA-I	++	++	+	-	-	+	+	++	++	++ !	++ !	++ !
	++	++	0	0	+	++	++	++	++	++	++	++
	+	+	0	0	-	+	+	++	++	++	++	++
	-	-	+	-	+	+	+	+	+	++	++	++

**Motolice:** *T.s.* – *Trichobilharzia szidati*, *S.m.* – *Schistosoma mansoni*, *S.mg.* – *Schistosoma margrebowiei*, *T.r.* – *Trichobilharzia regenti*, *T.f.* – *Trichobilharzia franki*. **Lektiny:** ++ silná fluorescence; + slabá fluorescence; ± velmi slabá fluorescence; - žádná fluorescence; 0 netestováno; ! nespecifická reakce; Modrá – specifita pro N-acetyl-D-glukosamin, galaktosu, Ružová – specifita pro L-fukosu. Zelená – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin.

Černá – komplexní specifita. **Citace:** <sup>1</sup>Horák kol., 1997a; <sup>2</sup>Horák a Mikeš, 1995; <sup>3</sup>Linder, 1984; <sup>4</sup>Frýzková, 2004 – pouze řezy cercárii; <sup>5</sup>Blažová a Horák, 2005

### Rod *Echinostoma*

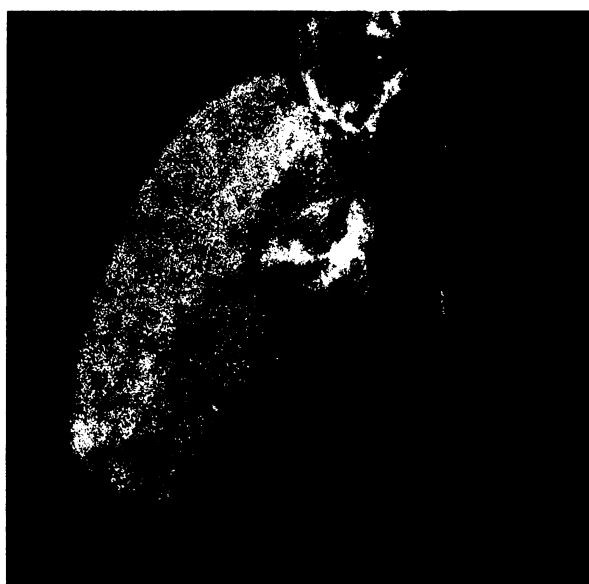
Naše pokusy prokázaly, že tegument cercárií *E. revolutum* obsahuje převážně N-acetyl-D-galaktosamin (HPA, SBA, PNA – viz obrázek 42, RCA, ECA a JAC). Slabá reakce byla také pozorována u lektinu rozeznávajícího N-acetyl-D-glukosamin (SJA) a D-mannosu/D-glukosu (ConA).

Cercárie *E. spiniferum* reagovaly silně s lektiny specifickými pro N-acetyl-D-galaktosamin (SBA, PNA, RCA, ECA – viz obrázek 43 a JAC) a velmi slabě s lektinem s komplexní specifitou (PHA-E). Vazbu lektinů JAC a PHA-E se však nepodařilo zablokovat specifickým inhibitorem.

Z porovnání výsledků získaných na obou druzích vyplývají poměrně významné rozdíly v případě lektinů HPA a SJA. Rozdíly v intenzitě reakcí jsou také u lektinů PNA, RCA a JAC. Výsledky našich pokusů a výsledky práce již publikované shrnuje tabulka 11.



**Obrázek 42:** Cercárie *E. revolutum* lektin PNA, zvětšeno 100x.



**Obrázek 43:** Cercárie *E. spiniferum* lektin ECA, zvětšeno 200x.

**Tabulka 11:** Glykosylace cercárií. Shrnutí publikované studie a našich výsledků

LEKTIN	<i>E. revolutum</i> <sup>1</sup>	<i>E. revolutum</i>	<i>E. spiniferum</i>
BSA	-	0	0
WGA	-	-	-
WGA <sub>SUC</sub>	0	-	-
SJA	0	+	-
DBA	0	-	-
HPA	++	+	-
SBA	++	++	++
PNA	++	++	+*
RCA	++	++	+
ECA	0	++	++
GSI	0	-	-
JAC <sup>!</sup>	0	++	+
	-	++	-
	-	-	-
	-	-	-
LTA	0	-	-
UEA	0	-	-
PHA-E <sup>!</sup>	0	-	±
PHA-L	0	-	-

**Citace:** <sup>1</sup>Mikeš a Horák (1995). **Lektiny:** +/- tělo/ocas; ++ silná fluorescence; + slabá fluorescence; ± velmi slabá fluorescence; - žádná fluorescence; 0 netestováno; ! nespecifická reakce; \*aglutinuje. Modrá – specifita pro N-acetyl-D-glukosamin, galaktosu, Ružová – specifita pro L-fukosu, Zelená – specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin, Černá – komplexní specifita.

### 4.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce ptačími schistosomami

#### 4.3.1. Antigeny *Trichobilharzia regenti*

##### Western blotting

Celkový homogenát cercárií *T. regenti* byl elektroforeticky separován a přebloťován na membránu. Byla testována séra čtyř jednorázově infikovaných kachen (A, B, C, D), odebíraná v 7., 14. a 21. dnu po infekci a séra čtyř kachen s trojnásobnou reinfekcí (RE1-RE4) v sedmidenních intervalech, odebraná 7 dní po poslední infekci. Antigeny na membráně reagovaly se séry infikovaných kachen nejčastěji v oblasti 38 kDa a to konkrétně v 12 případech ze 16. Krevní séra čtyř reinfikovaných kachen reagovala téměř shodně v oblasti kolem 200 a 38 kDa (viz proužky 14 – 17 obrázku 44). Séra RE2 a RE4 pak ještě navíc v oblasti 42 kDa. Sérum RE2 reagovala na blotu jako jediné z této sady v oblasti 50 kDa.

Krevní séra čtyř kachen která byla odebírána po týdnu v průběhu infekce (označená A, B, C, D) vykazovala značné rozdíly.

„A“ sérum v prvním týdnu infekce reagovalo v oblasti kolem 200 a 93 kDa, v druhém týdnu tato reakce přetrvávala, ale přidávaly se k ní ještě reakce na 50 a 42 kDa. V třetím týdnu se zachovaly reakce na 93, 50 a 42 kDa a přidala se reakce na 38 kDa. Dochází zde tedy k reakcím s rozdílnými antigeny. Tato séra jsou na blotu (obrázek 44) na proužcích 2 – 4.

„B“ sérum reagovalo na blotu odlišně, i když tendence k reakcím s rozdílnými antigeny v průběhu životního cyklu byla shodná. V prvním týdnu reagovalo sérum pouze v oblasti 38 kDa, v druhém již s oblastí kolem 200, 93, 42 a 38 kDa a v třetím týdnu s 93, 50, 42 a 38 kDa. Tato séra jsou na blotu (obrázek 44) na proužcích 5 – 7.

„C“ sérum reagovalo v prvním týdnu v oblasti kolem 200, 50 a 38 kDa, v druhém týdnu v oblasti 50 a 38 kDa a ve třetím již pouze v oblasti 50 kDa. Slábnoucí tendence reakce u tohoto séra byla v rozporu s ostatními třemi používanými séry v tomto pokusu. Tato séra jsou na blotu (obrázek 44) na proužcích 8 – 10.

„D“ sérum bylo odebíráno o jeden den dříve než ostatní séra. D6 reagovalo v oblasti 42 kDa, 13 dpi a 20 dpi byly jeho reakce shodné v oblasti kolem 200, 93, 50 a 38 kDa. Reakce tohoto séra sílí s postupem infekce, ale jednotlivé antigeny s kterými séra reagují se objevují v jiném pořadí než u sér A, B a C. „D“ séra jsou na blotu (obrázek 44) na proužcích 11 – 13.

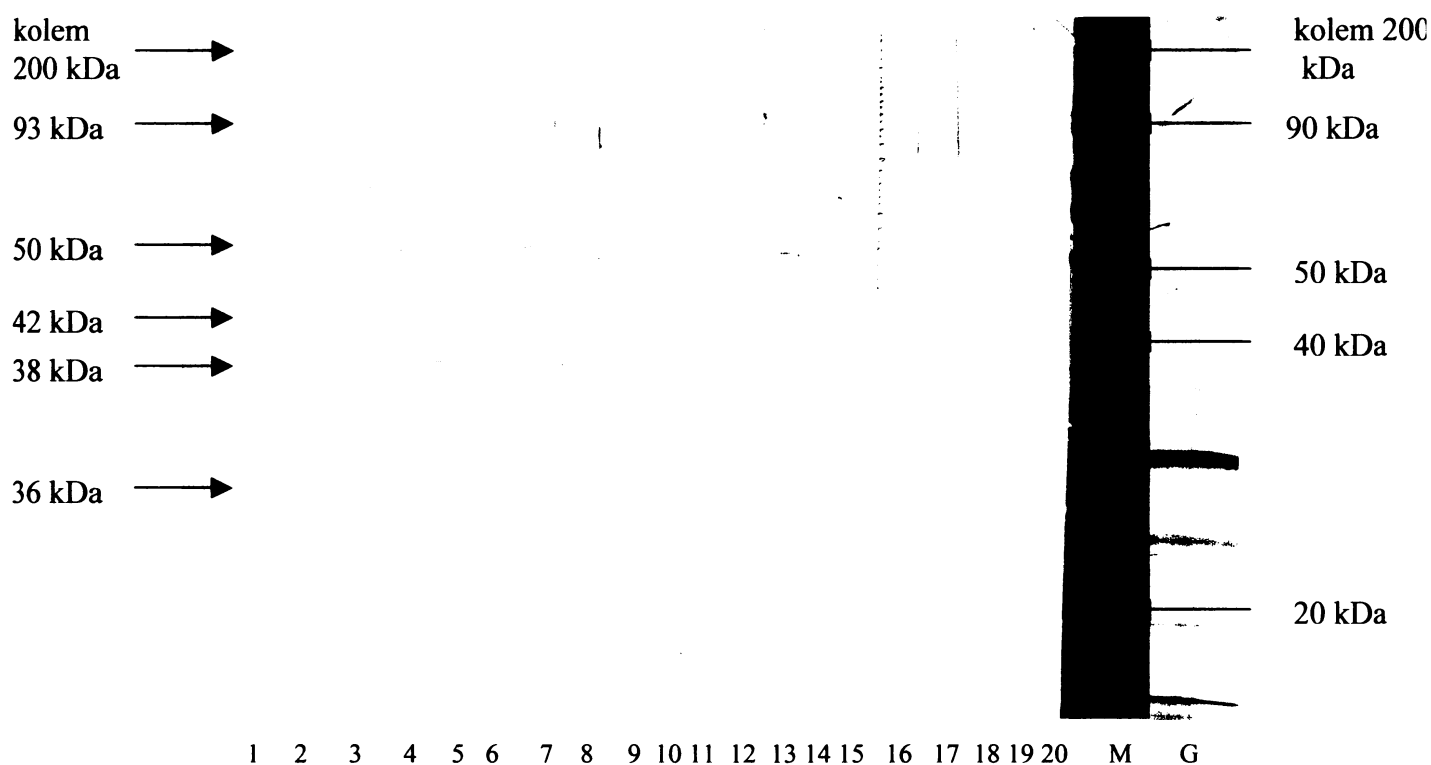
U všech čtyř krevních sér 7 dné p. i. (A7, B7, C7 a D7) není převládající žádný z vyskytujících se antigenů. Odlišná situace je u sér 14 dpi kde dochází k většinové reakci s antigeny v oblasti kolem 200, 93, 50 a 38 kDa a podobně u sér 21 dpi kde jsou převládajícími antigeny o velikosti 50 a 38 kDa.

