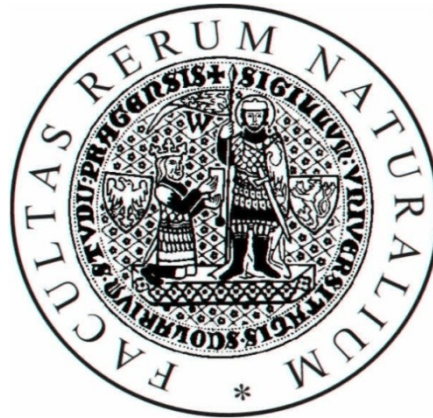


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Chemoorientace schistosomul *Trichobilharzia regenti*
in vitro

Chemoorientation of *Trichobilharzia regenti* schistosomula *in vitro*

Diplomová práce

Lucie Parolová

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

Konzultant: RNDr. Kateřina Blažová

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Petra Horáka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 9. 5. 2012

.....

Poděkování:

Děkuji Petru Horákovi za trpělivost a cenné rady.

Děkuji Katce Blažové za zasvěcení do problematiky sledování orientace schistosomul *in vitro*.

Děkuji kolegům z helmintologické laboratoře za ochotu kdykoli poradit a pomoci.

Děkuji své rodině a příteli za podporu během celého studia.

Abstrakt

Schopnost orientovat se v těle definitivního hostitele je v životním cyklu motolic velmi důležitá. Na rozdíl od mnoha poznatků o orientaci motolic ve vnějším prostředí, migračních cestách uvnitř hostitele a místech definitivní lokalizace je jen minimum známo o látkách, podle kterých se larvy motolic orientují v těle hostitelů.

V této práci byla testována chemoorientace schistosomul *Trichobilharzia regenti* v podmínkách *in vitro*. Testovány byly frakce nervové soustavy kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), frakce krevního séra kachen o různé molekulové hmotnosti, roztoky NaCl a KCl, D-glukóza, L-arginin, komerčně dostupné neuromediátory a apolipoprotein A-I. Nejvyšší atraktivitu vykazovalo neředěné krevní sérum kachny domácí. Signifikantně atraktivní byly pro schistosomuly také roztoky NaCl v koncentraci 188 mM a 205 mM, roztok KCl v koncentraci 205 mM a kombinace NaCl, KCl a D-glukózy v koncentraci NaCl=136 mM, KCl=5 mM, D-glukóza=5,5 mM. Vzhledem k tomu, že roztoky NaCl a KCl o stejné osmolaritě (410 mOsm/l) byly stejně atraktivní, zatímco roztok D-glukózy o téže osmolaritě atraktivní nebyl, domníváme se, že stimulem pro migraci jsou chloridové ionty.

Při testování frakcí krevního séra kachny o různé molekulové hmotnosti byla nejvíce atraktivní frakce 10-30 kDa. Jak se ukázalo, hlavním atraktantem této frakce byl apolipoprotein A-I, a to v testované koncentraci 1 mg/ml.

Pokusy s různými iniciálními počty cercárií prokázaly negativní korelaci mezi počátečním počtem cercárií a procentem cercárií, které penetrovaly vrstvou agarů s kyselinou linolovou.

Sledování senzorických papil na apikálním konci těla cercárií a schistosomul ukázalo, že jediná vhodná metoda pro charakterizaci těchto papil je skenovací elektronová mikroskopie. Touto metodou bylo v oblasti CI identifikováno 10 papil tří morfologických typů. Ze dvou detailněji sledovaných senzorických papil se se stářím schistosomul zvětšovala délka jedné papily, a to papily typu VII.

Klíčová slova: *Trichobilharzia regenti*, chemoorientace, cercárie, schistosomulum, chetotaxe.

Abstract

The ability to orientate themselves in the definitive host body is very important in the life cycle of trematodes. Contrary to a number of data on trematode orientation in the external environment, migratory routes within the host and places of definitive localization, little is known about compounds serving as stimuli during migration.

In this study we tested chemoorientation of *Trichobilharzia regenti* schistosomula *in vitro*. We tested fractions of the nervous tissue homogenate of domestic duck (*Anas platyrhynchos* f. domestica), various fractions of the duck blood serum, NaCl and KCl solutions, D-glucose, L-arginine and commercially available neuromediators and apolipoprotein A-I. The highest attractiveness was recorded in the case of the blood serum of domestic duck. Significant attractiveness also showed NaCl solution at concentrations of 188 and 205 mM, KCl solution at concentration of 205 mM and combination of NaCl, KCl and D-glucose at concentrations NaCl=136 mM, KCl=5 mM, D-glucose=5,5 mM. As the attractiveness of NaCl and KCl solutions of the same osmolarity (410 mOsm/l) was equal, and D-glucose solution of the same osmolarity showed no attractiveness for schistosomula, we suggest that the chloride ions are the main stimulus for migration.

When various molecular weight fractions of the duck blood serum were tested, 10-30 kDa fraction showed the highest attractiveness. The main attractant was apolipoprotein A-I in the concentration of 1 mg/ml.

Tests with various initial numbers of cercariae showed negative correlation between the initial number of cercariae and the percentage of schistosomula that penetrated the layer of agar with linoleic acid.

Monitoring of sensory papillae at the apical end of the cercariae and schistosomula showed that the most relevant method for characterization of these papillae is scanning electron microscopy. Using this method, 10 papillae belonging to three morphological types were identified. Measurement of two of these papillae reported progressive enlargement of one papilla of the type VII.

Keywords: *Trichobilharzia regenti*, chemoorientation, cercariae, schistosomulum, chaetotaxy.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 8 |
| 2. Literární přehled | 10 |
| 2.1. Chemoorientace cercárií ve vnějším prostředí | 10 |
| 2.1.1. Motolice, jejichž cercárie napadají bezobratlé | 10 |
| 2.1.2. Motolice, jejichž cercárie napadají obratlovce | 11 |
| 2.2. Orientace v hostiteli..... | 17 |
| 2.2.1. Orientace v druhém mezihostiteli..... | 17 |
| 2.2.2. Orientace v definitivním hostiteli | 20 |
| 2.3. Receptory motolic | 23 |
| 2.4. Využití poznatků o chemoorientaci motolic | 24 |
| 3. Cíle práce | 26 |
| 4. Materiál a metodika | 27 |
| 4.1. Udržování laboratorního životního cyklu <i>T. regenti</i> | 27 |
| 4.2. Testování chemoorientace schistosomul <i>in vitro</i> | 27 |
| 4.2.1. Migrační komůrky | 29 |
| 4.2.2. Složení médií a postup plnění: testování solublních frakcí nervové soustavy, D-glukózy a L-argininu (metoda č. 1) | 29 |
| 4.2.3. Složení médií a postup plnění: testování solí, D-glukózy, L-argininu, neuromediátorů a frakcí kachního séra o různé molekulové hmotnosti (metoda č. 2) | 31 |
| 4.2.4. Složení médií a postup plnění: testování vlivu změn osmolarity médií na migraci schistosomul (metoda č. 3) | 32 |
| 4.2.5. Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci | 32 |
| 4.2.6. Analýza atraktivní frakce kachního séra | 33 |
| 4.3. Sledování změn sensorických papil na apikálním konci cercárií a schistosomul..... | 33 |
| 4.3.1. Kultivace schistosomul pro sledování sensorických papil | 33 |
| 4.3.2. Pitva definitivních hostitelů pro získání schistosomul | 34 |
| 4.3.3. Metody použité pro vizualizaci sensorických papil cercárií a schistosomul..... | 34 |
| 4.4. Statistika | 36 |
| 5. Výsledky | 37 |
| 5.1. Testování chemoorientace schistosomul <i>T. regenti in vitro</i> | 37 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.1.1. | Testování atraktivity solubilních frakcí nervové soustavy, D-glukózy a L-argininu pro schistosomuly <i>T. regenti</i> (metoda č. 1)..... | 37 |
| 5.1.2. | Testování atraktivity složek „Hank’s balanced salt solution“ média, solí v různých koncentracích, D-glukózy, L-argininu a neuromediátorů (metoda č.2)..... | 38 |
| 5.1.3. | Testování vlivu změn osmolarity médií na migraci schistosomul (metoda č. 3)..... | 42 |
| 5.1.4. | Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci | 43 |
| 5.2. | Analýza kachního séra..... | 44 |
| 5.3. | Sledování změn receptorů na apikálním konci těla cercárií a schistosomul | 45 |
| 5.3.1. | Barvení dusičnanem stříbrným..... | 45 |
| 5.3.2. | Fluorescenční značení tubulinu | 46 |
| 5.3.3. | Sledování senzorických papil pomocí SEM..... | 47 |
| 6. | Diskuze | 49 |
| 6.1. | Chemoorientace schistosomul <i>T. regenti</i> | 49 |
| 6.2. | Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci..... | 53 |
| 6.3. | Sledování změn receptorů na apikálním konci těla cercárií a schistosomul | 53 |
| 6.4. | Problémy metodických přístupů..... | 55 |
| 7. | Závěr..... | 57 |
| 8. | Použitá literatura..... | 59 |

1. Úvod

Schopnost vyhledat svého hostitele, orientovat se v jeho těle a nalézt vhodné místo, kde mohou dospět a produkovat vajíčka, hraje v životním cyklu motolic klíčovou roli.

Vyhledávání hostitele je zprostředkováno stadii přizpůsobenými pro pobyt ve vnějším prostředí, což jsou miracidia a cercárie. Miracidia jsou k mezihostiteli atrahována takzvanými „MAGs“ (miracidia attracting glycoproteins), což jsou makromolekulární glykoproteiny vylučované měkkýšem (Schiff 1969; Haberl a kol. 1995). Cercárie se ve vnějším prostředí orientují pomocí foto-, geo-, termo- a chemotaxe a chemokineze. Přichycení na definitivního hostitele a penetrace do něj jsou u schistosomních motolic vyvolávány reakcí na ceramidy, cholesterol, mastné kyseliny a vyšší teplotu povrchu než je okolní prostředí (Feiler a Haas 1988a,b; Haas a van de Roemer 1998). Po úspěšné penetraci následuje fáze orientace a migrace v definitivním hostiteli, kdy musí parazit vyhledat místo své definitivní lokalizace. V této fázi se larvy orientují podle chemických gradientů různých látek a také podle světla (Grabe a Haas 2004a, b; Haas a kol. 2007).

Na rozdíl od mnoha poznatků o orientaci motolic ve vnějším prostředí, migračních cestách uvnitř hostitele a místech definitivní lokalizace, o orientaci v těle je známo jen minimum. Tato fáze je přitom v životním cyklu motolic jedna z nejdůležitějších. Bez schopnosti úspěšně nalézt vhodné místo, kde můžou dospět a rozmnožovat se, by se celý životní cyklus přerušil. Znalost chemických látek, na které cercárie a schistosomuly reagují, by mohla být užitečná i při vývoji metod pro přerušování životního cyklu motolic, a tak i pro ochranu osob před infekcí.

Trichobilharzia regenti Horák, Kolářová & Dvořák, 1998 je motolice z kmene Platyhelminthes, třídy Trematoda a čeledi Schistosomatidae. Jejím mezihostitelem jsou plži rodu *Radix* a definitivním hostitelem jsou vodní ptáci. V České republice je to především kachna divoká (*Anas platyrhynchos*). Schistosomuly *T. regenti* migrují do místa své definitivní lokalizace, sliznice nosní dutiny ptáků, neobvyklou cestou - periferními nervy, míchou a mozkem. V nosní dutině červy dospívají a rozmnožují se (Horák a kol. 1998; Horák a kol. 1999). Cercárie *T. regenti* jsou jedním z původců tzv. cercárie dermatitidy u lidí, což je reakce lidského imunitního systému na proniknutí cercárií ptačích schistosom (Horák a kol. 1999, Horák a kol. 2002). Toto onemocnění provázené intenzivním svěděním je vzrůstajícím problémem nejen v České republice. Stále zůstává otázkou, zda schistosomuly mohou z kůže pronikat i dále do lidské nervové soustavy a poškozovat ji. Rozšíření znalostí o chování

schistosomul *T. regenti* při migraci tělem definitivního hostitele a o stimulech, podle kterých se orientují, by mohlo pomoci tuto otázku vyřešit.