Každá z kachen reagovala unikátně v průběhu infekce. Přehledněji jsou výše uvedené údaje shrnuty v tabulce 12.

Při testování zkřížené reakce antigenů *T. regenti* se séry kachen infikovaných *T. szidati* (se séry szidati 15 dní p. i. = S15, S24 dpi a S30 dpi; proužky 18-20 obrázku 44), tato reagovala shodně v oblasti 26 kDa, tedy v oblasti, kde séra kachen infikovaných *T. regenti* nereagovala. Jedná se o zkříženou reakci, i když velmi slabou. Sérum S15 reagovalo také v oblasti 42 kDa.

Jako kontrola zde sloužilo sérum z kachny imunizované prasečím  $\gamma$ -globulinem, čímž byla zajištěna vysoká hladina nespecifických imunoglobulinů pro případné vyloučení nespecifických reakcí daných pouze vysokou hladinou celkových Ig). Kontrolní sérum nereagovalo v žádné oblasti blotu (proužek 1 na obrázku 44), všechny reakce protilátek z imunizovaných kachen byly tedy považovány za specifické.

Tento pokus byl dvakrát opakován v kompletním rozsahu s podobným výsledkem, dílčí výsledky byly získány na 12% gelu.



**Obrázek 44:** Western blot: vazba kachních protilátek na homogenát cercárií *T. regenti*. A – D označení jednotlivých kachen infikovaných *T. regenti*; 6 – 30 počet dní od začátku infekce k odběru krve; RE1 – RE4 – označení jednotlivých kachen reinfikovaných *T. regenti*; S – označení jednotlivých kachen infikovaných *T. szidati*. Séra použitá na jednotlivé proužky: 1 – Negativní (imunizace prasečím  $\gamma$  globulinem), 2 – A7, 3 – A14, 4 – A21, 5 – B7, 6 – B14, 7 – B21, 8 – C7, 9 – C14, 10 – C21, 11 – D6, 12 – D13, 13 – D20, 14 – RE1, 15 – RE2, 16 – RE3, 17 – RE4, 18 – S15, 19 – S24, 20 – S30, M – markery, G – obarvený gel.

### Ligandový blot

Pro ligandový blot jsme z důvodů nedostatku materiálu použili zúženou paletu lektinů a pouze dve opakování. Lektiny WGA<sub>suc</sub>, PSA, LCA, SBA, UEA-I a LTA však svou specifitou pokryly širokou škálu sacharidů, které rozeznávají. Lektiny byly vybírány na základě znalosti glykosylace tegumentu živých cercárií *T. reganti*. První pokus byl prováděn na 12% polyakrylamidovém gelu a NC membráně. Na ligandovém blotu došlo k četným nespecifickým reakcím. Na základě této zkušenosti jsme membránu lépe blokovali a použili směsi sacharidových inhibitorů. V druhém pokuse byl použit 10% gel a PVDF membrána. V tomto případě nebyla na ligandovém blotu pozorována žádná reakce.

### Imunohistochemie

Shodná séra jako byla použita na blot jsme aplikovali na histologické řezy cercárií *T. regenti*. Sledovali jsme, zda rozdílné reakce na blotu nějak korelují s rozdílnými reakcemi konkrétního séra na řezech.

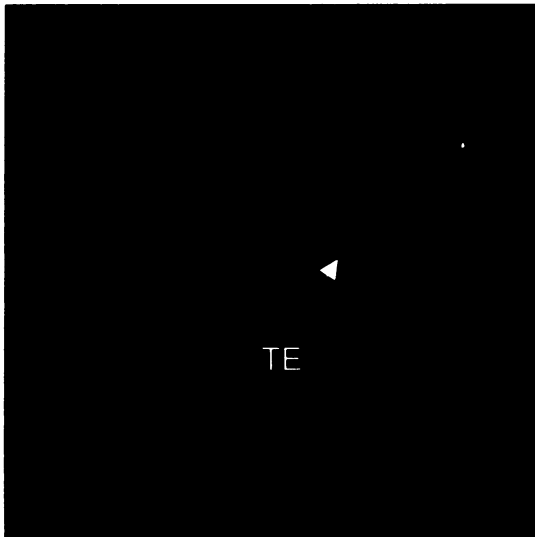
U krevních sér B7 a C7 je patrná reakce vnitřní struktury cercárií těsně pod povrchem (nejspíše se jedná o svalovinu) v případě B14 a C14 je reakce ještě o něco intenzivnější. 21 dpi v obou případech tato reakce mizí a alespoň slabě se objevuje reakce s tegumentem. Tento vývoj lze pozorovat i u sér „A“ (obrázky 45 – 47), s jedinou výjimkou, a to v případě séra A7, kde reaguje také tegument řezů cercárií. U sér „D“ (obrázky 54 – 56) je reakce se svalovinou shodná u sér 6 a 13 ale odlišná v případě 20 dpi, kde vůbec nereaguje tegument, ani žádná jiná struktura.

Obecně tedy převládají reakce séra 7 a 14 (A, B, C a D) se „svalovinou“ a sér 21 s tegumentem. Jako kontrolní sérum sloužilo opět sérum kachny imunizované prasečím  $\gamma$ -globulinem, které nevykazovalo vazbu k žádným strukturám. Pokusy na řezech byly opakovány čtyřikrát.

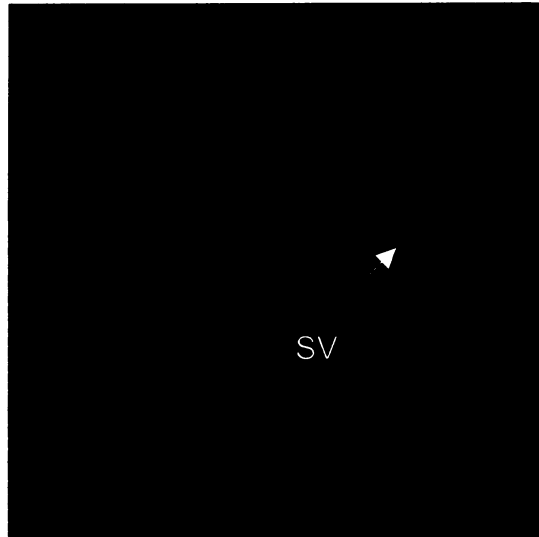
Séra reinfikovaných kachen (RE1 – RE4 viz obrázky 57 – 60) reagovala na řezech shodně s tegumentem cercárií. Podobná situace nastala u sér S15, S24 a S30, kde došlo ke zkřížené reakci tegumentu cercárií *T. regenti* a sér kachen infikovaných *T. szidati*.

U všech zmíněných testovaných sér je však oproti kontrolnímu séru patrná velmi slabá reakce celého těla cercárie včetně ještě slaběji reagujícího ocásku.





**Obrázek 45:** Sérum A7, zvětšeno 200x.

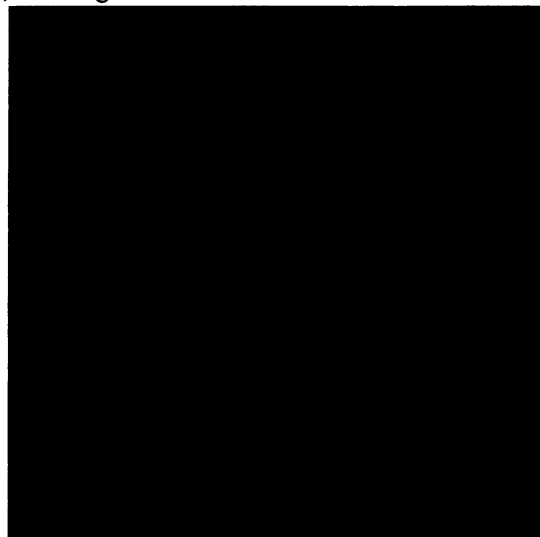


**Obrázek 48:** Sérum B 7, zvětšeno 200x.

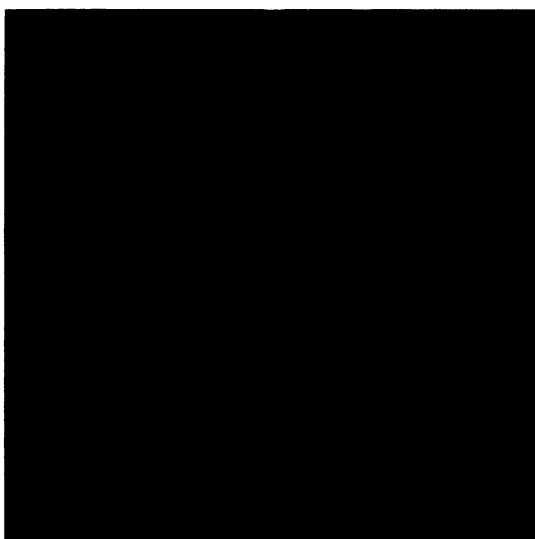
SV – „svalovina“ cercáři, TE – tegument cercáři



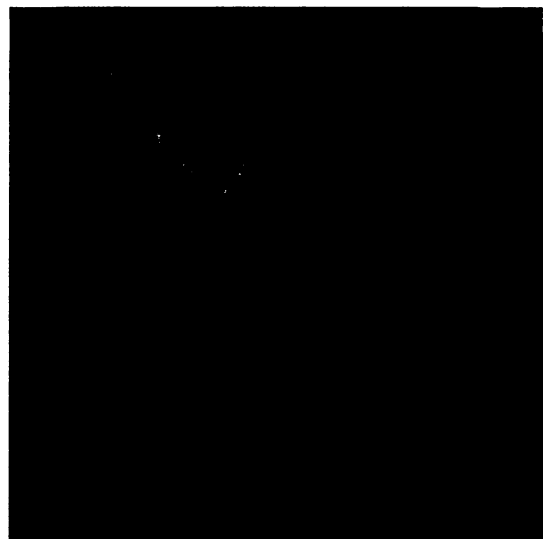
**Obrázek 46:** Sérum A14, zvětšeno 200x.



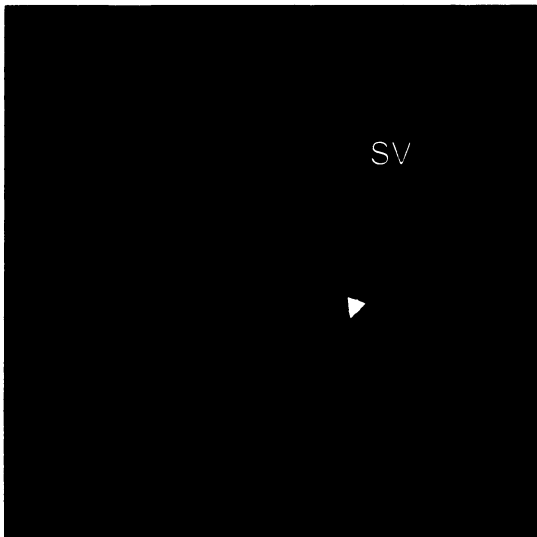
**Obrázek 49:** Sérum B14, zvětšeno 200x.