2. Literární přehled

2.1. Chemoorientace cercárií ve vnějším prostředí

Schopnost orientovat se v prostředí a v hostiteli je velmi důležitá pro všechna životní stadia motolic. Bez této schopnosti by motolice nedokázaly vyhledat svého hostitele ani nalézt vhodné místo uvnitř jeho těla. V průběhu evoluce se vyvinuly rozmanité strategie, které mají zajistit maximální úspěšnost při jejich šíření a přenosu.

2.1.1. Motolice, jejichž cercárie napadají bezobratlé

Podle gradientů chemických látek se ve vnějším prostředí orientují především cercárie echinostomních motolic, které napadají jako druhého mezihostitele měkkýše. Vodní plži jsou oproti obratlovcům méně pohybliví, takže se kolem nich může vytvořit chemický gradient látek, které cercárie atrahují. Aby se snížilo riziko penetrace do téhož plže, ze kterého se cercárie uvolnila, a tím i příliš silné nákazy, orientují se cercárie echinostomních motolic v prvních chvílích po uvolnění podle světla a gravitace a nereagují na chemické signály z plže (Haas 1994; Evans a Gordon 1983, cit. dle. Loy a kol. 2001). Při vyhledávání hostitele reagují larvy echinostomních motolic na chemické látky vyskytující se v tak zvané „SCW“ (Snail Conditioned Water – plžem obývaná voda). V chemoorientaci cercárií se vyskytuje variabilita. Například cercárie *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma trivolvis* a *Pseudoechinoparyphium echinatum* se orientují pomocí chemokineze (se zvyšující se koncentrací stimulu častěji mění směr pohybu, při klesající koncentraci se otočí zpět) a reagují na gradient aminokyselin, močoviny a amoniaku, zatímco cercárie *Hypoderaeum conoideum* se orientují pomocí chemotaxe (jsou schopny určit směr koncentračního gradientu atraktantu) a reagují na oligopeptidy (Haas a kol. 1995b; Körner a Haas 1998a, b; Haberl a kol. 2000). U prvních tří druhů jsou hlavním signálem aminokyseliny v L-konformaci s primární α -aminoskupinou. Typ aminokyseliny a délka peptidového řetězce jsou nepodstatné. Dodatečnými stimuly jsou močovina a amoniak (Körner a Haas 1998b).

Cercárie echinostomních motolic nedokážou rozlišovat mezi látkami vylučovanými různými vodními živočichy nebo různými druhy vodních plžů tak, jak to dokážou miracidia, přestože by to bylo užitečné, neboť úspěšnost infekce se mezi různými druhy hostitelských plžů velmi liší (Haas a kol. 1995a; Fried a kol. 1997). *Echinostoma revolutum* a *P. echinatum*, jejichž cercárie jsou atrahovány aminokyselinami, nedokážou rozlišit mezi vzorky vody, ve které se vyskytovaly různé druhy plžů, ryby, pulci a pijavky, pokud byla zředěna tak, aby aminokyseliny obsažené v ní měly stejnou koncentraci. Specifita v chemoorientaci tedy

spočívá v určité koncentraci aminokyselin, a ne v určité specifické kombinaci aminokyselin (Körner a Haas 1998a). Strategie pro vyhledávání a identifikaci hostitelského měkkýše a atraktanty, na které larvální stadia reagují, se liší dokonce i mezi miracidii a cercáriemi jednoho druhu, jak to bylo pozorováno u druhu *Echinostoma caproni* (Haberl a kol. 2000).

2.1.2. Motolice, jejichž cercárie napadají obratlovce

Cercárie motolic napadajících jako dalšího hostitele obratlovce se po uvolnění z mezihostitelského plže a lokalizaci habitatu dalšího hostitele orientují především podle světla (resp. zastínění) a vodních proudů, nebo vyčkávají na kontakt s tělem hostitele. Na chemické látky reagují až v bezprostřední blízkosti definitivního hostitele (Haas 1994). Je to dáno tím, že cercárie těchto druhů napadají ryby, ptáky a savce, kteří se ve vodním prostředí pohybují nesrovnatelně rychleji než vodní plži. Jedinou výjimkou jsou cercárie *S. mansoni*, které se podle chemických látek orientují i ve větších vzdálenostech od hostitele.

Po kontaktu s potenciálním hostitelem cercárie vykazují sérii vzorců chování: přichycení na hostitele, trvalý kontakt, nalezení vhodných míst pro průnik do hostitele a penetrace do něj. Každá fáze může být vyvolána odlišnými signály (Tabulka 1). V těchto fázích se vyskytuje velká diverzita strategií, stimulační látky se liší podle toho, zda jsou definitivní hostitelé ryby, ptáci nebo savci (Haas a Haberl 1997).

Tabulka 1: Stimulační signály v jednotlivých fázích rozpoznávání definitivního hostitele cercáriemi různých druhů (upraveno dle Haas 2003)

| Druhy motolic | Přichycení | Trvalý kontakt | Nalezení vhodných míst pro penetraci | Penetrace |
|---|--|----------------------------------|--------------------------------------|--|
| Druhy napadající ryby | | | | |
| <i>Diplostomum spathaceum</i> ¹ | turbulence vody CO ₂ +H ₂ CO ₃ | sacharidy | ? | glykoproteiny s kyselinou sialovou mastné kyseliny |
| <i>Acanthostomum brauni</i> ² | zastínění glykoproteiny s kyselinou sialovou | ? | ? | kombinace proteinů a mastných kyselin |
| <i>Opisthorchis viverrini</i> ³ | turbulence vody glykosaminoglykany | ? | ? | proteiny |
| <i>Isthmiophora melis</i> | CO ₂ +H ₂ CO ₃ | ? | ? | ? |
| Druhy napadající ptáky | | | | |
| <i>Trichobilharzia szidati</i> ⁴ | zastínění ceramidy cholesterol teplo | ceramidy cholesterol teplo | ? | mastné kyseliny |

| | | | | |
|---|--|--|--------------------|--|
| <i>Austrobilharzia terrigalensis</i> ⁵ | kontakt | žádné stimuly | žádné stimuly | volné steroly |
| <i>Austrobilharzia variglandis</i> ⁶ | žádné stimuly | žádné stimuly | žádné stimuly | cholesterol mastné kyseliny triacylglyceroly |
| Druhy napadající savce | | | | |
| <i>Schistosoma mansoni</i> ⁷ | turbulence vody L-arginin teplo | ceramidy teplo | L-arginin teplo | mastné kyseliny |
| <i>Schistosoma haematobium</i> ⁸ | L-arginin teplo | žádné stimuly | L-arginin teplo | mastné kyseliny |
| <i>Schistosoma spindale</i> ⁹ | teplo | teplo | teplotní gradient | mastné kyseliny |
| <i>Schistosoma japonicum</i> ¹⁰ | žádné stimuly | žádné stimuly | teplotní gradient | mastné kyseliny teplo |
| <i>Orientobilharzia turkestanicum</i> ¹¹ | hydrofilní a lipofilní extrakty kůže skotu teplo | hydrofilní a lipofilní extrakty kůže skotu | ? | mastné kyseliny |

Reference: ¹Haas 1974a,b; 1975; ²Haas a Ostrowski de Nuñes 1988; Ostrowski de Nuñes a Haas 1991; ³ Haas a kol. 1990b; ⁴Feiler a Haas 1988a,b; Haas a van de Roemer 1997; ⁵Clegg 1969; ⁶Zibulewsky a kol. 1982; ⁷Austin a kol. 1972; Shiff a kol. 1972; Haas 1976; Haas a Schmitt 1982a,b; Granzer a Haas 1986; Haas a kol. 1994, 1997, 2002a; Haas a kol. 2008; ⁸Haas a kol. 1994; ⁹Haas a kol. 1990a; ¹⁰Haas a kol. 1987; ¹¹Shakarbaev a kol. 2001

2.1.2.1. Druhy napadající ryby

Mezi druhy, jejichž cercárie napadají jako další mezihostitele ryby, se vyskytuje velká variabilita, co se týče signálů, na které cercárie reagují a podle kterých se orientují (Tabulka 1). Tyto signály mohou být jak hostitelsky specifické, jako u druhů *Acanthostomum brauni* a *Opisthorchis viverrini*, tak to mohou být látky, které se vyskytují běžně v okolním prostředí, jako je tomu u druhu *Diplostomum spathaceum*. Cercárie tohoto druhu přisedají na široké spektrum vodních živočichů v reakci na turbulenci vody a určitou koncentraci CO₂ + H₂CO₃. Pro přisednutí stačí zvýšení koncentrace oxidu uhličitého o 0,04 %. Cercárie *D. spathaceum* tedy reagují na hostitelsky nespecifické signály, což jim ale dává možnost reagovat okamžitě a přisednout velmi rychle, a tím zvýšit pravděpodobnost infekce dalšího hostitele (Haas 1974a,b; 1975). Za rozpoznání specifického hostitele (ryby) a trvalý kontakt s ním jsou zodpovědné monosacharidy. Penetraci naproti tomu vyvolávají glykoproteiny s O-glykosidicky vázanými sacharidovými řetězci a kyselinou sialovou jako signální strukturou (oxidace kyseliny sialové radikálně snížila stimulační efekt rybiho hlenu) a mastné kyseliny (Haas a kol. 2002b). Kyselina sialová je typickou složkou hlenu na povrchu těla u obratlovců, ale chybí u mnoha bezobratlých (Schauer a kol. 1995).

Cerkárie druhu *A. brauni* přisedají na svého hostitele v reakci na glykoproteiny s kyselinou sialovou jako hlavní signální strukturou. Kyselina hyaluronová byla také atraktivní, ale především ve vyšších koncentracích a v kombinaci s mucinem. Penetraci stimuluje makromolekulární složky rybího povrchového hlenu, které byly identifikovány jako glykoproteiny, a dále volné mastné kyseliny, které především zvyšují atraktivitu proteinů, ale pokud jsou nabízeny samotné, jsou pro cercárie jen málo atraktivní. Velké molekuly glykoproteinů mohou být adaptací na bahnitě prostředí, ve kterém se cercárie pohybují a kde by množství nízkomolekulárních látek mohlo znemožňovat identifikaci hostitele (Haas a Ostrowski de Nuñez 1988; Ostrowski de Nuñez a Haas 1991).

U cercárií druhu *O. viverrini* je přisednutí na hostitele vyvoláno reakcí na vodní proudy a hydrofilní složku rybího hlenu. Touto složkou jsou pravděpodobně glykosaminoglykany. Setrvání na povrchu hostitele vyvolávají prozatím neidentifikované složky hlenu. Signálem pro penetraci do hostitele jsou proteiny povrchového hlenu. Reakce na tak velké molekuly, jako jsou glykosaminoglykany a proteiny, pravděpodobně umožňuje vyhledávání hostitele v bahnitě prostředí, stejně jako u cercárií *A. brauni* (Haas a kol. 1990b).

Posledním druhem motolic infikujících ryby, u kterého bylo sledováno vyhledávání a rozpoznání hostitele, je *Isthmiophora melis*, echinostomní motolice, jejíž cercárie napadají jako druhého mezipřehostitele ryby a obojživelníky. Cercárie tohoto druhu přisedají na své hostitele v reakci na určitou koncentraci $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3$ (Motzel a Haas 1985). Orientace tohoto druhu je tedy podobná orientaci druhu *D. spathaceum*.

2.1.2.2. Druhy napadající ptáky

Cerkárie většiny druhů motolic, které napadají jako definitivní hostitele ptáky, často pronikají i do kůže savců, kde ale nejsou schopné přežít a v důsledku reakce imunitního systému hynou. Pronikání do člověka, jako do nespecifického hostitele, může být způsobeno tím, že v této fázi života cercárie reagují na chemické látky, které se vyskytují nejen na kůži ptáků, ale i savců. Takovými látkami jsou ceramidy a cholesterol, na které reagují cercárie tří dosud studovaných druhů alespoň v jedné fázi vyhledávání a penetrace do hostitele (Tabulka 1). Tyto látky nejsou přítomny v obsahu ptačích uropygiálních žláz, nevyskytují se tedy ani na povrchu ptačího peří. Schopnost reagovat na ceramidy a cholesterol může tedy cercáriím pomoci zabránit zbytečným snahám proniknout do peří ptáků (Haas 1994). Navíc kůže na nohách vodních ptáků postrádá žlázy, pokožka ptáků tedy obsahuje méně chemických látek

schopných vytvořit gradient kolem těla hostitele než pokožka suchozemských obratlovců. To je pravděpodobně důvod, proč cercárie napadající ptáky reagují při přisedání na hostitele především na lipidy na povrchu kůže, které jsou ve vodě nerozpustné (Haas a van de Roemer 1998).

Detailní data jsou k dispozici pro cercárie druhu *Trichobilharzia szidati* (v evropských podmínkách označována dříve jako *T. ocellata* (Rudolfová a kol. 2005)). Pro cercárie tohoto druhu je důležité, aby dostaly správné stimuly v určitých fázích vyhledávání hostitele. Například v klidové fázi cercárie nereagují na turbulenci vody a kontakt, pouze na zastínění. Pokud jsou vystaveny zastínění, spustí se u nich fáze dlouhotrvajícího plavání směrem od zastínění. Vzhledem k tomu, že se v klidové fázi vyskytují u vodní hladiny, může je toto chování přivést do blízkosti nohou vodních ptáků. Zastínění dále zvyšuje citlivost parazita na vyšší teplotu substrátu a na chemické látky přítomné na pokožce ptáků, které fungují jako stimuly pro přisednutí a trvalý kontakt (Feiler a Haas 1988a). Dalšími testy byly tyto látky identifikovány jako cholesterol a ceramidy v 1-5 procentní koncentraci (Feiler a Haas 1988b). Tyto lipidy jsou hydrofobní, a tedy ve vodě nerozpustné, a tomu se přizpůsobilo chování cercárií tohoto druhu při přisedání. Zatímco cercáriím ostatních schistosomních druhů stačí jen krátký kontakt s atraktivním substrátem před tím, než na něj přisednou, cercárie druhu *T. szidati* po kontaktu pokračují v pohybu vpřed, a tím prodlužují dobu kontaktu se substrátem (Feiler a Haas 1988a). *Trichobilharzia szidati* je také výjimečná tím, že cercárie tohoto druhu využívají lipidy už při rozpoznání a přisedání na hostitele, zatímco cercárie ostatních druhů z čeledi Schistosomatidae reagují na lipidy až v dalších fázích invaze do hostitele (Feiler a Haas 1988b).

Stimulem pro penetraci cercárií *T. szidati* do hostitele jsou volné mastné kyseliny, nicméně u některých izolátů druhu byla pozorována také pozitivní odpověď na hydrofilní frakce ptačí kůže (Haas a van de Roemer 1998, Haas a Haeberlein 2009). Cercárie *T. szidati* a *S. mansoni* produkují při inkubaci s kyselinou linolovou různé typy eikosanoidů. Existuje teorie, že mastné kyseliny mohou nejen ovlivňovat transformaci ve schistosomuly, ale i přispívat k obraně proti imunitnímu systému hostitele (Nevhatalu a kol. 1993). Kyselina linolová stimuluje penetraci v koncentraci 1 μ M, cercárie *T. szidati* vykazují tedy mnohem vyšší citlivost na tuto kyselinu než cercárie *S. mansoni*, které stimuluje koncentrace vyšší (viz kapitola 2.1.2.3). To může být adaptace na invazi ptačí kůže, která obsahuje nižší koncentraci kyseliny linolové než savčí kůže (Haas a Haeberlein 2009).

Austroilharzia terrigalensis a *Austroilharzia variglandis* reagují při penetraci do hostitele na volné steroly, resp. na cholesterol, mastné kyseliny a triacylglyceroly (Tabulka 1) (Clegg 1969; Zibulewsky a kol. 1982). U druhů napadajících ptáky se tedy vyskytuje podobná variabilita ve stimulačních látkách, na které cercárie reagují v průběhu rozpoznání a penetrace do hostitele, jako u druhů napadajících ryby. Je ale možné, že identifikace hostitele se liší mezi druhy žijícími v mořském a ve sladkovodním prostředí (Haas a van de Roemer 1998).

2.1.2.3. Druhy napadající savce

Z této skupiny byly studie prováděny pouze na cercáriích z čeledi Schistosomatidae. Každý druh z této čeledi má specifickou strategii rozpoznání svého hostitele a penetrace do něj (Tabulka 1). Je to pravděpodobně adaptace na různé ekologické podmínky prostředí, ve kterém infikují svého hostitele. Například cercárie *S. mansoni* a *Orientobilharzia turkestanicum* (druh nově řazený do rodu *Schistosoma* (Wang a kol. 2009)) se v těchto fázích orientují především podle chemických látek, které se vyskytují na kůži hostitele (Haas a kol. 1994; Shakarbaev a kol. 2001). Naopak cercárie *S. japonicum* a *S. spindale* neutilizují žádné chemické látky jako signály při vyhledávání hostitele (kromě fáze penetrace), ale orientují především podle tepla (Haas a kol. 1987). Je možné, že citlivost ke specifickým chemickým látkám se vyvinula jako adaptace na život v čisté vodě nebo blízko vodní hladiny (*S. mansoni* a *O. turkestanicum*), zatímco citlivost ke změnám teploty (*S. japonicum* a *S. spindale*) je pravděpodobně adaptace na bahnitě vody, ve kterých se cercárie těchto druhů setkávají se svými hostiteli (Haas a kol. 1990a, 1994). Pro cercárie schistosomních motolic je charakteristické, že fáze penetrace je stimulována volnými mastnými kyselinami, které jsou přítomny na kůži většiny savců.

Cercárie *S. mansoni* jsou mezi cercáriemi motolic napadajícími obratlovce výjimečné, protože se orientují podle chemických látek i ve větší vzdálenosti od hostitele. Na atraktanty, kterými jsou mastné kyseliny, L-arginin a malé peptidy s terminálně vázaným L-argininem, reagují tím, že rychle přecházejí mezi fázemi plavání dopředu a dozadu, a také častěji mění směr plavání. To je může vést k akumulaci v blízkosti lidské kůže a zvýšení pravděpodobnosti kontaktu s ní. Toto chování bylo identifikováno jako chemoklinokineze. Atraktivita volných mastných kyselin byla limitována délkou řetězce, a to mezi 10 a 14 atomy uhlíku, a stoupala s počtem dvojných vazeb. Volný L-arginin byl atraktivní v koncentraci 100 nM a vázaný v koncentraci 50 μ M (Haerberlein a Haas 2008; Brachs a Haas 2008).

Přisednutí na tělo hostitele je stimulováno především L-argininem v koncentraci 1 μM -1mM. Se zvyšující se koncentrací L-argininu se zvyšuje i odpověď cercárií na něj (Haas a kol. 1994). Dalšími stimuly jsou turbulence vody a vyšší teplota substrátu (Tabulka 1) (Haas 1976; Granzer a Haas 1986; Haas a kol. 1994). Setrvání na povrchu hostitele je stimulováno vyšší teplotou substrátu a lipidy přítomnými na povrchu kůže, především ceramidy (Haas 1976). Vhodná místa pro penetraci cercárie nalézají pomocí teplotních gradientů a gradientů L-argininu. V této studii vykazovaly cercárie jistou senzitivitu i na další tři základní aminokyseliny přítomné na pokožce člověka, L-ornithin, L-histidin a L-lysin, atraktivita těchto látek byla ale mnohem nižší než L-argininu (Haas 1976; Haas a kol. 1994). Penetraci a transformaci ve schistosomuly stimulují volné mastné kyseliny (Haas a Schmitt 1982 a, b).

Orientace cercárií *S. haematobium* je podobná orientaci *S. mansoni*. Je to pravděpodobně proto, že oba druhy napadají jako definitivního hostitele člověka. Cercárie *S. haematobium* reagují při přisednutí citlivěji a intenzivněji na zvýšenou teplotu substrátu a tato reakce je inhibována u povrchů nepřírodně horkých. Přisednutí je dále stimulováno L-argininem v koncentraci kolem 3 μM , ale na rozdíl od cercárií *S. mansoni* se s růstem koncentrace odpověď dále nezvyšovala, a také celková atraktivita L-argininu je u cercárií *S. haematobium* nižší. Ve fázi setrvání na povrchu hostitele se pravděpodobně neuplatňují žádné stimuly. Při vyhledávání vhodných míst pro penetraci se cercárie orientují podle teplotního gradientu a podle gradientu L-argininu. Senzitivita cercárií *S. haematobium* na změny teploty je daleko vyšší než u cercárií *S. mansoni*, stejně jako ve fázi přisednutí. Penetrace je jako u předchozího druhu stimulována volnými mastnými kyselinami. V průběhu vyhledávání hostitele a penetrace do něj vykazují tedy cercárie *S. haematobium* vyšší citlivost na změny teploty a nižší citlivost na chemické látky, což může být přizpůsobení pro vyhledávání hostitele v chladnějších vodách nebo ve větších hloubkách (Haas a kol. 1994).

Jak bylo řečeno výše, cercárie druhu *S. japonicum* v průběhu vyhledávání hostitele nepotřebují mnoho signálů. Pro přisednutí a setrvání jim stačí pevný, hydrofobní povrch. Při vyhledávání vhodného místa pro penetraci se orientují podle tepla a teplotních gradientů. Jediná fáze, kdy se orientují podle chemických látek, je fáze penetrace do hostitele, kdy se stejně jako ostatní druhy napadající suchozemské obratlovce orientuje podle mastných kyselin. Nejvíce atraktivní jsou nasycené mastné kyseliny s řetězcem obsahujícím 10–14 atomů uhlíku a nenasycené mastné kyseliny s řetězcem obsahujícím 18 atomů uhlíku a vysoký počet dvojných vazeb. U cercárií *S. japonicum* může být ale penetrace stimulována

i pouze vyšší teplotou substrátu oproti okolnímu prostředí, v rozmezí 32–40 °C (Haas a kol. 1987).

Cerkárie druhu *S. spindale* přisedají na svého definitivního hostitele (především skot) a setrvávají na něm v reakci na vyšší teplotu. Při vyhledávání vhodných míst pro penetraci se orientují podle teplotního gradientu a pro orientaci jim stačí gradient se změnou o 0,07 °C/mm. Penetrace je stimulována, jak je to typické pro schistosomní motolice, mastnými kyselinami. Tímto chováním je *S. spindale* pravděpodobně adaptována na své srstnaté hostitele a mělké bahnité vody, kde se vyskytují mezihostitelští plži (Haas a kol. 1990a).

Posledním druhem motolice z této skupiny, který byl testován na orientaci cercárií, je *O. turkestanicum*. Při přisedání na svého definitivního hostitele, skot, jsou pro cercárie tohoto druhu stimulem zvýšená teplota a prozatím neidentifikované hydrofilní a lipofilní extrakty z kůže skotu. Tyto extrakty jsou stimulem také v další fázi, setrvání na hostiteli. Reakcí na dva odlišné chemické stimuly v prvních dvou fázích rozpoznávání hostitele se tento druh odlišuje od ostatních schistosomních druhů. Penetrace je opět stimulována volnými mastnými kyselinami (Shakarbaev a kol. 2001).

2.2. Orientace v hostiteli

Na rozdíl od mnoha poznatků o orientaci motolic ve vnějším prostředí, migračních cestách uvnitř hostitele a místech definitivní lokalizace, o orientaci v těle hostitele je známo jen minimum. Je to díky problematickému sledování chování motolic *in vivo*, protože jakýkoliv zásah do těla hostitele může změnit vnitřní prostředí, a tím i reakce motolic.

O orientaci larev motolic v měkkýši není doposud nic známo. Zkoumány byly především migrační cesty, mezidruhovú kompetice a vliv na mezihostitele (Alicata 1962, Cheng a Cooperman 1964, Xia a Jourdane 1991).

Orientace ve druhém mezihostiteli a v definitivním hostiteli byla doposud testována pouze u tří druhů motolic a to v podmínkách *in vitro*. Bylo zjištěno, že při navigaci v těle se vyskytuje podobná diverzita strategií, jako při vyhledávání hostitele.

2.2.1. Orientace v druhém mezihostiteli

Signály pro orientaci v druhém mezihostiteli, konkrétně v rybě, byly zkoumány na druhu *Diplostomum spathaceum* z čeledi Diplostomatidae. Cercárie tohoto parazita penetrují kůži mezihostitele, mění se na diplostomuly a poté migrují tělem ryby až do hlavy a oční čočky.