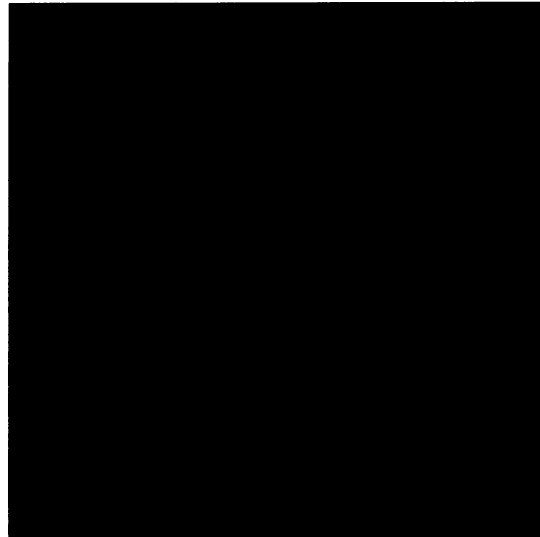
**Obrázek 47:** Sérum A21, zvětšeno 200x.



**Obrázek 50:** Sérum B21, zvětšeno 200x.



**Obrázek 51:** Sérum C7, zvětšeno 200x.



**Obrázek 54:** Sérum D6, zvětšeno 200x.

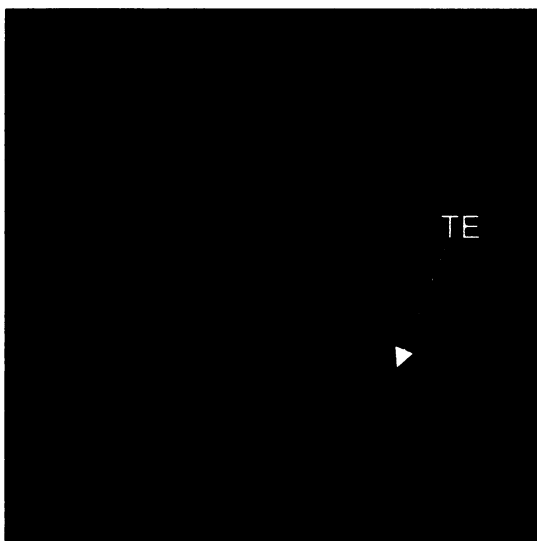
SV – „svalovina“ cercárií,



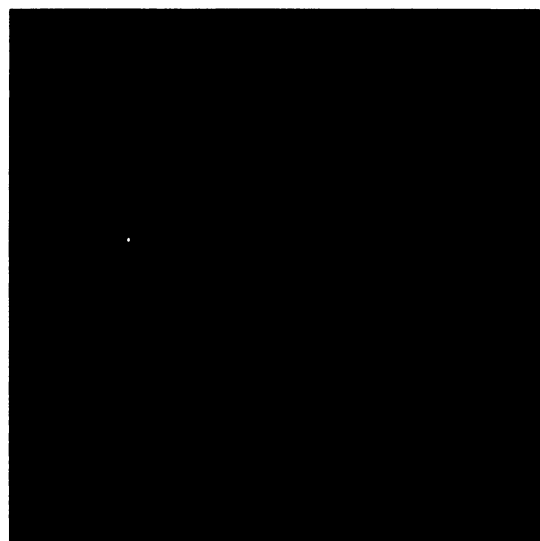
**Obrázek 52:** Sérum C14, zvětšeno 200x.



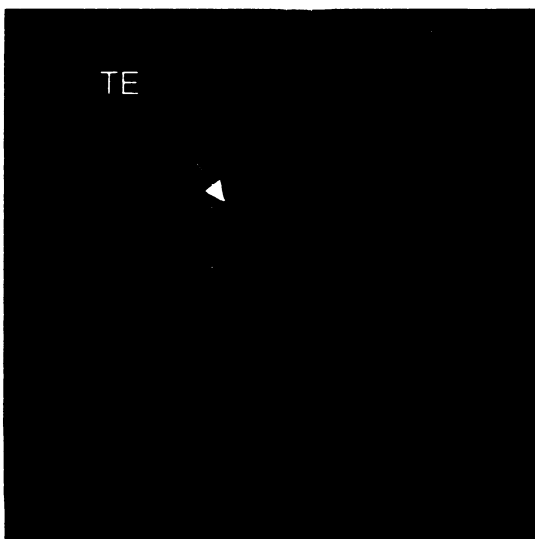
**Obrázek 55:** Sérum D13, zvětšeno 200x.



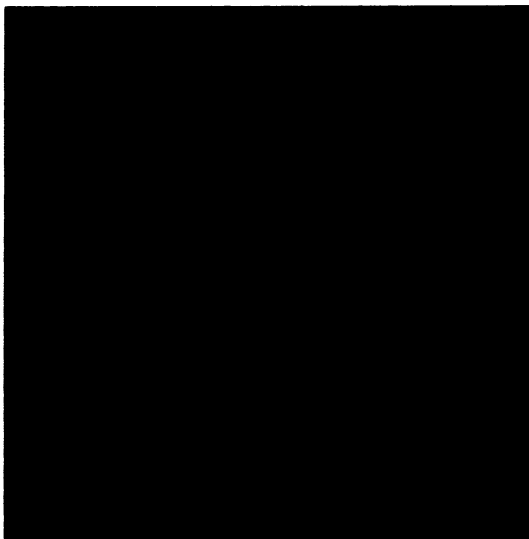
**Obrázek 53:** Sérum C21, zvětšeno 200x.  
TE – tegument cercárií



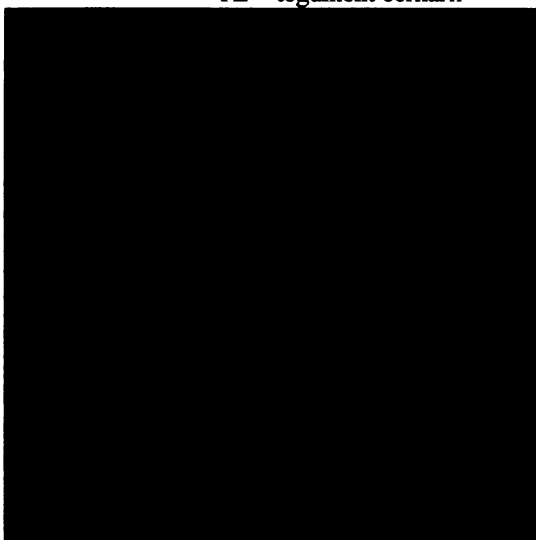
**Obrázek 56:** Sérum D20, zvětšeno 200x.



**Obrázek 57:** Sérum RE1, zvětšeno 200x.  
TE – tegument cercárií



**Obrázek 58:** Sérum RE2, zvětšeno 200x.



**Obrázek 59:** Sérum RE3, zvětšeno 200x.



**Obrázek 60:** Sérum RE4, zvětšeno 200x.



**Obrázek 61:** Sérum S30, zvětšeno 200x.



**Obrázek 62:** Sérum negativní, zvětšeno 200x.

**Tabulka 12:** Reakce jednotlivých krevních sér s antigeny cercárií *T. regenti* s a reakce pozorované na řezech cercárií

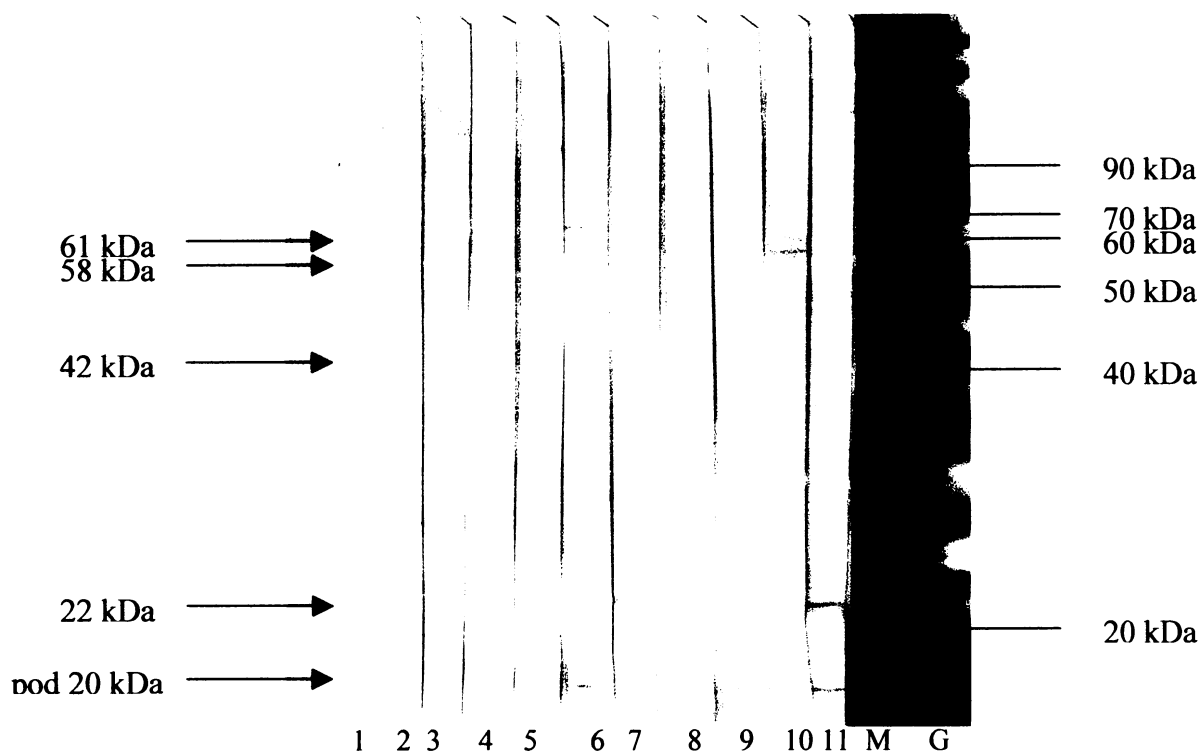
Kachna - sérum	Proužek blotu	Kolem 200 kDa	93 kDa	50 kDa	42 kDa	38 kDa	26 kDa	Reakce řezů cercárií
Negativní	1							
A14	3	+	+	+	+			„svaly“
B14	6	+	+		+	+		„svaly“
C14	9			+		+		„svaly“
D13	12	+	+	+		+		„svaly“
RE1	14	+				+		povrch
RE2	15	+		+	+	+		povrch
RE3	16	+				+		povrch
RE4	17	+			+	+		povrch
S15	18				+		+	povrch
S24	19						+	povrch
S30	20						+	povrch

A – D označení jednotlivých kachen infikovaných *T. regenti*; 6 – 30 počet dní od začátku infekce k odběru krve; + reakce v daném místě blotu; [redacted] odběr dva týdny od infekce; [redacted] séra reinfikovaných kachen *T. regenti*; S – séra kachen infikovaných *T. szidati*.

#### 4.3.2. Antigeny *Trichobilharzia szidati*

Krevní séra kachen infikovaných druhem *T. szidati* („S“) reagují shodně nespecificky v oblasti 22 kDa. Specifická reakce se objevila u těchto šesti krevních sér shodně v oblasti pod 20 kDa. Sérum S15 dpi reagovalo specificky v oblasti 61 kDa, sérum S22 dpi v oblasti 42 kDa – shodně jako séra D6 a D13 z kachen infikovaných *T. regenti*. Krevní sérum S30 také reagovalo specificky v oblasti 58 kDa.

Séra z kachen nakažených *T. regenti* reagovala s antigeny cercárií *T. szidati* v případě sér D6 a D13 (proužek 2, 3 na obrázku 63) v oblasti 22 kDa. V této oblasti reagovalo i kontrolní sérum a jedná se tedy zřejmě o nespecifickou reakci. Séra D6 a D13 reagovala též v oblasti 42 kDa. Zde se jedná s specifickou, zkříženou reakci. Séra D21 a RE2 (proužek 4 a 5 na obrázku 63) – odebraná po třech týdnech infekce či reinfekce *T. regenti* nereagovala v žádné oblasti blotu. Tyto výsledky shrnuje tabulka 13.