Zde v podobě metacerkárií vyčkávají do té doby, než rybu uloví vodní pták, který je jejich definitivním hostitelem.

Otázka, zda diplostomuly migrují z kůže do oka přes tkáň nebo krevním řečištěm, není ještě úplně vyřešená, ale zdá se, že hlavní migrační cesta je přes žíly, které mohou larvy občas opustit a migrovat pojivovou nebo svalovou tkání (Davis 1936; Betterton 1974; White a kol. 1991).

V prvních chvílích po penetraci vykazují diplostomuly negativní fotoorientaci, což je může vést do hlubších vrstev kůže a zabránit proniknutí zpět do vnějšího prostředí (Grabe a Haas 2004b).

Když bylo cercáriím umožněno penetrovat do ocasní ploutve ryby druhu *Poecilia reticulata* (paví očko), většina migrovala přímo do žil v ocase a již po 1200 μm uražené vzdálenosti téměř 80 % diplostomul migrovalo kranialním směrem. Poté, co larvy urazily ještě větší vzdálenost, migrovaly kranialním směrem všechny. Schopnost parazita orientovat se kranialním směrem byla nezávislá na toku krve, protože diplostomuly takto migrovaly i v žilách, ve kterých byl zablokován průtok krve. Tato schopnost byla také nezávislá na přítomnosti živých buněk, jelikož se orientace diplostomul kranialním směrem vyskytovala, i když byla těla usmrcených ryb ošetřena tekutým dusíkem. Signály pro migraci v kranialním směru také nepocházely z anteriorní části ryby, protože se larvy orientovaly směrem k hlavě i v oddělené ocasní ploutvi, v oddělené části ploutve a také, když byly části ploutve připojeny k tělu opačně. Nicméně v ocasní ploutvi dekapitované ryby migrovaly diplostomuly pomaleji a vykazovaly více změn směru migrace, než v rybě, která nebyla dekapitovaná (Haas a kol. 2007).

Po penetraci do ploutve živé nebo dekapitované ryby ji opustilo jen minimum diplostomul a většina z těch, co ji opustily, migrovala před tím v kaudálním (špatném) směru. Naproti tomu u ryb ošetřených tekutým dusíkem (buňky již nebyly živé) opustila ploutev většina larev. Signály, které vedou diplostomuly směrem do hlubších vrstev kůže, se tedy vyskytují především v živé tkáni (Haas a kol. 2007).

Při výzkumu chemoatrakce v takzvaných W-komůrkách se zjistilo, že pro diplostomuly *D. spathaceum* jsou atraktivní neidentifikované nízkomolekulární frakce rybího séra, D-glukóza (nejvíce v koncentraci 1, 10 a 1000 μM), D-manóza v koncentraci 5 mM, D-maltotrióza v koncentraci 5 mM, roztoky NaCl a KCl o osmolaritě 450 mOsm/l. Protože roztoky NaCl a KCl o stejné osmolaritě byly stejně atraktivní, a protože mannitol o osmolaritě stejné jako tyto soli atraktivní nebyl, atraktivní komponentou byly shledány chloridové ionty.

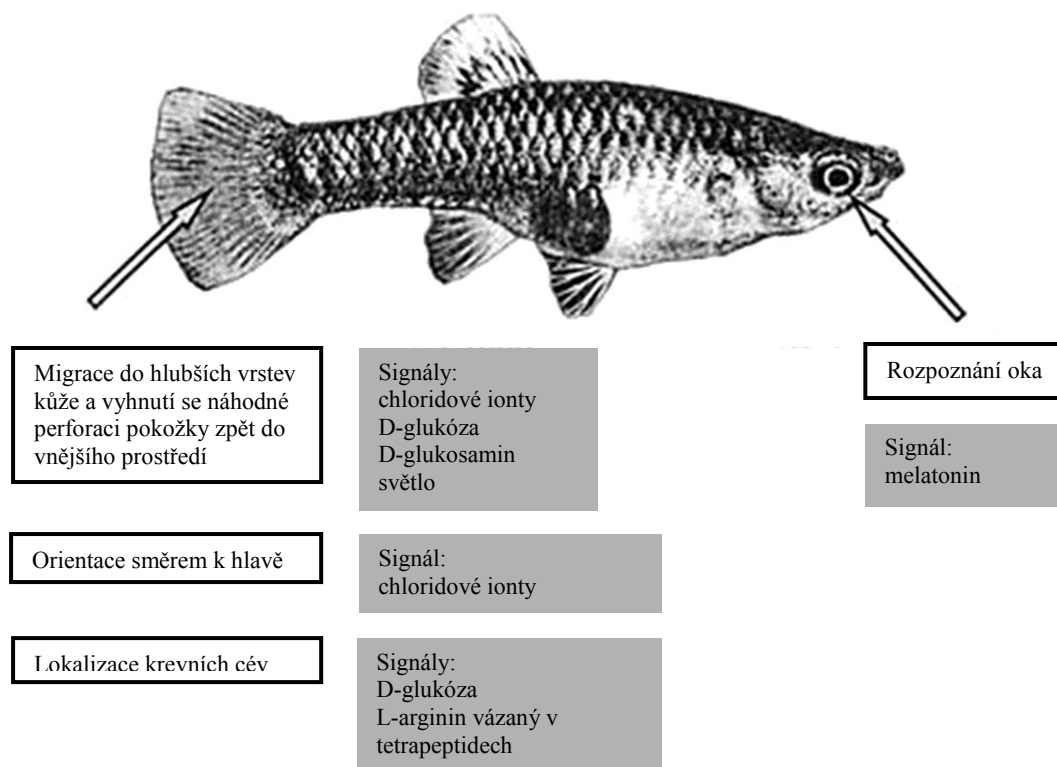
D-glukosamin v koncentraci 1 nM i v koncentraci 5 mM měl na larvy repelentní účinky. Aminokyseliny nebyly pro diplostomuly atraktivní, nicméně L-arginin vázaný v tetrapeptidech, především pokud byl na terminální pozici, byl atraktivní už od koncentrace menší než 1 μ M. Látkou, na kterou diplostomuly reagovaly nejvíce, byl melatonin, ale pouze v úzkém rozmezí koncentrací mezi 0,4 a 4,3 pM (Haas a kol. 2007).

Koncentrace melatoninu v retině je vyšší než v krvi a v okolních tkáních, může to tedy být dobrý navigační prvek pro migraci do oka. Retinu ale larvy opouštějí a migrují dále do oční čočky. Stimulantem v této fázi migrace by mohlo být světlo. Nebylo ale prokázáno, že by v přítomnosti melatoninu (v koncentracích 0,4 a 4,3 pM) došlo u larev *D. spathaceum* k přeměně negativní fotoorientace na pozitivní (Haas a kol. 2007). O gradientu chloridových iontů v těle ryb není nic známo, může však vzniknout díky přítoku vody do okrajových částí kůže. D-glukosamin je jedna z hlavních sloučenin extracelulární matrix a je tedy možné, že negativní chemotaxe vyvolaná jeho přítomností umožňuje diplostomulám vyhnout se migraci chrupavkami a bazálními laminami epitelii. D-glukóza je pro larvy *D. spathaceum* atraktivní v koncentracích, které jsou podobné koncentraci v krevní plasmě ryb, může to tedy být dobrý navigační prvek, který pomáhá larvám lokalizovat po penetraci do hostitele krevní cesty (Haas a kol. 2007).

Signály, na které diplostomuly reagují, mohou mít funkci ve čtyřech behaviorálních fázích během migrace v těle (Obr. 2):

- 1) migrace do hlubších vrstev kůže a vyhnutí se náhodné perforaci pokožky zpět do vnějšího prostředí – předpokládanými signály jsou chloridové ionty, D-glukóza, D-glukosamin a světlo;
- 2) orientace směrem k hlavě ryby – předpokládaným signálem jsou chloridové ionty;
- 3) lokalizace krevních cév – předpokládanými signály jsou D-glukóza a L-arginin vázaný v tetrapeptidech;
- 4) rozpoznání oka – předpokládaným signálem je melatonin.

Obr. 2: Model některých fází chování při migraci *D. spathaceum* rybím mezihostitelem a předpokládané signály užívané pro navigaci (upraveno dle Haas a kol. 2007)



2.2.2. Orientace v definitivním hostiteli

Orientace schistosomul v definitivním hostiteli byla zkoumána u dvou druhů z čeledi Schistosomatidae, *S. mansoni* a *T. szidati*. Poté, co cercárie schistosomních motolic penetrují *stratum corneum* definitivního hostitele, migrují nejdříve v epidermis paralelně s povrchem, následně penetrují *stratum basale*, vyhledají krevní cesty a vstoupí do nich (Wilson 1987). Nedospělé stadium uvnitř hostitele se u těchto motolic nazývá schistosomulum.

Cercárie *S. mansoni* a *T. szidati* nejčastěji vstupují do kůže v místech kožních vrásek, přičemž doba potřebná pro úplné proniknutí do kůže je v průměru 6,58 min u *S. mansoni* a 4,0 min u *T. szidati* (Haas a Haerberlein 2009).

V první fázi po penetraci se schistosomuly orientují mimo jiné podle světla, stejně jako diplostomuly *D. spathaceum* ve druhém mezihostiteli. Toto chování bylo prokázáno u druhů *S. mansoni* (napadající člověka) a *T. szidati* (napadající ptáky). Cercárie všech tří druhů změnila svoji pozitivní fotoorientaci na negativní poté, co penetrovaly do agarů a přeměnily se ve schistosomuly. To může být jedním z mechanismů, jak pronikat do hlubších vrstev kůže a zabránit uvolnění zpět do vnějšího prostředí (Grabe a Haas 2004b).

Chemoorientace v těle hostitele byla studována na schistosomulách druhů *S. mansoni* a *T. szidati*. Pomocí pokusů v takzvaných W-komůrkách se zjistilo, že schistosomuly obou druhů jsou atrahovány lidským resp. ptačím sérem, konkrétně D-glukózou a L-argininem, které jsou v něm přítomny. Schistosomuly nejlépe odpovídaly na velmi nízké koncentrace D-glukózy (1 μM u *T. szidati* a kolem 10 a 100 μM u *S. mansoni*) a L-argininu (kolem 0,02 a 0,25 μM u *T. szidati*, *S. mansoni* byla atrahována širokým spektrem koncentrací především kolem 1, 10 a 1000 μM). Další atraktivní látkou pro schistosomuly *S. mansoni* byl L-ornithin v koncentraci 219 μM . Zajímavé je, že *T. szidati* odpovídala nejlépe na takové koncentrace látek, které byly mnohem nižší než obvyklé koncentrace v ptačím séru, například u D-glukózy až desetkrát. Jiné sacharidy než D-glukóza neměly žádnou stimulační aktivitu. L-arginin byl pro schistosomuly vysoce atraktivní také jako vázaný v tetrapeptidech. Oba druhy se však lišily v citlivosti na pozici L-argininu v těchto peptidech. *Schistosoma mansoni* odpovídala lépe na subterminálně, zatímco *T. szidati* na terminálně vázaný L-arginin. Mezi náhodně vybranými složkami kůže a endotelií byly atraktivní fibronektin a bradykinin, ale pouze pro schistosomuly *S. mansoni*. Fibronektin v koncentraci 1 μM , bradykinin nejvíce v koncentraci 33 μM a pěti-aminokyselinový fragment bradykininu nejvíce v koncentraci 100 μM . Schistosomuly obou druhů se natáčely svou ventrální stranou směrem k chemickému gradientu atraktantu, což jim při migraci v epidermis může pomoci zabránit penetraci pokožky zpět do vnějšího prostředí (Grabe a Haas 2004a).

Koncentrační gradient byl dokázán u D-glukózy i L-argininu, mohly by proto při orientaci v těle hostitele sloužit jako dobré signály. Koncentrace D-glukózy se u člověka zvyšuje od povrchu těla (0,6-1,7 mM) směrem k epidermis (2,2-5,0 mM) a krvi (4,4-6,0 mM) (Cunningham a Young 2003). V epidermis také existuje vzrůstající koncentrační gradient reziduí argininu směrem od *stratum corneum* ke *stratum basale* (Senshu a kol. 1995, 1996). Koncentrace L-argininu se zvyšuje od povrchu kůže (13 μM , Haas a kol. 2002a), až ke krvi (40-140 μM) a endoteliálními buňkám (100-1000 μM , Harrison 1997).

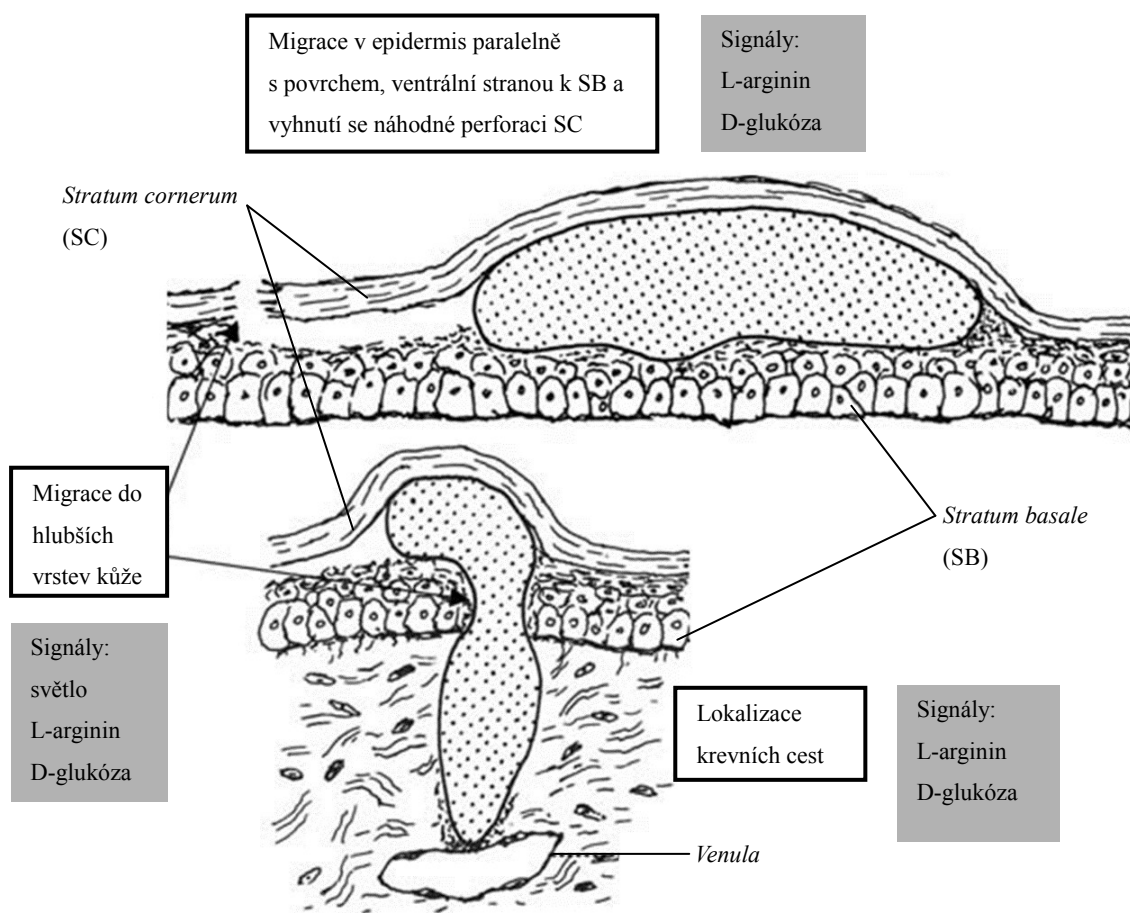
Popsaná chemo- a fotoorientace může mít význam ve třech fázích chování při migraci schistosomul kůží (Obr. 3):

1) migrace do hlubších vrstev kůže a vyhnutí se náhodné perforaci pokožky zpět do vnějšího prostředí – předpokládanými signály jsou světlo, L-arginin a D-glukóza;

2) migrace v epidermis paralelně s povrchem – předpokládanými signály jsou L-arginin a D-glukóza;

3) lokalizace krevních cest – předpokládanými signály jsou L-arginin a D-glukóza.

Obr. 3: Fáze migrace schistosomul v kůži a možné signály z těla hostitele (upraveno dle Grabe a Haas 2004a)



Schopnost orientovat se v hostiteli je v životním cyklu motolic klíčová. Bohužel nic není známo o tom, jak se v hostiteli orientují jiné druhy motolic. Pro zjištění, jakým způsobem se larvy motolic orientují v pozdějších fázích infekce, kdy migrují tělem do míst své definitivní lokalizace a na jaké látky v těchto fázích reagují, bude třeba dalších studií.

Je možné, že při další migraci tělem definitivního hostitele cercárie využívají nejen své senzorycké receptory (viz kapitola 2.3), ale také antigeny na svém povrchu. Například Lewis-X antigen, který se vyskytuje na povrchu lidských buněk, je i dominantním epitopem cercárií *S. mansoni* (Khoo a kol. 2001). Tento antigen, který se v těle podílí na buněčné signalizaci (Kannagi 2002), mohou cercárie využívat nejen jako prostředek k uniknutí

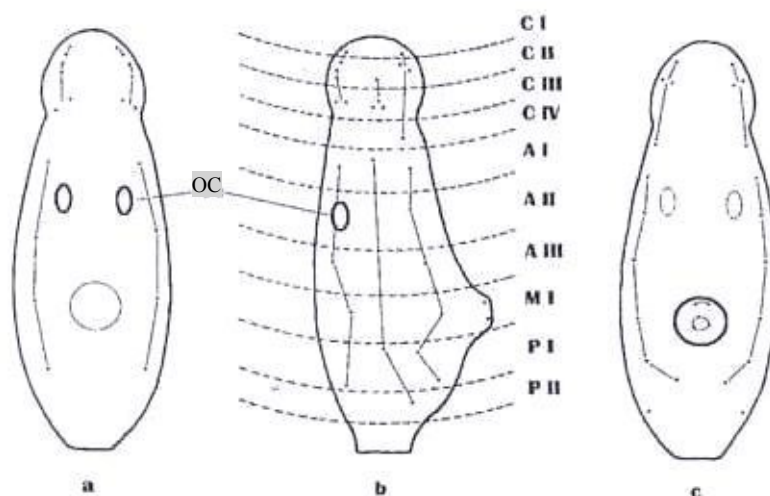
imunitnímu systému, ale podle některých teorií i pro orientovanou migraci tělem definitivního hostitele (Pearce 1993).

2.3. Receptory motolic

Všechna stadia motolic disponují širokou škálou senzorických orgánů, které mají funkci chemo-, mechano- a fotoreceptorů. Receptory jsou nezbytné pro orientaci motolic v prostředí a v těle hostitelů. Tyto senzorické struktury a jejich lokalizace na těle motolic jsou neměnné a jsou užívány jako taxonomické znaky (Richard 1971; Bogéa 2004, Podhorský a kol. 2009). Na těle cercárií byly nalezeny různé typy receptorů. Liší se přítomností tegumentální báze, tegumentálního límce, a přítomností a počtem cilií (Bogéa 2004). Navíc byla u cercárií *S. mansoni* objevena aciliární nervová zakončení nekomunikující s povrchem (Dorsey a kol. 2002). Pro snazší interpretaci umístění papil na těle cercárií byla vytvořena univerzální nomenklatura (Richard 1971). Tělo cercárie bylo rozděleno na několik částí: hlavovou (C I – C IV), přední (A I – A III), střední (M I) a zadní (P I – P II), papily ležící v oblasti acetabula jsou značeny S, v ocasní části U a na furce F (Obr. 4) (Kock a Böckeler 1998).

Na povrchu těla miracidíí a některých cercárií se také vyskytují komplexní receptory – oční skvrny (Faust 1918; van de Roemer a Haas 1984). U cercárií *T. szidati* se dokonce vyskytují dva typy fotoreceptorů – pigmentované a nepigmentované (Sopott-Ehlers 2003). I když známe mnoho typů senzorických struktur na těle motolic, o jejich skutečných funkcích můžeme jen spekulovat. Nicméně něco nám může napovědět umístění senzorických papil na těle, ve spojení s poznatky o chování cercárií při rozpoznávání hostitele (Sukhdeo a Sukhdeo 2004). Také morfologie papil může ukazovat na jejich možnou funkci. Například nízký tegumentální límec může umožňovat ciliím lépe reagovat na slabší mechanické stimuly, jako jsou vodní proudy, než vysoký límec (Bogea a Cairra 2001). Argentofilní papily s dlouhými ciliemi, které se často vyskytují na hlavové části cercárie, se pravděpodobně podílejí na rozpoznávání chemických látek z těla hostitele, protože navázání stříbra na tyto papily inhibuje schopnost cercárií pronikat do směsi agaru a kyseliny linolenové (King a Higashi 1992)

Obr. 4: Schematické znázornění rozložení sensorických papil na těle cercárie *T. szidati*, a) dorzální poled, b) laterální pohled, c) ventrální pohled, oc – oční skvrny (dle Kock a Böckeler 1998)



2.4. Využití poznatků o chemoorientaci motolic

Poznanky o chemoorientaci cercárií by se daly využít pro vývoj specifických metod pro boj s motolicemi. Tito parazité, především motolice z čeledi Schistosomatidae, jsou významnými patogeny člověka i hospodářských zvířat. Například na schistosomózy zemře ročně na celém světě asi 500 tisíc lidí a podle některých údajů je až 800 miliónů lidí touto nemocí ohroženo. Významným problémem nejen zemí mírného pásu je v současné době cercáriová dermatitida (tzv. swimmer's itch) (Horák a Kolářová 2011). Je to imunitní reakce lidského organismu po proniknutí ptačích cercárií do pokožky. Tato reakce imunitního systému se projevuje svědivou vyrážkou, která může trvat až čtrnáct dní. K pronikání cercárií ptačích motolic do lidské kůže může docházet často, vzhledem k tomu, že lidské i ptačí druhy motolic využívají pro penetraci do hostitele stejné signály (Tabulka 1). Cercáriová dermatitida způsobuje velké ztráty především v turistickém ruchu, protože znemožňuje využívání vodních ploch. Zákaz koupání v těchto lokalitách není řešením a navíc není respektován (Horák a Kolářová 2011).

Pokusy o vývoj metod pro obranu před cercáriemi vycházely od skupiny W. Haase (Universität Erlangen – Nürnberg), která se věnovala testování orientace cercárií a schistosomul *in vitro*. Pasti na cercárie a využití mastných kyselin, které stimulují penetraci a transformaci tegumentu, a tím osmotický kolaps ve vnějším prostředí, se ukázaly jako neúčinné pro širší využití (Haas 1984, Shiff a kol. 1993). Metoda, kdy byla na podložní sklíčko aplikována směs průhledného laku na nehty a kyseliny linolové je vhodná především

pro detekci a determinaci cercárií ve vodních plochách, přičemž je nutné, aby voda byla čistá (Shiff a kol. 1993). Kyselina myristová, která způsobuje přeměnu tegumentu cercárií *S. mansoni* a snižuje jejich toleranci k vodě, by byla ideální pro kontrolu výskytu schistosomních motolic. Je účinná již v nízkých koncentracích (1-3 μM) a koncentruje se u vodní hladiny, kde se zdržují i cercárie. Navíc je netoxická pro ostatní vodní živočichy a není pravděpodobné, že by si na ní cercárie mohly vytvořit rezistenci. Nicméně její použití by bylo možné jen ve stojatých vodách (Haas 1984). Naproti tomu vývoj krému, který by bránil pronikání cercárií do těla, a tím i chránil proti dermatitidě a schistosomózám, se podařil. Nicméně tento krém cercárie neodpuzuje, ale imobilizuje je a zabíjí. Jediným problémem je sériová výroba (Wulff a kol. 2007).

3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo otestovat reakci schistosomul *T. regenti* na různé látky, které by pro ně mohly být atraktivní v časně fázi infekce definitivního hostitele, a to v podmínkách *in vitro*. S ohledem na životní cyklus tohoto parazita byly pro testování zvoleny následující látky:

- solubilní frakce nervové soustavy kachny domácí (*Anas platyrhynchos f. dom.*) v různých koncentracích
- solubilní frakce krevního séra kachny domácí (*Anas platyrhynchos f. dom.*) o různé molekulové hmotnosti
- látky, které jsou atraktivní pro schistosomuly jiných druhů:
 - L-arginin v různých koncentracích
 - D-glukóza v různých koncentracích
 - médium „Hank’s balanced salt solution a jeho jednotlivé složky
- komerčně dostupné neuromediátory.