**Obrázek 63:** Western blott: vazba kachních protilátek na pelet homogenátu cercárií *T. szidati*. Séra použitá na jednotlivé proužky: 1 – Negativní (imunizace prasečím  $\gamma$  globulinem), 2 – D6, 3 – D13, 4 – D20, 5 – RE2, 6 – S15, 7 – S22, 8 – S24, 9 – S28, 10 – S30, 11 – S31, M – markery, G – obarvený gel.

**Tabulka 13:** Reakce jednotlivých krevních sér s antigeny cercárií *T. szidati*

Sérum	Proužek blotu	61 kDa	58 kDa	42 kDa	22 kDa	Pod 20 kDa
Negativní	1				+	
D13	3			+	+	
RE2	5					
S15	6	+			+	+
S22	7			+	+	+
S24	8				+	+
S28	9				+	+
S30	10		+		+	+
S31	11				+	+

A – D označení jednotlivých kachen infikovaných *T. regenti*; 6 – 30 počet dní od začátku infekce k odběru krve; + reakce v daném místě blotu; [redacted] odběr dva týdny od infekce; [redacted] séra reinfikovaných kachen *T. regenti*; S – séra kachen infikovaných *T. szidati*; případy kdy nebylo stanoveno zda jde o specifickou reakci.

## 5. DISKUSE

### 5.1. Charakterizace sacharidových epitopů a povrchové ultrastruktury larev vybraných druhů motolic

Naše práce s věnovala z velké části druhu *D. pseudopathaceum* který nás po stránce glykosylace zajímal hlavně kvůli využitelnosti lektinových markerů transformace při objasňování vlivu cathepsinu L na svlékání glykokalyxu cercárií. *Sanguinicola inermis* zde sloužila hlavně pro porovnání tendence k redukci sacharidových epitopů. Druhy trichobilharzií, ať už získané z chovů nebo z přírody, měly ověřit využitelnost povrchové glykosylace pro rozlišení jednotlivých druhů. Právě u těchto druhů by byla druhová determinace pomocí glykosylace velmi přínosným poznatkem, který by usnadnil orientaci mezi cercáriemi této čeledi. Pro srovnání jsme využili cercárie druhů *E. spiniferum* a *E. revolutum*.

Porovnáním našich výsledků získaných na cercáriích druhu *D. pseudopathaceum* s již publikovanými výsledky (Horák a Mikeš, 1995) jsme zjistili pouze drobné neshody v případě dvou testovaných lektinů (PNA a ConA). Nejvýraznější odchylku v případě lektinu ConA si vysvětlují odlišností šarže použitého lektinu či inkubační vzorků v lednici, což mohlo v našem případě zpomalit odvrhávání glykokalyx. Oproti publikované studii je nynější studie rozšířena o dalších deset lektinů.

Transformované larvy *D. pseudopathaceum* reagovaly s menším spektrem lektinů než cercárie. Na základě této redukce jsme stanovili markery transformace. Markery transformace jsou známe u druhu *S. mansoni*, kde dochází k redukci sacharidových epitopů (Wiest, Kossman a Tartakov, 1989). Dále u *T. szidat* (Horák a kol, 1997a) a *T. regenti* (Blažová a Horák, 2005). Markery transformace *D. pseudopathaceum* (RCA, SBA a ConA) jsme využívali při posuzování vlivu cathepsinu L na shazování glykokalyx.

Redukce sacharidových epitopů u druhu *D. pseudopathaceum* nápadně připomíná strategii schistosom po penetraci do hostitele. Tato redukce je velice důležitá pro únik imunitnímu systému hostitele (Stein a Lumsden, 1973).

Srovnáním larev transformovaných *in vitro* a *in vivo* jsme zjistili že transformace *in vitro* v mediu RPMI (Whyte a kol., 1988) je vhodná, i když zde nedochází k úplnému odvržení glykokalyxu. Rozdíly ve vazbě se vyskytly u lektinů specifických pro N-acetyl-D-galaktosamin (PNA, GSL, RCA a SBA). Zdá se, že u larev transformovaných *in vivo* dochází k redukci sacharidových epitopů více než u larev transformovaných *in vitro*. Markery

transformace druhu *D. pseudospathaceum* byly vybrány tak, aby spolehlivě zachytily larvy po transformaci *in vivo* ale i *in vitro*.

*In vivo* metody se zdají být spolehlivějšími, avšak metody *in vitro* poskytují větší množství larev a nevyžadují usmrcení obratlovce. Metoda *in vitro* je spolehlivou transformační metodou, je však nutné srovnání se systémem *in vivo* a navržení markerů tak, aby odhalily i tuto méně rozvinutou transformaci larev. Metoda *in vivo* s sebou nesla komplikace spojené s nákazou zakoupených ryb monogenei (*Gyrodactylus* a *Dactylogyrus*) a s tím souvisejícím zvýšeným úhynem ryb. Dalším problémem byla sezónní dostupnost potřebných ryb.

Při pokusech s FITC značenými lektinovými próbami jsme často narazili na problém se zablokováním kontrolních vzorků specifickým inhibítorem (u druhu *D. pseudospathaceum* se jednalo o lektiny GSL a JAC). Pro tento fakt existují alespoň tři možná vysvětlení. Lektin se vázal k larvám specificky, dokonce s větší afinitou než ke specifickému inhibítoru. Také se mohlo jednat o nespecifickou vazbu danou odlišnými náboji lektinu a tkání larvy. Je také možné že, dochází k vazbě lektinu pouze přes jeho vlastní glykosylaci a povrchový lektin larev (Horák a kol., 1997b). Také reakce lektinů o stejné vazebné specifitě s larvami nebyla vždy shodná. Tento fakt je nejspíše odrazem heterogenity oligosacharidových sekvencí na povrchu larev. Je známo, že lektiny se stejnou vazebnou specifitou k monosacharidům se rozdílně vážou ke tkáním či buňkám. Specifická vazba lektinů může být také ovlivněna pH, teplotou, typem tkáně atd. (Uchikawa a Loker, 1991).

Nálezy motolice druhu *S. inermis* v letech 2003-2005 byly spíše ojedinělé. V posledním roce se podařilo objevit lokalitu s poměrně vysokým procentem nakažených plžů. Jednalo se o rybník Velký Dubovec na Třeboňsku. Plži ale často hynuli záhy po převozu do laboratoře. Motolice je pro plže natolik patogenní, že kombinace s dalším stresem je často letální.

Povrch druhu *S. inermis* reagoval v porovnání s jinými druhy (cerkárie *S. inermis* reagovaly se čtyřmi ze 17 testovaných lektinů dvou skupin specifit, druh *T. regenti* reagoval s devíti z 22 lektinů a druh *D. pseudospathaceum* reagoval v deseti případech z 18 testovaných lektinů) s velmi malým množstvím lektinů. I přes omezené množství reagujících lektinů bylo možné pozorovat tendenci k redukci sacharidových epitopů u transformovaných larev, tak jak ji známe např. u druhu *S. mansoni* (Stein a Lumsden, 1973) či *D. pseudospathaceum* (viz 4.1.1). Jako markery transformace druhu *S. inermis* byly označeny lektiny WGA, LCA a ConA, díky kterým byla tato tendence prokázána.

*S. inermis* je velmi náročný druh na laboratorní držení, životní cyklus se podařilo vytvořit pouze ojedinele (Schell, 1974; Kirk a Lewis, 1992). Práce s parazitem samotným je také dosti komplikovaná, protože transformované larvy *S. inermis* mají tendenci adherovat k podkladu jakmile ucítí sebemenší proudění. Jedná se zřejmě o adaptaci parazita na život v krevním řečišti. Tento fakt nám téměř znemožňoval vybírání larev transformovaných *in vitro* z media.

Transformace cercárií *S. inermis in vivo* probíhala celkem bez obtíží. Bylo ale nutné vybírat larvy uvolněné z tkání ryby pomocí pipety pod mikroskopem. Larvy jsou velmi malé a mají také tendence adherovat, tato vlastnost zde ale není tak výrazná jako u larev transformovaných *in vitro*, což může být způsobeno kratší expozicí larev v systému.

U cercárií *S. inermis* s typickou ploutvičkou (tato ploutvička po transformaci mizí a může tedy sloužit jako pomocný znak pro posouzení transformace larev) je zajímavé, že se všemi lektiny reagovalo shodně tělo i ocásek larvy. U všech ostatních pozorovaných druhů se vyskytovaly lektiny, jejichž vazba měla různou intenzitu na ocásku a na těle cercárie. Nejvíce patrná byla tato tendence u druhu *D. pseudospathaceum* (viz 4.1.1.). Stejně tak nízký počet lektinů reagujících s cercáriemi *S. inermis* je ojedinelý viz výše. Zdá se tedy, že námi sledovaný druh *S. inermis* je po stránce povrchové glykosylace cercárií velmi odlišný od ostatních druhů sledovaných námi či popsáných v literatuře.

Pro oba výše uvedené druhy bylo možné využít lokální anestetikum procain za účelem snadnějšího fotografování. Optimální dávkou je 0,05% procain. Cercárie po ní do 10 minut znehybní a nedochází k praskání membrán. Při vyšších dávkách se cercárie velmi silně zmítají a po imobilizaci působí značně „vyčerpaně“. Fotografování s FITC značenými lektiny je však komplikované nutností udržovat pH kolem 7 za pomoci pufru. Posunem k nižšímu pH totiž dojde k výraznému zeslábnutí svícení fluoresceinu lektinů navázaných na povrchu tegumentu. Při použití procainu spolu s FITC značenými lektiny je tedy na místě opatrnost ohledně správného vyhodnocení výsledků.

Mikeš a Man (2003) uvažují o četných funkcích cathepsinu L přítomného v penetračních žlázách *D. pseudospathaceum*. Jednou z nich je i účast na penetraci cercárií do hostitele. Podílí-li se tedy tento enzym na penetraci do hostitele, je pravděpodobné, že zablokováním jeho proteasové aktivity pomocí širokospektrého inhibitoru cysteinových proteas E-64 dojde k inhibici penetrace cercárií do hostitele. Vliv cathepsinu L na penetraci cercárií do hostitele se nám na základě dvou pokusů nepodařilo potvrdit. Na průniku larev do hostitele se ale



jednoznačně podílí pohyby hlavového orgánu mechanicky narušující tkáň. Systém který jsme k pokusům použili však nebyl dříve vyzkoušen, byl vytvořen pouze pro naše účely.

Ve své studii předpokládají Mikeš a Horák (2001) také vliv cathepsinu L na svlékání glykokalyxu cercárií. Na základě našich výsledků třikrát opakovaných pokusů jsme však tuto funkci nepotvrdili.

Na základě našich výsledků se může zdát, že cathepsin L neplní předpokládané funkce (Mikeš a Horák, 2001), a tedy že se nepodílí ani na svlékání glykokalyxu cercárií, ani na jejich penetraci do hostitele. Další možností je, že cathepsin L izolovaný daným způsobem patřičně nefunguje v systému neodpovídajícím přirozeným podmínkám.

V systému byly vyzkoušena rozdílná tloušťka rybí kůže, rozdílné časy pro penetraci cercárií kůží a rozdílné koncentrace inhibitorů, ale žádná závislost na těchto faktorech nebyla prokázána. Podařilo se nám však dokázat, že u cercárií procházejících rybí kůží *ex vivo* dochází k redukci sacharidových epitopů.

Hledali jsme i alternativní metody, které by bylo možné použít pro průkaz funkce cathepsinu L. Ve W komůrkách požitých pro tyto účely neměly cercárie tendenci migrovat gelatinem s kyselinou linoleovou do fyziologického roztoku s glukosou. W komůrky s gelatinovou zátkou se pro naše účely také neosvědčily.