Dalším cílem diplomové práce bylo sledovat změny receptorů na apikálním konci těla (oblast CI) cercárií a schistosomul v rané fázi infekce, pomocí různých metod značení.

4. Materiál a metodika

4.1. Udržování laboratorního životního cyklu *T. regenti*

Vzhledem k tomu, že je v naší laboratoři zaveden laboratorní životní cyklus druhu *T. regenti*, cercárie jsou k dispozici takřka nepřetržitě. Životní cyklus je udržován s využitím plžů rodu *Radix* jako mezihostitele a kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) jako definitivního hostitele. Plži jsou chováni v 50-60 litrových akváriích s vodou o teplotě 21 °C, v množství 50-60 jedinců. Krmeni jsou salátem *ad libitum*.

Miracidia se získávají pitvou nosní dutiny kachen. Tkáň nosní dutiny se vloží do Petriho misky naplněné čistou, odstátou vodou, kde se po osvětlení z tkáně uvolní miracidia. Ta se sbírají pod binokulární lupou. Pro nákazu mezihostitele se používá 32 jamková destička. Pipetou se přenese 3-5 miracidii do jamky s odstátou vodou a jedním mezihostitelským plžem. Plži jsou s miracidii ponecháni přibližně 5 hodin.

Cercárie *T. regenti* byly získávány osvětlením infikovaných plžů (v patentní periodě, 5-6 týdnů po infekci) umístěných v cca 200 ml sklenicích s odstátou vodovodní vodou. Po hodině a půl byly sbírány uvolněné cercárie.

Pro nákazu definitivního hostitele se shromažďuje cca 500-1500 cercárií. Přibližně týden stará kachňata jsou fixována tak, aby měla po dobu 30-40 minut nohy ve vodě s cercáriemi. Dospělé motolice, které se rozmnožují a produkují vajíčka, jsou v hostiteli vyvinuty cca 20 dní po infekci.

4.2. Testování chemoorientace schistosomul *in vitro*

Pokusy byly prováděny s počtem 5-35 cercárií na komůrku. Celkem bylo provedeno 221 pokusů, z toho 159 výsledků bylo reprodukovatelných. Každý pokus spočíval v přípravě 30 komůrek, 10 pro negativní kontrolu, 10 pro pozitivní kontrolu (médium „Hanks balanced salt solution“) a 10 pro testovanou látku. V rámci reprodukovatelných výsledků tedy byly hodnoceny migrace/orientace schistosomul ve 4770 W-komůrkách. S každým testovaným substrátem byl pokus prováděn třikrát.

Osmolarita roztoků byla stanovována na přístroji MARCEL OS3000. Pro dvoubodovou kalibraci byla použita destilovaná voda a 400 mOsm/l roztok NaCl. Rozmezí měření bylo tedy mezi 0-400 mOsm/l.

Měření pH roztoků probíhalo na stolním pH metru IQ 240, který má přesnost měření až 0,001 a automatickou teplotní kompenzaci pomocí mikroelektrody. Pro kalibraci byly používány komerčně vyrobené certifikované pufrы.

Nervová soustava kachny domácí pro využití při testování chemoorientace schistosomul byla získána pitvou nenakažených kachen starých 30 dní. Mozek i mícha byly po vyjmutí opláchnuty fyziologickým roztokem a uchovávány v mrazicím boxu při -80 °C.

Pro určení koncentrace vzorků nervové soustavy bylo třeba použít lyofilizaci. Nejdříve byl vzorek nervové soustavy homogenizován pomocí sonikátoru. Pak k němu bylo přidáno známé množství destilované vody a vzorek byl opět sonikován (3x10 sekund). Následně byl vzorek 10 minut centrifugován při rychlosti 1 000 g, aby se odstranily celistvé části nervové soustavy a nečistoty. Dále byl zpracováván jen supernatant. Před samotnou lyofilizací byl známý objem roztoku solubilní frakce nervové soustavy (supernatant získaný centrifugací) rozdělen do čtyř označených a předem zvážených mikrozkuvek. Následně se otevřené mikrozkuvky se vzorky částečně ponoří do tekutého dusíku a pak se co nejrychleji přemístí do nádoby, která se nasadí na kohout lyofilizátoru. Lyofilizace probíhá přes noc. Následující den se mikrozkuvky s lyofilizovanou nervovou soustavou znovu váží. Z rozdílu těchto dvou hmotností je možné vypočítat hmotnost sušiny nervové soustavy v roztoku a díky tomu, že známe objem roztoku, který jsme nechali lyofilizovat, i koncentraci. Dále se vychází roztok, ze kterého jsme vzali vzorek na lyofilizaci, ředí na koncentrace, které jsme si zvolili pro testování chemoorientace.

Pro zpracování kachního séra na frakce o různé molekulové hmotnosti byla používána krev z nenakažené kachny, 38 dní staré. Pro získání krevního séra byla krev ponechána několik minut při pokojové teplotě a pak centrifugována 10 minut při rychlosti 4 000 g. Separace séra na jednotlivé frakce o různých molekulových hmotnostech byla provedena pomocí centrifugální filtrace při použití 10, 30 a 50 kDa mikrofiltrů AmiconUltra (Millipore).

Pro analýzu kachního séra byla odebrána krev z 2 nenakažených kachen, 34 a 47 dní starých. Sražená krev byla centrifugována 10 minut při rychlosti 4 000 g. Získané sérum bylo uchováváno v mrazicím boxu při -80 °C. Analýza byla provedena v Ústavu klinické biochemie a patobiochemie 2. LF, pobočka FN Motol.

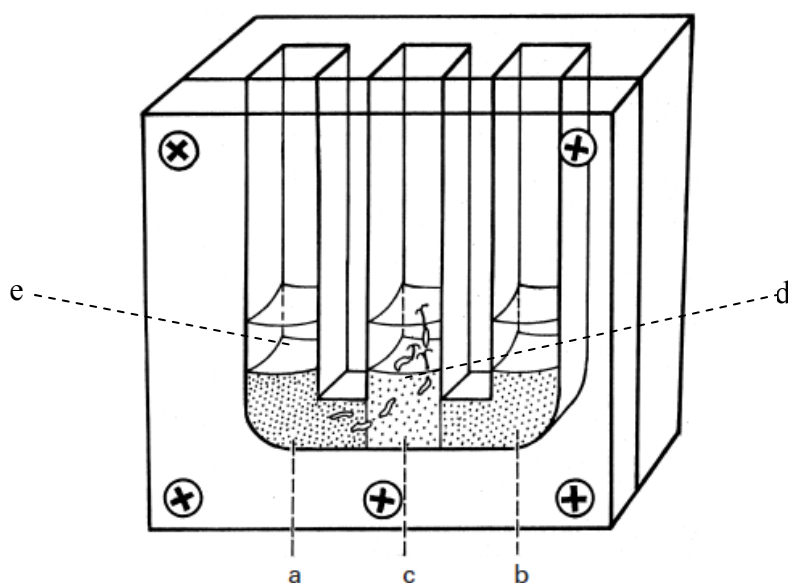
Koncentrace L-argininu a D-glukózy pro testování chemoorientace byly zvoleny podle koncentrací, které jsou atraktivní pro schistosomuly *S. mansoni* a *T. szidati* (koncentrace D-glukózy také tak, aby odpovídala koncentraci v médiu „Hank's balanced salt solution“). Koncentrace solubilních frakcí nervové soustavy byly zvoleny tak, aby bylo možné určit

počet schistosomul v různých částech komůrky, což ve vyšších koncentracích nebylo možné díky mléčnému zbarvení roztoků. Koncentrace roztoků NaCl a KCl byla zvolena tak, aby odpovídala koncentraci těchto solí v médiu „Hank’s balanced salt solution“. Dále byly zvoleny koncentrace blízké této hodnotě. Koncentrace neuromediátorů byly zvoleny podle fyziologických hodnot člověka.

4.2.1. Migrační komůrky

Komůrky, které byly používány pro sledování chemoorientace schistosomul, tak zvané W-komůrky, byly získány od výzkumného týmu W. Haase (Obr. 5). Jsou vyrobeny z plexiskla a mají rozměry 3x2 cm. V některých pokusech byla ještě používána kovová zarážka, která se umísťovala do centrální komůrky. Jejím účelem byla izolace média obsahujícího testovanou látku v boční chodbičce, dokud médium neztuhlo. Průměr chodbiček je 2x3 mm, tedy 6 mm².

Obr. 5: W-komůrka vyvinutá skupinou W. Haase; a,b - boční chodbičky s testovaným resp. neutrálním médiem, c - centrální chodbička, d - vrstva agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci, e - koncový roztok (upraveno dle Haas a kol. 2002a)



4.2.2. Složení médií a postup plnění: testování solubních frakcí nervové soustavy, D-glukózy a L-argininu (metoda č. 1)

V případě testování chemoorientace za podmínek *in vitro* je nutné cercárie stimulovat k penetraci do nabízeného média (agaru) a transformaci na schistosomuly. V tomto případě byla

použita vrstva agaru s 0,05 mM kyselinou linolovou, která stimuluje penetraci do agaru a transformaci povrchu cercárií *S. mansoni* a *T. szidati* (Haas a kol. 2002a). Zásobní 1 mM roztok, který byl uchováván v mrazicím boxu při teplotě -80°C, byl připraven tak, že se 1,5 µl 5,3 M kyseliny linolové (Sigma-Aldrich) rozpustilo v 10 µl etanolu a následně bylo postupně přidáváno 5 ml (10 x 500 µl) destilované vody zahřáté na teplotu 50 °C. Po každém kroku byl roztok sonikován. Před plněním do komůrek se tento zásobní roztok mísí s destilovanou vodou 1:10 a pak s horkým 0,5 % agarem 1:1.

Médium, kterým schistosomuly migrují, se skládá z 5 ml 0,5% agaru, 4,5 ml 0,9% Ringerova roztoku (připraveno z Ringer's tablets, Merck) a 500 µl fosfátového pufru (NaH₂PO₄ 100 mM + Na₂HPO₄ 100 mM), který se přidává postupně tak, aby výsledné médium mělo pH 7. Takto připravené médium by mělo schistosomulám simulovat vnitřní prostředí těla definitivního hostitele a také zamezit prasknutí jejich povrchové membrány v důsledku osmotického tlaku.

Testované látky byly smíseny s výše uvedeným médiem 1:1, to ovšem obsahovalo 2x koncentrovanější Ringerův roztok, aby výsledné médium obsahovalo stejnou koncentraci iontů. Takto připravené médium s testovanou látkou bylo napipetováno do jedné z bočních chodbiček W-komůrky. Druhá boční chodbička testovanou látku neobsahovala.

Na agarová média ve W-komůrce byl dále přidáván tzv. koncový roztok, který má stejnou koncentraci iontů a pH, jako média a zabraňuje vyschnutí a snižování koncentrace iontů v důsledku osmotického gradientu.

Komůrky byly mezi jednotlivými kroky plnění umístovány do ledu, aby média ztuhla. Následně byla celá W-komůrka přelepena lepicí páskou, což je další ochrana proti vyschnutí, a byla umístěna do tmy do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 1,5 hodiny.