Vzhledem k těžko interpretovatelným výsledkům je nutné tyto pokusy ještě opakovat a vyzkoušet chování cercárií i v jiných systémech.

Larvy *Diplostomum pseudospathaceum* částečně využívají krevní řečiště hostitele během své migrace do oční čočky ryb, kde vyčkávají na pozření definitivním hostitelem v podobě metacercárií (Whyte a kol., 1988). Druhy s podobnou životní strategií (migrující krevním řečištěm hostitele) mají na svém povrchu po transformaci zdvojenou fosfolipidovou dvouvrstvu (Hockley a McLaren, 1977). Jedná se o čeleď Schistosomatidae (sledovány byly druhy *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. matthei*, *S. bovis*, *S. leiperi*, *S. margrebowiei* a *S. intercalatum*) – významné parazity teplokrevných obratlovců, čeleď Aporocotylidae (*Aporocotyle simplex* a *A. spinosicanalis*) – parazity ryb (tato čeleď je v současnosti považována za součást čeledi Sanguinicolidae (Smith, 2002)) a Spirorchiidae (*Spirorchis* sp.) – parazity želv. Dvojitá membrána je nejspíše významnou ochranou proti imunitní odpovědi hostitele. Ostatní druhy žijící v tělních dutinách a střevech mají na svém povrchu pouze jedinou fosfolipidovou dvouvrstvu (Hockley a McLaren, 1977). Jednoduchá membrána byla pozorována u druhů *Steringophorus furciger*, *Fasciola hepatica*, *Echinostoma caproni*, *Notocotylus tricerialis*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Corrigia vitta*, *Stephanostomum*

*pristis*, *Podocotyle atomon*, *Macrolecithus papilliger*, *Lepidopedon elongatum*, *Zoogonoides viviparus*, *Hemiurus communis* a *Derogenes varicus* (Hockley a McLaren, 1977).

Naše ultrastrukturální pozorování prokázalo u druhu *D. pseudospathaceum* přítomnost pouze jediné, nezdvojené povrchové membrány ve stádiu metacerkárie, což je v rozporu s výsledky získanými v Německu v průběhu diplomové práce Cynthie Wulff, 2002. Tato práce uvádí fotografie povrchových membrán cercárií, *in vivo* a *in vitro* transformovaných larev. Tyto fotografie ukazují nekompaktní povrchovou membránu, která je místy zcela zlyzovaná a možná místy díky své síle připomíná membránu zdvojenou. Sedm vrstev zdvojené povrchové membrány transformovaných larev *D. pseudospathaceum* však tyto fotografie jednoznačně neprokazují. Lze tak soudit i s přihlédnutím k ultrastrukturním pozorováním povrchových membrán prováděným v naší laboratoři na druhích *T. szidati* (Horák a kol., 1997b) a *T. regenti* (Blažová, osobní sdělení).

Vezikuly a granula, která se vyskytovala u jednotlivých stádií, jsou někdy dosti podobná těm, které popisuje Hockley a McLaren (1973) u druhu *Schistosoma mansoni* a Horák a kol., (1997b) u *T. szidati*. Tegument cercárií *D. pseudospathaceum* obsahoval tělíška o rozměrech 120 x 50 nm. U *S. mansoni* jsou pozorována tělíška shodného typu o rozměrech 120 x 120 nm. Kulovité membránové vezikuly, objevující se u larev po transformaci, jsou v případě *D. pseudospathaceum* o cca 50 nm větší než u *S. mansoni*. Druh *S. mansoni* má váčky lemovány sedmivrstevnou, zdvojenou membránou, která však nebyla u našeho druhu pozorována. U metacerkárie *D. pseudospathaceum* byla pozorována sekreční granula bez membrán, ale žádná podobná granula nebyla popsána ani u druhu *Schistosoma mansoni* ani u *T. szidati*.

Produkce membránových tělísek, podobného typu i velikosti, putujících k povrchu je identická u všech zmíněných druhů (*S. mansoni*, *T. szidati*, *D. pseudospathaceum*). Zdá se, že u všech dochází k velmi intenzivní obměně povrchových membrán krátce po transformaci.

Pozorované zvrásnění tegumentu zvětšuje povrch larev a umožňuje tak intenzivnější vstřebávání jednoduchých složek potravy, například glukosy a aminokyselin a vylepšuje i další důležité funkce tegumentu (Thompson, 1997). Tendence k prohlubování záhybů tegumentu byla pozorována shodně u druhů *Schistosoma mansoni* a *T. szidati*. U *D. pseudospathaceum* tato tendence dosáhla svého vrcholu ve stádiu metacerkárie.

K fixaci materiálu jsme použili několik metod. Srovnání čtyř metod fixace ukazují obrázky 32 až 35. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím 2,5% glutaraldehyd ve 400 mM Hepes pufru s přidavkem NaCl a taninu. O něco horších výsledků jsme dosáhli použitím 2,5% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru. Ostatní typy fixáže se zdají být nevyhovující pro pozorování povrchových membrán tohoto druhu. Zkrácení fixace na 1 až 2 hodiny také

prospívá kvalitě vzorku. Postfixace jednotně probíhající 1 hodinu v OsO<sub>4</sub> se osvědčila. Na velké problémy jsme narazili při řezání materiálu, které bylo zadáváno pracovišti ELMI při PaÚ AVČR v Českých Budějovicích. Ve fixovaném materiálu se často vyskytovala nejspíše vápenatá granula, která krájení na ultratenké řezy velmi komplikovala. Na takovýchto řezech se často nedala rozeznat povrchová membrána, ani vnitřní struktura larev. Pozorování povrchových membrán však bylo komplikované i u druhu *T. regenti* (Blažová, osobní sdělení). Citlivost membrán na složení fixáže, časy fixace a další zpracování je obrovská a zdá se, že pro každý druh bude vždy nutné nalézt vyhovující fixáž

U zástupce čeledi Sanguinicolidae (Smith, 2002), *S. spinosicanalis*, parazitujícího u platýse drsného (*Hippoglossoides platessoides*) je známá přítomnost zdvojené povrchové membrány (Hockley a McLaren, 1977). U *S. inermis* však zatím membrána nebyla sledována.

Při získávání larev *S. inermis* pro elektronovou mikroskopii jsme narazili na četné obtíže. Cerkárií byl sice dostatek, ale bylo těžké s nimi, pro jejich malé rozměry, manipulovat v zalévací pryskyřici. Při transformaci *in vitro* jsme nedokázali získat dostatek materiálu. Transformace *in vivo* se jeví být vhodnější, ale problémem stejně jako u transformace *in vitro* zůstává tendence larev přichytávat se k pipetám či k jakémukoliv povrchu. To značně komplikuje práci vzhledem k nutnosti vybírat jednotlivé transformované larvy pod mikroskopem právě pipetou. Díky zanedbatelné velikosti transformovaných larev nelze bezesbytku odstranit veškerou rybí tkáň ze vzorku a je tedy nutné se tímto „hledáním“ zabývat až pod ELMI.

Pro dosažení lepších výsledků jsme se pokoušeli získat dospělé jedince *S. inermis* z infikovaného kapra (Kirk a Lewis, 1996). Rybu jsme vypitvali, ale dospělé v *bulbus arteriosus* jsme nenašli. Vajíčka nalezená v žábrách jsme použili k nakažení dalších meziphostitelských plžů. Životní cyklus se nám ale nepodařilo dokončit. Plži nakažení miracidii *S. inermis* podlehlí infekci dříve než začali vylučovat cercárie. Z literatury je ale známo, že zavedení životního cyklu druhu *S. inermis* v laboratorních podmínkách není snadné (Schell, 1974; Kirk a Lewis, 1992).

## 5.2. Využití FITC značených lektinů k druhové determinaci morfologicky těžko rozlišitelných druhů motolic

Povrchová glykosylace cercárií druhů *T. regenti* a *T. szidati* byla popsána v řadě prací (Horák a Mikeš, 1995; Horák a kol., 1997b; Frýzková, 2004; Blažová a Horák, 2005) a srovnáním studií vyplynuly značné rozdíly v reakcích zmíněných druhů s identickými lektiny. Rozdíly mohou být způsobeny rozdílným zpracováním materiálu či použitím jiné šarže lektinů. Konkrétně se jednotlivé publikované výsledky lišily v šesti případech z 12 společně testovaných lektinů. Na základě jmenovaných studií jsme porovnali reakce cercárií obou druhů trichobilharzií v paralelních pokusech na živých cercáriích ve snaze jednoznačně definovat lektiny, pomocí kterých by bylo možné tyto dva morfologicky velmi podobné druhy rozlišit. Druhová diferenciaci se totiž zatím daří pouze na vějcích a dospělých červech.

Druhová diferenciaci dospělců trichobilharzií je možná podle lokalizace v hostiteli i podle morfologie jedinců. Vajíčka zmíněných druhů jsou také morfologicky odlišitelná. Miracidia *T. regenti* napadají plže *Radix peregra* a v případě *T. szidati* plže *Lymnea stagnalis*. Cercárie uvolňující se z nakažených plžů lze však velmi obtížně rozlišit. Nabízí se poměrně náročné rozlišení pomocí lokalizace senzorických papil či morfometrie (Podhorský, osobní sdělení). Další možností byla aplikace FITC značených lektinů a kvantifikace odlišností vyplývajících z výše uvedených publikací.

Z našich výsledků vyplývá značná odlišnost glykosylace jednotlivých druhů od publikovaných výsledků k čemuž mohlo dojít např. použitím odlišné šarže lektinů či horší odečitelností některých slabších reakcí tegumentu na řezech a způsobem zpracování materiálu na histologické řezy v případě Frýzkové (2004). Z našich paralelně prováděných pokusů jsou patrné pouze minimální rozdíly mezi oběma druhy, a navíc se většinou jedná pouze o rozdíly v intenzitě reakcí u lektinů UEA-I, ConA a PNA. Lektin PNA u *T. regenti* nereaguje a u *T. szidati* reaguje slabě, což vzhledem k výsledkům z jednoho opakování pokusu kdy cercárie druhu *T. regenti* reagovaly slabě, není dostatečně průkazný rozdíl.

Srovnáním s druhem *T. franki* jehož životní cyklus zahrnuje plže *Radix auricularia* a vodní ptáky, a který mimo jiné způsobuje cercáriovou dermatitidu (Müller a Kimmig, 1994) dojdeme v podstatě ke shodným závěrům jako u předešlých dvou druhů. I když rozdíly mezi lektiny ECL a SBA by zdánlivě k druhové determinaci *T. franki* stačily, u *T. szidati* a *T. regenti* se během třech opakování pokusů u lektinů ECL a SBA vyskytla v jednom případě slabá reakce. Reakce lektinů LCA a RCA jsou také nepoužitelné protože se nejedná o

dostatečně průkazný rozdíl, ale pouze o rozdílnou intenzitu reakce která by mohla být nesprávně interpretována na jiném mikroskopu nebo jiným subjektem.

Lektiny se v tomto případě nezdají býti vhodným nástrojem k rozlišení tří, morfologicky téměř identických druhů. Rozdílná situace je ale například u obrněnek (Rhodes a Haywood, 1995; Rhodes, 1998) či bakterií *Bacillus anthracis* (Cole a kol., 1984).

V našich pokusech se nepodařilo zablokovat lektin jacalin (JAC) specifickým inhibítorem kterým je N-acetyl-D-galaktosamin. Nejspíše se tedy jednalo a nespecifickou reakci tohoto lektinu.

V tabulce 10 uvádím srovnání našich pokusů s již publikovanými studiemi. Z výsledků vyplývá, že rod *Schistosoma* se vyznačuje jiným motivem glykosylace než rod *Trichobilharzia* (RCA, UEA-I, LTA). Glykosylace tegumentu motolic se na základě této studie omezené na tři druhy zdá být rodově unikátní.

Jiná situace byla zaznamenána u některých monogeneí, kde je povrchová glykosylace odlišná i druhově (Schabuss, 2003; Frýzková, 2004).

Zástupci rodu *Echinostoma* nám sloužili pro porovnání k problematice druhové diferenciaci trichobilharzií pomocí FITC lektinů. *E. spiniferum* a *E. revolutum* jsou motolice často nalézané ve vodních nádržích jižních Čech. Celkové druhové zastoupení uvádí Faltýnková (2005). *E. spiniferum* využívá plže *Planorbarius corneus* jako mezihostitele. Mezihostitelem *E. revolutum* je *Lymnea stagnalis*. Oba tyto druhy motolic se vyznačují nápadným límcem trnů, v obou případech v počtu 37. Cerkárie mají téměř shodnou délku cca 780-800 µm. Odlišný je tvar paraesofageálních žláz barvitelných neutrální červení. Více se těmto motolicím věnuje Našincová (1992) a uvádí i synonyma používaná pro *E. spiniferum* (*Echinostoma echinatum*, *E. lindoense*).

FITC značené lektiny se zde nabízely jako jednoduché nástroje pro spolehlivé rozlišení těchto dvou druhů ve stádiu cercárií. Nedostatek plžů nakažených *E. revolutum*, podle údajů velmi běžného druhu (Faltýnková, 2005), práci značně komplikoval. Abychom získali kontrolu správnosti našich pokusů s druhem *E. revolutum*, využili jsme pro porovnání starší studii (Horák a Mikeš, 1995). Vyskytly se pouze dva drobné rozdíly mezi studiemi, a to v intenzitě reakce u lektinů HPA a ConA. Recentně použitá škála lektinů však byla výrazně širší a proto ne všechny výsledky máme potvrzené. Z porovnání *E. revolutum* a *E. spiniferum* po stránce glykosylace tegumentu vyplývají jisté rozdíly. Asi nejvýznamnější se zdají být u lektinů SJA a HPA, méně výrazné u PNA, JAC a RCA. Lektin SJA nemůžeme zatím doporučit, protože ve studii Horáka a Mikeše (1995) není tento lektin testován a nám

díky jedinému opakování pokusu chybí kontrola správnosti získaného výsledku. Zbývá tedy pouze lektin HPA, který u *E. revolutum* reaguje a u *E. spiniferum* nereaguje. Nicméně jediný lektin ke spolehlivé druhové determinaci nejspíše nestačí.

Aby však bylo možné jednoznačně zhodnotit použitelnost FITC značených lektinů k tomuto účelu, bude nutné tyto studie rozšířit o větší počet druhů a čeledí.

### **5.3. Změny protilátkové odpovědi specifického definitivního hostitele v průběhu infekce *T. regenti* a *T. szidati***

Vzhledem k potenciálně silným imunogenním vlastnostem glykokalyxu cercárií byly také sledovány změny v protilátkové odpovědi hostitele v průběhu infekce *T. regenti* a *T. szidati*.

Z výsledků získaných na blotu je možné usuzovat, že krevní séra jednotlivých kachen („A“, „B“, „C“ a „D“) většinou vykazují podobnou tendenci reagovat v průběhu infekce postupně s několika antigeny. Imunitní odpověď jednotlivých kachen se ale přes tuto společnou tendenci značně liší. Rozdíly vynikají nejspíše v závislosti na individuálním stavu imunitního systému infikovaných kachen. Další možnou příčinou této rozmanitosti může být „zviditelnění“ některých antigenů například úhynem parazita v hostiteli. Příčinou poměrně nízkého počtu nalezených antigenů může být slabá infekce kachen či migrace parazita (imunoprotektivním) nervovým systémem hostitele. K vytvoření obecně platného schématu tvorby protilátek při infekci *T. regenti* bude nutné provést další pokusy s větším počtem kachen a zaměřit se na nalezení typického vývoje imunitní odpovědi hostitele.

Stejná situace nastala u imunohistochemických pokusů. Patrné jsou společné tendence k reakci kachních sér se strukturou podobnou svalovině cercárií první dva týdny po infekci – což je nejspíše způsobeno úhynem cercárií těsně po penetraci do hostitele a kontaktem hostitele s antigeny svaloviny, které parazit na svém povrchu za živa nevystavuje. Tato reakce byla pozorována u všech krevních sér pořízených 6 – 14 dpi kromě séra A7. Důvodem k odlišné reakci tohoto séra s tegumentem mohla být, kromě atypického vývoje imunitní odpovědi kachny, také migrace parazita probíhající odlišně od zbývajících kachen (B,C,D) a rozpad parazitů v hostiteli. Po třetím týdnu od infekce krevní séra, až na jedinou výjimku (D20), reagují s antigeny tegumentu motolic *T. regenti*, který je vzhledem k vysokému obsahu sacharidů a dle údajů z literatury značně imunogenní (Marikovský a kol., 1988). Přes intenzivní obměnu tegumentálních struktur během prvních hodin po proniknutí do hostitele se možná stabilní protilátky proti povrchovým strukturám u primoinfekcí objevují až po třech týdnech od infekce.

Závislost reakcí tegumentu cercárií na řezu a reakcí s jednotlivými antigeny na blotu se zatím nedaří nalézt. Nabízí se proužek v oblast 38 kDa který se vyskytuje na blotu u většiny krevních sér, která reagovala na řezu s tegumentem (kromě séra A7). Ale naopak, krevní séra reagující v této oblasti na blotu nereagují všechna s tegumentem na řezech. Proužky odpovídající reakci svalstva na řezech nelze vůbec určit. Společným jmenovatelem obou výsledků lze nazvat převládající tendenci k zesílení protilátkové odpovědi během infekce hostitele a tendenci k reakcím s různými antigeny v průběhu infekce (alespoň) do 21 dne po infekci.

Na řezech reagovala silně séra reinfikovaných kachen s tegumentem cercárií. Jediným rozdílem mezi jednotlivými séry byla síla této reakce, RE1 a RE3 reagovala slaběji a RE2 a RE4 reagovala silněji. Zvláštní je zde korelace s reakcemi těchto sér na blotu. RE2 a RE4 se vážou v oblasti kolem 200 a 38 kDa – stejně jako RE1 a RE3 – ale mimo to i v oblasti 42 kDa. RE2 sérum, které se jevílo jako obecně nejsilnější, reagovalo i v oblast 50 kDa. Zdá se, že by množství bandů v oblasti 50 až 38 kDa mohlo být přímo úměrné intenzitě reakcí v oblasti tegumentu cercárií na řezech cercárií. Séra reagující nejsilněji s tegumentem cercárií tedy reagují na blotu se všemi antigeny ve zmíněné oblasti (38, 42, 50 kDa). Séra kachen infikovaných *T. szidati* reagovala zkříženě s povrchem cercárií *T. regenti*. Vzhledem k výrazné podobnosti povrchové glykosylace těchto druhů není tento výsledek nijak překvapující.

Imunogennost proteas penetračních žlaz o molekulové hmotnosti kolem 30 kDa by z hlediska parazita a reinfekce hostitele byla nevýhodná. Glykokalyx je však struktura která se na průniku do hostitele nijak nepodílí a krátce po penetraci je shazována. Je tedy pravděpodobné, že antigeny pochází spíše z povrchu cercárií. Antigeny o molekulové hmotnosti kolem 200 kDa by mohly být vysoce glykosylovanými komponentami glykokalyxu, což však nepotvrdil ligand blot. Je ale možné že jsou tyto antigeny glykosylavány sacharidem, který naše paleta lektinů nerozeznala.

Ligandový blot měl prokázat, zda některé antigeny reagující se séry na blotu jsou glykosylované, tedy nejspíše přítomné v odhazovaném glykokalyxu. Lektiny pro pokus jsme vybírali na základě znalostí glykosylace tegumentu živých cercárií, jejichž reakce byla ohodnocena ++ (kapitola 4.2.; Frýzková, 2004; Blažová a Horák, 2005). Nicméně žádná glykosylace antigenů vytipovaných pomocí western blotu nebyla detekována. V prvním pokuse na NC membráně byly přítomné pouze některé nespecifické reakce. Použitím PVDF membrány a směsi inhibitorů se podařilo velice dobře eliminovat nespecifickou vazbu lektinů k proteinům. Z tohoto pokusu bylo patrné, že vybrané lektiny se neváží na žádnou oblast

blotu specificky. Pro nedostatek materiálu nebylo možné pokus zopakovat se širší paletou lektinů nebo zopakovat za jiných podmínek.

*T. szidati* je druh odlišný od *T. regenti* svou migrací „neimunoprotektivní“ tkání hostitele a odlišnou lokalizací dospělců. Elektroforetogram *T. szidati* byl pořízen pouze z peletu cercárií po homogenizaci a centrifugaci (viz obrázek 63), nejde tedy o kompletní homogenát jako v případě *T. regenti*. Pelet cercárií, v němž je mnoho buněčných membrán, vytváří na gelu výrazné barvitelné plochy, které jej, oproti gelu s kompletním proteinem *T. regenti*, znepřehledňují. Srovnání celkových proteinů z cercárií obou druhů motolic po elektroforéze nebylo možné kvůli nedostatku materiálu *T. szidati*. Pelet cercárií zde byl použit také vzhledem k předpokládaným imunogenním vlastnostem tegumentu, jehož převládající nerozpustné části se po zpracování cercárií nalézají právě v peletu. Výhradním použitím peletu z cercárií jsme ale přišli o rozpustné proteiny vyskytující se po zpracování v supernatantu.

Četné reakce sér *T. szidati* (proužky 6 – 11 obrázku 63) v oblasti 22 kDa nelze vzhledem k reakci s kontrolním sérem spolehlivě považovat za specifické. V případě reakcí v oblasti pod 20 kDa se jedná se o antigen se kterým specificky reaguje imunitní systém hostitele po celou sledovanou dobu infekce *T. szidati* (15, 22, 24, 28, 30 a 31 dpi).

Reakce vyskytující se u proužků 6, 7 a 10 obrázku 63 v oblastech blotu s vyšší molekulovou hmotností (po řadě 61, 42 a 58) si vysvětlují jako specifické reakce antigenů charakteristických pro dané období infekce. Jedná se tedy o několik povrchových antigenů exprimovaných v daném období. Fakt, že intervaly mezi pořízením sér jsou relativně krátké (15, 22 a 30 dpi) a že séra nebyla pořizována ze stejné kachny jako v případě *T. regenti*, nabízí i vysvětlení, že se může jednat pouze o individuální odchylky v imunitní reakci jednotlivých kachen. Séra kachen nakažených *T. szidati* byla získávána pouze po dokončení životního cyklu motolic v kachně nebo dříve v případě, kdy byla kachna používána pro účely jiných experimentů.

Reakce sér kachen nakažených *T. regenti* na blotu s peletem cercárií *T. szidati* jsou v případě reakce v oblasti 22 kDa vzhledem k reakci s kontrolním sérem nejspíše nespecifické. Proužky 4 a 5 obrázku 63 však v této oblasti nereagují a proto není tato nespecifická reakce jednoznačná. V oblasti 42 kDa reagují proužky 2 a 3. Zde se jedná o specifickou zkříženou reakci.



Bylo by vhodné doplnit tuto studii ještě o imunohistochemické pokusy jako v případě *T. regenti*. Vzhledem k vyhnutí laboratorního chovu *T. szidati* v průběhu experimentů to však v našem případě nebylo možné.