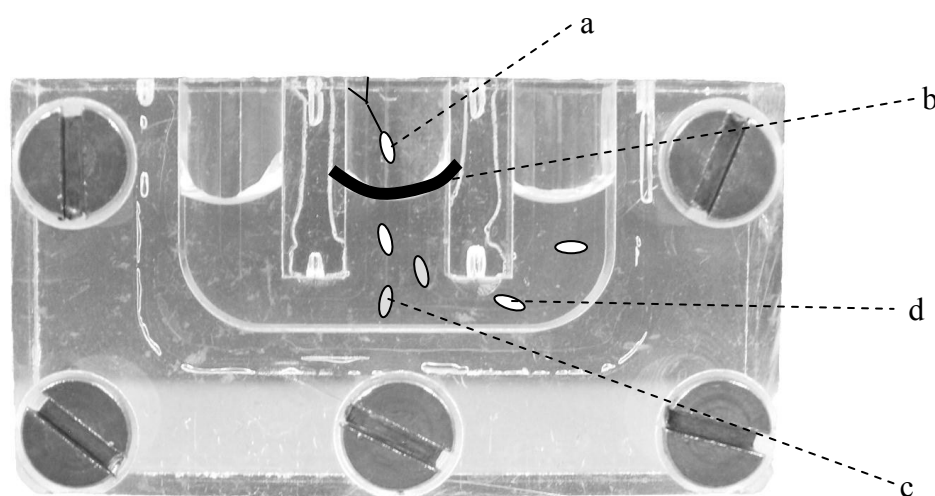
V případě negativní kontroly neobsahovala ani jedna boční chodbička testovanou látku. V případě pozitivní kontroly byl jako atraktant do jedné z bočních chodbiček použit roztok „Hank's balanced salt solution“ (Sigma-Aldrich), který byl takto využíván při testování chemoorientace *S. mansoni* a *T. regenti* (Grabe a Haas 2004a). Jeho složení je následující: NaCl 8 mg/ml; D-glukóza 1 mg/ml; KCl 0,4 mg/ml; CaCl₂ 0,13 mg/ml; MgSO₄ 0,1 mg/ml; KH₂PO₄ 0,06 mg/ml; Na₂HPO₄ 0,05 mg/ml.

Po 1,5 hodině v termostatu se komůrky umísťují před stereomikroskop upravený pro horizontální prohlížení (Obr. 6) a počítají se schistosomuly v centrální resp. bočních chodbičkách, a dále cercárie, které nepronikly vrstvou kyseliny linolové (Obr. 7).

Obr. 6: Sledování migrace schistosomul upraveným stereomikroskopem



Obr. 7: Hodnocení atraktivity média; a – aplikované cercárie, b – vrstva agaru s kyselinou linolovou, c – cercárie, které pronikly vrstvou agaru s kyselinou linolovou a přeměnily se na schistosomuly, d – schistosomuly, které vykazovaly chemoorientaci



4.2.3. Složení médií a postup plnění: testování solí, D-glukózy, L-argininu, neuromediátorů a frakcí kachního séra o různé molekulové hmotnosti (metoda č. 2)

Protože se z předchozích pokusů ukázalo, že pravděpodobnými atraktanty jsou ionty, a protože ionty pronikají agarem rychleji a rychleji se i ustanoví koncentrační gradient (Grabe a

Haas 2004a), byla zavedena pro další pokusy modifikovaná metoda. Vzhledem k tomu, že součástí médií v předchozích pokusech byl Ringerův roztok, který ionty obsahuje, byly touto metodou testovány nejen neuromediátory a jednotlivé frakce séra, ale znovu i D-glukóza a L-arginin.

Složení vrstvy stimulující penetraci zůstalo neměnné. Pro přípravu média, kterým schistosomuly migrují, byl použit pouze 0,5% agar a destilovaná voda. Pro dosažení pH 7 byl použit 10mM Tris (pH=8,2). Za těchto pozměněných podmínek byly testované látky přidávány až do koncového roztoku v jedné z bočních chodbiček, v tomto případě byl ovšem koncový roztok pouze destilovaná voda. V případě negativní kontroly neobsahovala ani jedna boční chodbička testovanou látku. V případě pozitivní kontroly byl jako atraktant do jedné z bočních chodbiček opět použit roztok „Hank’s balanced salt solution“ (Sigma-Aldrich). Další postup je stejný jako u předešlé metody.

4.2.4. Složení médií a postup plnění: testování vlivu změn osmolarity médií na migraci schistosomul (metoda č. 3)

V těchto pokusech bylo testováno, zda schistosomuly atrahuje zvolená koncentrace testovaných solí, nebo zda migrují do boční chodbičky za atraktantem jen proto, že agar ve střední chodbičce neobsahoval žádné ionty, a bylo to tedy pro ně nepřírozené (hypoosmotické) prostředí. V tomto pokuse byla s použitím zarážky střední a pravá chodbička naplněna 0,5% agarem obsahujícím NaCl o fyziologické koncentraci 152 mM a do levé 0,5% agar obsahující NaCl o koncentraci, která se jevila jako atraktivní v předešlých pokusech (205 mM). V případě negativní kontroly byly obě boční chodbičky naplněné agarem s NaCl o koncentraci 152 mM. Následně se pipetuje vrstva agaru s kyselinou linolovou, voda s cercáriemi a koncový roztok, což byl roztok NaCl o koncentraci 152 resp. 205 mM (izotonický s agarem a NaCl v komůrkách). Mezi každým krokem se, stejně jako u předchozích pokusů, nechá agar v komůrkách zatuhnout v ledové lázni. Následuje přelepení vrchní části W-komůrky lepicí páskou a inkubace ve tmě v termostatu při 37 °C, po dobu 1,5 hodiny.

4.2.5. Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci

Vliv iniciálního počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové byl testován za podmínek pokusů uvedených v kapitole 4.2.2. Všechny komůrky

byly naplněny jako negativní kontroly, obsahovaly tedy pouze směs agaru a Ringerova roztoku, na které byla vrstva agaru s kyselinou linolovou. Další postup byl identický jako v pokusech popsanych v kapitole 4.2.2.

Iniciální počty cercárií ve W-komůrce se pohybovaly od 0 do 31, počty cercárií, které pronikly vrstvou agaru a kyseliny linolové se pohybovaly od 0 do 8. Celkový počet W-komůrek (pokusů) byl 115 a celkový počet cercárií 1217.

4.2.6. Analýza atraktivní frakce kachního séra

Frakce kachního séra, která byla pro schistosomuly prokazatelně atraktivní, byla analyzována pomocí SDS-PAGE elektroforézy na komerčně připravených 10% polyakrylamidových gelech (Bio-Rad). Naneseno bylo 25 µl vzorku s 5 µl vzorkového neredukujícího pufru. Dělení probíhalo při napětí 150 V. Gely byly obarveny Coomassie Brilliant Blue R-250 a oskenovány. Pro ověření identity proteinů byly tři nejvýraznější proužky vyříznuty z gelu a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzátor, Laboratoř hmotnostní spektrometrie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta).

4.3. Sledování změn sensorických papil na apikálním konci cercárií a schistosomul

Sensorické papily byly vizualizovány a sledovány pomocí různých metod. Sledována byla pouze oblast CI (Kock a Böckeler 1998). Cercárie byly získávány z laboratorně držených infikovaných plžů. Schistosomuly byly 1,5 hodiny, 24, 48 a 72 hodin staré a byly získány experimentální nákazou definitivních hostitelů a kultivací.

Jelikož jsou papily párovými orgány, byl při udávání počtu sensorických papil zachován stávající zvyk, kdy se udává počet papil pouze na jedné straně těla (Kock a Böckeler 1998).

4.3.1. Kultivace schistosomul pro sledování sensorických papil

Příprava cercárií *T. regenti* na kultivaci probíhala následujícím způsobem (upraveno dle Chanová a kol. 2009). Cercárie byly pomocí světelného zdroje stimulovány k uvolňování z mezihostitelského plže. Uvolněné cercárie byly sbírány pomocí pipety a přemísťovány do 50 ml zkumavky, která byla uložena v ledu. Po shromáždění dostatečného počtu cercárií se zkumavka nechala v ledu minimálně 1 hodinu, dokud všechny cercárie neklesly ke dnu. Následně se sterilní Pasteurovou pipetou odsála přebytečná voda, dokud ve zkumavce nezbylo cca 5 ml vody s cercáriemi. Sterilní injekční stříkačkou s jehlou o průměru 0,6 mm

byla opakovaně nasávána a vypouštěna voda s cercáriemi, minimálně 20x. Díky tomu cercárie odhodí ocásek a jsou stimulovány k transformaci. Injekční stříkačkou byla voda s cercáriemi/schistosomulami přenesena do sterilní Petriho misky o průměru 3 cm, kam bylo přidáno cca 3 ml SCM 169 média (Schistosoma culture medium, Basch 1981). Kroužením byla tělíčka cercárií zkoncentrována ve středu misky a následně byla sterilní Pasteurovou pipetou opatrně odsáta cca polovina objemu tekutiny z okrajů misky a opět dodáno čerstvé SCM médium na původní objem. Toto bylo zopakováno 3x. Dále bylo do SCM média s cercáriemi/schistosomulami přidáno 50 µl roztoku antibiotik Pen/Strep/Amfotericin B (Lonza) a Petriho miska byla uzavřena a přelepena parafilmem. Kultivace probíhala v CO₂ inkubátoru, při 5% CO₂ a 37°C. Schistosomuly byly kultivovány 1,5 hodiny a dále 24, 48 a 72 hodin.

4.3.2. Pitva definitivních hostitelů pro získání schistosomul

Pitvy pro získání schistosomul byly prováděny 1,5 hodiny, 24, 48 a 72 hodin p.i. U kachen nakažených 1,5 hodiny a 24 hodin byla stažena kůže z nohou. Z kachen nakažených 48 a 72 hodin byla vyjmuta mícha. Nervová tkáň a vzorky kůže byly uloženy do Petriho misek s fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Následně byla nervová tkáň a kůže v Petriho miskách natrhány preparačními jehlami a osvětleny po dobu 15 minut stolní lampou, což schistosomuly stimulovalo k opuštění tkáně. Schistosomuly byly sbírány pod binokulární lupou.

4.3.3. Metody použité pro vizualizaci senzoričkových papil cercárií a schistosomul

V případě barvení dusičnanem stříbrným byl k suspenzi cercárií nebo schistosomul na hodinovém skle byl přidán stejný objem 1-5% roztoku AgNO₃. Následně byla skla přenesena do temna, kde probíhala za pokojové teploty inkubace po dobu 10-30 minut. Pak byla suspenze několikrát promyta vodovodní vodou a osvětlena stolní lampou s 20 W žárovkou po dobu 10 minut. Po přenesení na podložní sklíčko a překrytí krycím sklíčkem byly cercárie a schistosomuly pozorovány pomocí optického mikroskopu Olympus BX 51. Fotografie byly pořizovány pomocí programu QuickPHOTO MICRO.

Vzorky pro sledování senzoričkových papil cercárií a schistosomul pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly zpracovávány následujícím způsobem. Cercárie a schistosomuly získané kultivací a pitvami byly fixovány:

- 1) 8% horkým formaldehydem (ředěný destilovanou vodou)

- 2) 2,5% glutaraldehydem v pufru obsahujícím 200 mM kakodylátu sodného, 150 mM NaCl, 7 mM glukózy, 2 mM CaCl₂.

Ve fixáži byly vzorky uchovávány 12 hodin při teplotě 4 °C. Následně byly 3x promyty vodou (vzorky fixované formaldehydem) resp. příslušným pufrům (vzorky fixované glutaraldehydem), odvodněny ethanolovou řadou (50% ethanol 15 minut, 80% ethanol 15 minut, 96% ethanol 15 minut, 100% ethanol 3x 5 minut) a převedeny do acetonu (100% aceton 3x 5 minut). Vzorky v acetonu byly vloženy do kornoutku z cigaretového papírku, který byl následně na obou stranách pevně obvázan nití, a spolu s ním byly vysoušeny metodou kritického bodu v přístroji Crytical Poind Dryer CPD 030. Vysušené vzorky byly umístěny na podkladový terčík pomocí lepicí uhlíkové pásky. Terčíky se vzorky byly dále pozlaceny vrstvou 3nm v přístroji Sputter Coater SCD 050 v laboratoři elektronové mikroskopie na PřF UK. Objekty byly prohlíženy na přístroji JEOL SEM 6380 LV při urychlovacím napětí 15, 20 a 25 KV. Typy papil byly určovány dle klasifikace Podhorského (2006).

Pro morfometrickou charakterizaci byly vybrány dvě papily nacházející se u centrálních vývodů penetračních žláz, které byly nejčastěji dobře viditelné (Obr. 12). Dle klasifikace popsané Podhorským (2006) to byly papila typu VII (cilie dlouhá cca 3 μ l s tegumentálním límcem a vysokou tegumentální bází) a papila typu X (aciliární, s výrazným tegumentálním podkladem). U papily typu VII byla měřena délka papily od povrchu těla cerkárie až ke konci cilie, u papily typu X od povrchu těla po vrchol papily.