## 6. ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřila na sledování povrchových změn během transformace cercárií. Sledovány byly rozdíly v glykosylaci a v ultrastruktuře povrchových membrán tegumentu druhů *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis*. Povrchová glykosylace byla sledována také u druhů *Trichobilharzia szidati*, *T. regenti*, *T. franki*, *Echinostoma revolutum* a *E. spiniferum* za účelem druhové diferenciaci. V kontextu s potenciálně silnými imunogenními vlastnostmi povrchových struktur byly sledovány změny v protilátkové odpovědi hostitele v průběhu infekce *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*.

- U druhů *Diplostomum pseudospathaceum* a *Sanguinicola inermis* byly stanoveny lektinové markery změny glykosylace.

Markery transformace druhu *Diplostomum pseudospathaceum* (RCA, ConA) byly následně využity v pokusech zaměřených na zhodnocení vlivu cathepsinu L při penetraci cercárií do hostitele na svlékání glykokalyxu cercárií. Zapojení cathepsinu L do těchto procesů ale nebylo prokázáno.

Pro snadnější fotografování jinak značně pohyblivých larev motolic bylo úspěšně zavedeno používání lokálního anestetika procain v pufovaném prostředí.

- Ultrastrukturální pozorování transformovaných larev postcercariálních stádií (diplostomuly čili metacercarie) *Diplostomum pseudospathaceum* prokázalo přítomnost jednoduché povrchové membrány. Ultrastrukturální pozorování povrchové membrány transformovaných larev *Sanguinicola inermis* nebylo úspěšné.
- Paralelní popis povrchové glykosylace cercárií druhů *Trichobilharzia szidati*, *T. regenti*, *T. franki* ukázal na nápadnou podobnost těchto druhů a na jejich odlišnost od druhu *S. mansoni*. Využití FITC značených lektinů pro druhovou determinaci není v tomto případě možné.

Z paralelního popisu povrchové glykosylace cercárií druhů *Echinostoma revolutum* a *E. spiniferum* vyplývají jisté mezidruhové odlišnosti, které by po rozšíření pokusu mohly k druhové diferenciaci sloužit.

- Reakce jednotlivých sér pokusných kachen nakažených *T. regenti* se dosti liší, zřejmě v závislosti na imunitním systému hostitelů a vývoji parazita.

Na konci infekce, po cca 20 dnech, se objevuje reakce s tegumentem cercárií na řezech. Je možné, že této reakci odpovídá proteinu v oblasti 38 kDa na blotu. Velikost antigenu zodpovědného za reakci svaloviny na řezech nelze stanovit.

Z omezeného množství pokusů nevyplývá glykosylace žádného z nalezených antigenů.

Na blotu z peletu *T. szidati* jsou patrné specifické reakce se séry infikovaných kachen. Jedná se jak o reakce vyskytující se v průběhu celé infekce, tak o reakce charakteristické pro určité období po infekci.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Abath F. G. C. and Werkhauser R. C. (1996). The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology* 18, 15 – 20.
- Andrew J. G., Simpson R. C. O., 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.
- Arason G. J. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology* 6, 277 – 289.
- Barondes S. H. (1988). Bifunctional properties of lectins; lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences* 13, 480 – 482.
- Basch P. F. (1991). Relations with vertebrate hosts. In: *Schistosomes, development, reproduction and host relation* (Basch P. F.), pp. 34 – 83. Oxford university press. New York Oxford.
- Blažová K. and Horák P. (2005). *Trichobilharzia regenti*: The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* 54, 167 – 172.
- Bruce J. I., Pezzlo F., McCarty, J. E. and Yalima Y. (1970). Migration of *Schistosoma mansoni* through mouse tissue. Ultrastructure of host tissue and integument of migrating larva following cercarial penetration. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19, 959 – 981.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M. and Pierce R. J. (1992). Vaccine strategies against Schistosomiasis. *Immunology* 184, 282 – 294.
- Coelho-Castelo A. A. M., Panunto-Castelo A., Moreno A. N., Dias-Baruffi M., Jamur M. C., Oliver C., Roque-Barreira M. C. and Rodrigues V. (2002). Sm60 a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. *International Journal for Parasitology* 32, 1747 – 1752.

- Cole H. B., Ezzell J. V., Keller K. F. and Doyle R. J. (1984). Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *Journal of Clinical Microbiology* 19, 48 – 53.
- Coles G. C., Jansson H. B. and Zuckerman B. M. (1987). Lectin studies of surface carbohydrates and induction of gland secretion in the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Chemical Ecology* 14, 153 – 158.
- Cousin C. E., Stirewalt M. A. and Dorsey C. H. (1981). *Schistosoma mansoni* ultrastructure of early transformation of skin- and shear- pressure desiccated schistosomules. *Experimental Parasitology* 51, 341 – 365.
- Cummings R. D. and Smith D. F. (1992). The selectin family of carbohydrate binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssays* 14, 849 – 856.
- Čuperlović M., Movsesijan M., Janković M. and Hajduković L. (1988). Lectin in the intestine of *Ascaris lumbricoides suum* nematode. *Clinical Biochemistry* 6, 197 – 201.
- Daniel B. E., Preston T. M. and Southgate V. R. (1991). The in vitro transformation of the miracidium to the mother sporocyst of *Schistosoma margrebowiei*, changes in the parasite surface and implications for interactions with snail plasma factor. *Parasitology* 104, 41 – 49.
- Daub J., Loukas A., Pritchard D. I. and Blaxter M. (2000). A survey of genes expressed in adult of the human hookworm, *Necator americanus*. *Parasitology* 120, 171 – 184.
- Danguy, A. and Gabius H. J. (1993). Lectins and neoglycoproteins-attractive molecules to study glycoconjugates and accessible sugar-binding sites of lower vertebrates histochemically. In: *Lectins and Glycobiology* (Gabius H. J. and Gabius S.), pp. 241 – 250. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Davids B. J. and Yoshino T. P. (1995). Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 39 – 53.

- Dorsey Ch. H., Cousin C. E., Lewis F. A. and Stirewalt M. A. (2001). Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33, 279 – 323.
- Drickamer K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 9557 – 9560.
- Drickamer K. (1994). Molecular structure of animal lectins. In: *Molecular Biology* (Fukunda M. and Hindsgaul O.), pp 53 – 87, IRL Press.
- Drickamer K. (1995). Increasing diversity of animal lectin structures. *Current Opinion in Structural Biology* 5, 612 – 616.
- Drickamer K. and Taylor M. E. (1993). Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell Biology* 9, 237 – 264.
- Dvořák J., Delcroix M. and Rossi A. (2005). Multiple cathepsin B isoforms in schistosomes of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology* 35, 895 – 910.
- Faltýnková A. (2005). Larval trematodes (Digenea) in molluscs from small water bodies near České Budějovice, Czech Republic. *Acta Parasitologica* 50, 49 – 55.
- Frýzková M. (2004). Ontogenetický vývoj a interakce parazit-hostitel u modelových zástupců plathelminthů. Diplomová práce. Katedra parazitologie. PřF UK v Praze.
- Gerhardus M. J. T., Baggen J. M. C., van der Knaap W. P. W and Sminia T. (1990). Analysis of surface carbohydrates of *Trichobilharzia ocellata* miracidia and sporocysts using lectin binding techniques. *Parasitology* 103, 51 – 59.
- Göbel E. and Pan J. P. (1985). Ultrastructure of daughter sporocyst and developing cercariae of *Schistosoma japonicum* in experimentally infected snails, *Oncomelania hupensis hupensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 71, 227 – 240.
- Guth B. D., Blankespoor H. D., Remink P. L. and Jackson W. C. (1979). Prevalence of dermatitis-producing schistosomes in natural bird populations of lower Michigan. *Proceedings of the Helminthological Society Washington* 49, 58 – 63.

- Hockley D. J. (1970). The development of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 54, 150 – 151.
- Hockley D. J. (1972). *Schistosoma mansoni*: The development of the cercarial tegument. *Parasitology* 64, 245 – 252.
- Hockley D. J. and McLaren D. (1971). The outer membrane of *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 432 – 439.
- Hockley D. J. and McLaren D. J. (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal for Parasitology* 3, 13 – 25.
- Hockley D. J. and McLaren D. J. (1977). Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* 269, 147 – 149.
- Hokke C. H. and Deelder A. M. (2001). Review. Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconjugate Journal* 18, 573 – 387.
- 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. (1996). Lectins of parasitic helminths: A review. *Helmintologia* 33, 209 – 212.
- Horák P. and van der Knaap W. P. W. (1997). Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica* 44, 161 – 172.
- Horák P. and Mikeš L. (1995). Cercarial surface saccharides of six trematode species from pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Parasite* 2, 419 – 421.
- Horák P., Grubhoffer L., Mikeš L. and Tichá M. (1997a). Lectins of *Trichobilharzia szidati*. *Parasite* 1, 27 – 35.

- Horák P., Kovář L., Kolářová L. and Nebesářová J. (1997b). Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116, 139 – 147.
- Hořejší V. and Bartůňková J. (1998). *Základy imunologie*. Triton.
- Hrádková K. and Horák P. (2002). Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in duck and mice. *Journal of Helminthology* 76, 137 – 141.
- Chamot E., Toscani L. and Rougemont A. (1998). Public health, importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in the Lake Lemon at Geneva, Switzerland. *Epidemiology and Infection* 120, 305 – 314.
- Cho E. S., Choi B. D., Cho Y. C., Kim T. J. and Kim H. G. (2001). Discrimination of three highly toxic *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolates using FITC-conjugated lectin probes. *Journal of Plankton Research* 23, 89 – 96.
- Jacobson R. L. and Doyle R. J. (1996). Lectin-parasite interaction. *Parasitology Today* 12, 55 – 60.
- James E. R. and Taylor M. G. (1976). Transformation of cercariae to schistosomula: A quantitative comparison of transformation techniques and of infectivity by different injection routes of the organism produced. *Journal of Helminthology* 50, 223 – 233.
- Karvonen A., Paukku S., Valtonen E. T. and Hudson P. J. (2002). Transmission, infectivity and survival of *Diplostomum spathaceum* cercariae. *Parasitology* 127, 217 – 224.
- Kemp W. M. (1970). Ultrastructure of the cercariae-huller reaction of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 56, 713 – 723.
- Kirk R. S. and Lewis J. W. (1992). The laboratory maintenance of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). *Parasitology* 104, 121 – 127.
- Kirk R. S. and Lewis J. W. (1996). Migration and development of the blood fluke *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Trematoda: Sanguinicolidae) in carp *Cyprinus carpio*. *Parasitology* 113, 279 – 285.



- Klesius P. H. (1993) Regulation of immunity to *Ostertagia ostertegi*. *Veterinary Parasitology* 46, 63 – 79.
- Kolářová L., Sýkora J. and Bah B. A. (1994). Serodiagnosis of cercarial dermatitis with antigens of *Trichobilharzia szidati* and *Schistosoma mansoni*. *Central European Journal of Public Health* 2, 19 – 22.
- Kouřilová P., Hogg K. G., Kolářová L. and Maunford A. P. (2004). Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *The Journal of Immunology* 172, 3766 – 3744.
- Linder E. (1984). *Schistosoma mansoni*: Visualization with fluorescent lectins of secretions and surface carbohydrates of living cercariae. *Experimental Parasitology* 59, 307 – 331.
- Loris R. (2002). Principles of structure of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 198 – 208.
- Loukas A. and Maizels R. M. (2000). Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitology Today* 16, 333 – 339.
- Loukas A., Mullin N. P., Tetteh K. A., Moens L. and Maizels R. M. (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology* 9, 825 – 828.
- Marikovsky M., Fishelson Z. and Arnon R. (1988). Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30, 45 – 45.
- Mikeš L. and Horák P. (2001). A protein with lectin activity in penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum* cercariae. *International Journal for Parasitology* 31, 245 – 252.
- Mikeš L. and Man P. (2003). Purification and characterization of saccharide-binding protein from penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology* 122, 69 – 77.

- Morris G. (1971). The fine structure of the tegument and associated structures of the cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 68, 15 – 31.
- Murray R. K. (1993). Glycoproteins, In: *Harper's Biochemistry* (Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. and Rodwell V. W.) pp 654 – 668. Apleton&Lange, Conecticut.
- Müller V. and Kimmig P. (1994). *Trichobilharzia franki* n. sp. – die Ursache für Badedermatitiden in südwestdeutschen Baggerseen. *Applied Parasitology* 35, 12 – 31.
- Nanduri J., Dennis J. E., Rosenberry T. L., Mahmoud A. A. F. and Tartakoff A. M. (1991). Glykokalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae. *The Journal of Biological Cemistry* 266, 1341 – 1347.
- Našincová V. (1992). Vývojová stádia motolic v našich vodních plžích a vývojové cykly vybraných druhů čeledi Omphalometridae a Echinostomatidae. Disertační práce. PaÚ AVČR v Českých Budějovicích.
- Ni Y. and Tizard I. (1996). Lectin-carbohydrate interaction in the immune systém. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 55, 205 – 223.
- Pearce E. J., James S. L., Hieny S., Lanar D. E. and Sher A. (1988). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm 97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 5678 – 5681.
- Pyšová I. (2002). Studium proteinů penetračních žláz cercárií *Trichobilharzia regenti*. Diplomová práce. Katedra parazitologie PřF UK v Praze.
- Rhodes L. L. (1998). Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzchia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zealand Journal of Marine and Fresh Water Research* 32, 537 – 544.
- Rhodes L. L. and Haywood A. J. (1995). FITC-conjugated lectins as tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates. *New Zealand Journal of Marine and Fresh water Research* 29, 359 – 365.

- Rini J. M. (1995). Lectin structure. *Annual Review of Biomolecular Structure* 24, 551 – 577.
- Ribeiro S., Soares A., Alviano M., da Silva C. S., de Sousa E. F. and Angluster J. (1997). Cell-surface carbohydrates of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research* 83, 801 – 805.
- Rudolfová J., Hampl V., Bayssade-Dufour C., Locker A. E., Littlewood D. T. J. and Horák P. (2005). Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research* 95, 79 – 89.
- Sharon N. and Lis H. (1989). Lectins. Pp 114. Chapman and Hall, London New York.
- Schell S. C. (1974). The life history of *Sanguinicola idahoensis* sp. n. (Trematoda: Sanguinicolidae), a blood parasite of steelhead trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Parasitology* 60, 561 – 566.
- Schabus I. (2003). Use of lectins in characterizing species- and stage-specific differences in saccharide patterns of diplozoon parasites (Monogenea: Diplozoidae). *Disertační práce. PřF MU v Brně*.
- Schabussová I., Schabuss M., Gelnar M. and Horák P. (2003). Use of lectins in characterizing developmentally regulated changes on the surface of *Paradiplozoon Megan* (Monogenea: Diplozoidae). *Helmintologia* 40, 135 – 140.
- Schabussová I., Koubková B., Gelnar M., Schabuss M. and Horák P. (2004). Surface carbohydrates of *Eudiplozoon nipponicum* pre- and post-fusion. *Journal of Helminthology* 78, 63 – 68.
- Smith J. W. (2002). Family Sanguinicolidae von Graff, In: *Keys to the trematoda vol. I* (Gibson D. I., Jones A. and Bray R. A.) pp 433 – 453, CABI published, Oxon UK
- Smith J. H., Reynolds E. S. and Lichtenberg F. (1969). The integument of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, 28 – 49.

- Stein P. C. and Lumsden R. D. (1973). *Schistosoma mansoni*: Topochemical features of cercariae, schistosomules and young adults. *Experimental Parasitology* 33, 499 – 514.
- Taylor M. G. (1994). Schistosomiasis vaccines: Farewell to the God of plague? *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 257 – 268.
- Thompson S. N. (1997). Physiology and biochemistry of snail-larval trematode relationship. In: *Advances in Trematode Biology*, (Fried B. and Graczyk T. K.) pp 149 – 197, CRC Press, New York.
- Trottein F., Nutten S., Papin J. P., Leportier C., Poulain-Godefroy O., Kapron A. and Kapron M. (1997). Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to schistosome targets. *The Journal of Immunology* 159, 804 – 811.
- Uchikawa R. and Loker E. S. (1991). Lectin-binding properties of the surface of in vitro-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. *The Journal of Parasitology* 77, 68 – 73.
- van der Knaap W. P. W. and Loker E. S. (1990). Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today* 6, 175 – 182.
- Vasta G. R. (1991). The multiple biological roles of invertebrate lectins: their participation in nonself recognition mechanism. In: *Phylogenesis of immune functions*. (Warr G. W. and Cohen N.) pp 74 – 101, CRC Press Boca Raton.
- Whyte S. K., Chappell L. H. and Secombes C. J. (1988). *In vitro* transformation of *Diplostomum spathaceum* (Digenea) cercariae and short term maintenance of post-penetration larvae *in vitro*. *Journal of Helminthology* 62, 293 – 302.
- Wiest P. M., Kossmann R. J. and Tartakoff A. M. (1989). Determinants of surface membrane maturation during the cercarial-schistosomula transformation of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41, 70 – 77.

- Wiley D. C. and Skehel J. J. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry* 56, 365 – 394.
- Wuhler M., Koeleman C. A. M., Deelder A. M. and Hokke C. H. (2005). Repeats of LacdiNAc and fucosylated LacdiNAc on N-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *The FEBS Journal* 273, 347 – 361.
- Wulff C. (2002). Orientierung der Cercarien von *Diplostomum spathaceum* in Fishwirt. Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät II. Universität Erlangen-Nürnberg.
- Yoshino T. P. and Laursen J. R. (1995). Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells. *The Journal of Parasitology* 81, 714 – 722.
- Zelck U. (1993). Lectine und Kohlenhydrate im Wirt-Parasit-System *Biomphalaria glabrata*, Say (Gastropoda) – *Schistosoma mansoni*, Sambon (Trematoda). Disertační práce. Universita Hamburg.
- Zelck U. and Becker W. (1992). *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. *Experimental Parasitology* 75, 126 – 136.

## 8. PŘÍLOHA – ABSTRAKTY Z KONFERENCÍ

### 8.1. Změny ultrastruktury a glykosylace tegumentu cercárií

#### motolic během penetrace

Sborník abstraktů z českých a slovenských parazitologických dnů konaných 17 – 21. května 2004 v Ostravici, strana 26.

Z. Hůzová, M. Frýzková a L. Mikeš

Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 7, 12844, Praha 2

Tegument penetrujících cercárií prodělává během transformace přeměnu jak ultrastrukturální (např. změny povrchové membrány), tak změny ve složení sacharidového obalu (glykokalyxu). Ultrastrukturální změny jsou již podrobně prostudovány na druhu *Schistosoma mansoni*. Tento druh, stejně jako některé jiné druhy využívající krevní řečiště hostitele, má ve stádiu cercárií třívrstevnou vnější membránu, která se přetváří v sedmivrstevnou membránu schistosomul záhy po penetraci do hostitele. Změny v glykosylaci však nelze takto snadno shrnout.

Charakterizace glykokalyxu cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* pomocí fluorescenčně značených lektinů prokázala pravděpodobnou přítomnost hlavně N-acetyl-D-galaktosaminu, D-galaktosy a laktosy, dále pak D-mannosy/D-glukosy a D-glukosaminu. U cercárií po transformaci zeslábly reakce lektinů specifických pro laktosu a N-acetyl-D-galaktosamin, úplně zmizela reakce lektinů specifických pro D-mannosu/D-glukosu.

Z porovnání glykosylace cercárií *Diplostomum pseudospathaceum* s druhy *Echinostoma revolutum*, *Paryphostomum* sp., *Hypoderaeum conoideum*, *Echinoparyphium aconiatum*, *Trichobilharzia szidati* a *Schistosoma mansoni* vyplývá shoda u reakce jediného lektinu (specifita pro N-acetyl-D-galaktosamin) z deseti použitých. Jde tu o markantní rozdílnost v glykosylaci jednotlivých druhů rozdílných čeledí. Porovnáním dvou vzdálenějších druhů čeledi Schistosomatidae (*Trichobilharzia szidati* a *Schistosoma mansoni*) nalezneme vzájemně podobné reakce lektinů se specifitou pro N-acetyl-D-galaktosamin a oligomerní N-acetyl-D-glukosamin. V ostatních sacharidech se tyto dva druhy úplně rozcházejí. Zajímavé výsledky přineslo srovnání příbuzných druhů *Trichobilharzia szidati* a *T. regenti*, jejichž cercárie nejsou morfologicky spolehlivě rozlišitelné.

Prokázali jsme, že u zkoumaného druhu mohou změny glykosylace povrchu sloužit jako marker transformace cercárií, což podporuje výsledky získané dopsud i na jiných druzích. Další experimenty mají ukázat, zda by bylo možné rozeznání morfologicky těžko rozlišitelných druhů v rámci jednoho rodu (např. *Trichobilharzia*, *Diplostomum*) pomocí znalosti případných rozdílností glykosylace cercárií.

**Proceedings of the Thirteenth Helminthological Days held at Ředkovec (Czech Republic)  
May 9 – 13, 2005**

## **8.2. Labelled lectins as a tool for differentiation of bird schistosome cercariae and for detection of changes in glycosylation during penetration of cercariae into their hosts.**

Hůzová Z. and Mikeš L.

Department of Parasitology, Charles University, Viničná 7, 12844, Prague 2, Czech Republic

The glycocalyx (sacharide coat) of cercariae is a structure that provides osmotic protection and physiological adaptation to changing environment during trematode life cycles. For cercariae in the water, this structure is absolutely essential, but after penetration into a host it could be a source of possible activation of host immune system. In order to avoid this activation, cercariae shed their saccharide coat after penetration.

Glycosylation of living cercariae was described for two species of the family Schistosomatidae: *Schistosoma mansoni* (Linder 1984) and *Trichobilharzia szidati* (Horák and Mikeš 1995; Horák et al. 1997). On cross-sections it was characterized also for cercariae of *Trichobilharzia regenti* (Frýzková 2004). Comparison of these four studies has shown significant differences in the glycosylation of these species. It was supposed that the type of glycosylation could be used for determination of cercariae of morphologically undistinguishable schistosome species.

During a control experiment employing a set of fluorescein-labelled lectins and two bird schistosomes (*Trichobilharzia szidati* and *Trichobilharzia regenti*) parallelly, no clear differences were observed between these cercariae. The results of this experiment led to a conclusion that the glycosylation of cercarial tegument might not be a reliable discriminative character for determination of related schistosome species.

However, changes in glycosylation of cercariae and following post-penetration stages seem to be a good marker of transformation not only for schistosomes but also for other host-penetrating species. For example, binding of lectins specific for N-acetyl-D-galactosamine, D-galactose lactose, D-mannose/D-glucose and D-glucosamine has been detected to cercariae of the fish eye fluke, *Diplostomum pseudospathaceum*. After penetration into the host, the reactions of lectins specific for lactose and N-acetyl-D-galactosamine appeared weaker, while the reactions of lectins specific for D-mannose/D-glucose have even not been detected. A similar tendency to reduce external glycosylation of cercariae after penetration has also been observed in cercariae of the fish blood fluke, *Sanguinicola inermis*.