Pro sledování papil pomocí fluorescenčního značení tubulinu byly vzorky zpracovávány následujícím způsobem:

- fixace ve 4% paraformaldehydu (v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,4) po dobu 12 hodin
- 3x 20 minut v AbD (Antibody dilution buffer), složení: 0,1 M PBS, pH 7,4, 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma), 0,1% TritonTM X-100 (Sigma)
- přidání 50 μ l 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), inkubace 1 hodinu za pokojové teploty
- inkubace s primární protilátkou (Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin antibody produced in mouse, Sigma, 1:100) 1 hodinu při 5 °C
- 3x 5 minut v AbD
- inkubace se sekundární protilátkou (Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Mouse IgG, Invitrogen, 1:100), 1 hodinu za pokojové teploty
- 3x 5 minut v Abd

- zamontování na sklíčko pomocí VECTASHIELD[®] Mounting Medium (Vector Laboratories).

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo uspokojivě vizualizovat senzorké papily schistosomul, byly testovány i následující modifikace tohoto postupu:

1. fixace ve 4% paraformaldehydu, promytí v AbD, inkubace s SDS přes noc, inkubace s primární protilátkou, dále jak popsáno výše
2. fixace ve 4% paraformaldehydu, promytí v AbD, 1 h SDS, 20 minut 1% TWEEN[®] 20 (Sigma), inkubace s primární protilátkou, dále jak popsáno výše
3. fixace ve 4% paraformaldehydu, promytí v AbD, proteináza K (2 mg/ml, Sigma), znovu fixace 10 min 4% paraformaldehydem, promytí v AbD, dále jak popsáno výše.

Objekty byly pozorovány pomocí mikroskopu Olympus BX 51. Fotografie byly pořizovány pomocí programu QuickPHOTO MICRO.

4.4. Statistika

Výsledky byly zpracovávány pomocí programů Microsoft Office Excel 2007 a „R“ (R Development Core Team, Ross Ihaka a Robert Gentleman). V programu R byla data získaná sledováním chemoorientace schistosmul nejprve transformována pomocí „arcsin square root transformation“ pro získání hodnot s normálním rozdělením a následně byly střední hodnoty porovnány pomocí Tukeyho testu na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ (pokud atraktivita testované látky a atraktivita pozitivní kontroly nebyly signifikantně odlišné, označeno *).

Testování vlivu iniciálního počtu cercárií na procento cercárií, které pronikly vrstvou agaru s kyselinou linolovou, bylo prováděno pomocí korelačního testu v programu R, na hladině významnosti $\alpha = 0,01$.

5. Výsledky

5.1. Testování chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro*

Množství cercárií, které pronikly vrstvou agarů s kyselinou linolovou a přeměnily se na schistosomuly, se pohybovalo od 0 do 100 %. Množství schistosomul, které domigrovaly až do boční komůrky se stimulem (a tedy se orientovaly) se pohybovalo od 0 do 100 % počtu schistosomul, které pronikly vrstvou agarů s kyselinou linolovou.

5.1.1. Testování atraktivity solubilních frakcí nervové soustavy, D-glukózy a L-argininu pro schistosomuly *T. regenti* (metoda č. 1)

V první sérii pokusů, za podmínek popsaných v kapitole 4.2.2, byla testována reakce schistosomul *T. regenti* na solubilní frakce nervové soustavy kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), konkrétně frakce z míchy a mozku. Pro testování byly zvoleny koncentrace 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml.

Z těchto koncentrací se ukázala atraktivní, avšak statisticky neprůkazně, solubilní frakce z míchy o koncentraci 1 mg/ml. Ostatní testované koncentrace nebyly atraktivní (Tabulka 2A).

Za stejných podmínek byly testovány reakce schistosomul na L-arginin a D-glukózu v různých koncentracích (Tabulka 2B). Z koncentrací 250 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M a 0,25 μ M nebyla atraktivní žádná.

Tabulka 2: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* - testování atraktivity solubilních frakcí nervové soustavy, D-glukózy a L-argininu (metoda č. 1)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|--|-------------|--|--|
| (A) Solubilní frakce nervové soustavy kachny domácí | | | |
| mozek | 5 mg/ml | 0 | 0 |
| | 1 mg/ml | 2,5 | 1,7 |
| | 0,1 mg/ml | 0 | 0 |
| | 0,01 mg/ml | 5,3 | 2,3 |
| mícha | 5 mg/ml | 6,7 | 1,5 |
| | 1 mg/ml | 27,5 | 8,9 |
| | 0,1 mg/ml | 2,5 | 1,0 |
| | 0,01 mg/ml | 15,0 | 4,0 |
| Hank's médium ^c | | 43,5 | 21,0 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |
| (B) L-arginin a D-glukóza | | | |

| | | | |
|----------------------------|--------------|------|-----|
| D-glukóza | 250 μ M | 5,6 | 2,9 |
| | 1 μ M | 0 | 0 |
| | 0,5 μ M | 0 | 0 |
| | 0,25 μ M | 0 | 0 |
| L-arginin | 250 μ M | 7,3 | 1,5 |
| | 1 μ M | 1,4 | 0,7 |
| | 0,5 μ M | 1,9 | 0,9 |
| | 0,25 μ M | 0,9 | 0,3 |
| Hank's médium ^c | | 38,9 | 9,1 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, z těch, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^c Pozitivní kontrola.

5.1.2. Testování atraktivity složek „Hank's balanced salt solution“ média, soli v různých koncentracích, D-glukózy, L-argininu a neuromediátorů (metoda č.2)

V další sérii pokusů, za podmínek popsaných v kapitole 4.2.3, byly testovány složky média „Hank's balanced salt solution“, konkrétně chlorid sodný, chlorid draselný, D-glukóza a jejich směsy. Z testovaných kombinací byla signifikantně atraktivní pouze kombinace roztoků NaCl, KCl a D-glukózy v koncentracích identických jako v médiu „Hank's balanced salt solution“, tedy 136 mM NaCl + 5 mM KCl + 5,5 mM D-glukóza (Tabulka 3).

Tabulka 3: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity komponent média „Hank's balanced salt solution“ (metoda č. 2)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|----------------------------|-------------|--|--|
| NaCl | ≡Hank's | 0 | 0 |
| NaCl+KCl | ≡Hank's | 3,6 | 0,8 |
| NaCl+KCl+D-glukóza | ≡Hank's* | 27,9 | 4,5 |
| D-glukóza | ≡Hank's | 0 | 0 |
| Hank's médium ^c | | 21,5 | 4,3 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

*Atraktivita testované látky není signifikantně odlišná od pozitivní kontroly (Tukeyho test; $\alpha = 0,01$)

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, z těch, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^c pozitivní kontrola

Dále byly testovány roztoky NaCl a KCl v různých koncentracích. NaCl v koncentraci od 136 mM do 273 mM a KCl v koncentraci od 205 mM do 273 mM. Z nich byly pro schistosomuly signifikantně atraktivní roztoky NaCl v koncentraci 188 mM a 205 mM a roztok KCl v koncentraci 205 mM. Při testování roztoků NaCl v koncentraci 273 mM a KCl v koncentraci 273 mM, vykazovaly cercárie negativní chemoorientaci, kdy migrovaly do protilehlé boční chodbičky. Tato koncentrace měla tedy repelentní účinek (Tabulka 4).

Tabulka 4: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity NaCl a KCl o různých koncentracích (metoda č. 2)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|----------------------------|-------------|--|--|
| NaCl | 136 mM | 0 | 0 |
| | 153 mM | 0 | 0 |
| | 171 mM | 18 | 3,9 |
| | 188 mM* | 20,0 | 7,2 |
| | 205 mM* | 22,0 | 7,8 |
| | 225 mM | 0 | 0 |
| | 239 mM | 0 | 0 |
| | 256 mM | 0 | 0 |
| | 273 mM | -13,9 ^d | -4,3 ^d |
| KCl | 205 mM* | 20,0 | 4,5 |
| | 225 mM | 8,3 | 1,9 |
| | 273 mM | -18,1 ^d | -3,6 ^d |
| Hank's médium ^c | | 20,9 | 6,5 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

* Atraktivita testované látky není signifikantně odlišná od pozitivní kontroly (Tukeyho test; $\alpha = 0,01$)

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, z těch, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^c pozitivní kontrola.

^d Negativní chemoorientace (= repelentní účinek).

Při opakovaném testování některých koncentrací D-glukózy a L-argininu za modifikovaných podmínek, kdy v médiích nebyly přítomny žádné ionty (podrobná metodika viz kapitola 4.2.3), nebyla zjištěna žádná atraktivita (Tabulka 5).

Tabulka 5: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity D-glukózy a L-argininu v různých koncentracích (metoda č. 2)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|----------------------------|-------------|--|--|
| D-glukóza | 5 mM | 0 | 0 |
| | 1 μM | 0 | 0 |
| | 0,5 μM | 0 | 0 |
| | 0,25 μM | 0 | 0 |
| L-arginin | 1 mM | 0 | 0 |
| | 850 μM | 0 | 0 |
| | 250 μM | 0 | 0 |
| | 1 μM | 4,3 | 0,5 |
| | 0,5 μM | 0 | 0 |
| Hank's médium ^c | | 21,5 | 4,3 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, z počtu schistosomul, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^c pozitivní kontrola

Pro ověření, zda jsou pro schistosomuly atraktivní konkrétní soli v použité koncentraci nebo pouze osmolarita roztoku, byl testován roztok D-glukózy o osmolaritě 410 mOsm/l, což obsahem osmoticky aktivních látek v jednom litru odpovídá roztokům NaCl a KCl o koncentraci 205 mM (které byly signifikantně atraktivní). Nebyla zjištěna žádná atraktivita roztoku D-glukózy (Tabulka 7).

Tabulka 7: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity roztoků o různé osmolaritě (metoda č. 2)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|----------------------------|-------------|--|--|
| NaCl | 187 mM* | 20,0 | 7,2 |
| | 205 mM* | 22,0 | 7,8 |
| KCl | 205 mM* | 20,0 | 4,5 |
| D-glukóza | 410 mM | 0 | 0 |
| Hank's médium ^c | | 21,5 | 4,3 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

* Atraktivita testované látky není signifikantně odlišná od pozitivní kontroly (Tukeyho test; $\alpha = 0,01$)

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, z počtu schistosomul, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^cpozitivní kontrola

Dále bylo testováno několik látek, které hrají důležitou roli v procesech v nervové soustavě: serotonin, dopamin, acetylcholin, epinefrin, norepinefrin, glycin, kyselina L-glutamová, antidiuretický hormon (arginin na 8. místě v aminokyselinovém řetězci), histamin, ATP (adenosin 5-trifosfát) a GABA (kyselina γ -aminomáselná). V testovaných koncentracích, nebyla pro schistosomuly atraktivní žádná z těchto látek (Tabulka 8).

Tabulka 8: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity neuromediátorů (metoda č. 2)

| Testovaná látka (název udávaný výrobce) | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cerkárií ^b (%) |
|--|----------------|--|--|
| Serotonin hydrochloride | 90 ng/ml | 0 | 0 |
| Dopamine hydrochloride | 153 ng/l | 0 | 0 |
| Acetylcholine hydrochloride | 146 ng/l | 0 | 0 |
| (±)-Epinephrine | 10 ng/l | 0 | 0 |
| (±)-Norepinephrine | 10 ng/l | 0 | 0 |
| Glycine | 10 mg/l | 0 | 0 |
| L-Glutamic acid | | 0 | 0 |
| [Arg8] – Vasopressin acetate salt | 500 ng/l | 0 | 0 |
| Histamine | 50 ng/ml | 0 | 0 |
| Adenosine 5-triphosphate disodium salt hydrate | 500 μ g/ml | 0 | 0 |
| γ -Aminobutyric acid | 103 μ g/ml | 0 | 0 |
| Hank's médium ^c | | 18,7 | 4,6 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze těch, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cerkárií aplikovaných do komůrky.

^cpozitivní kontrola.

Při testování reakce schistosomul na koncentrované kachní sérum se ukázalo, že sérum je pro schistosomuly signifikantně atraktivní, dokonce ještě více, než pozitivní kontrola, médium „Hank's balanced salt solution“. Proto bylo sérum dále využíváno jako pozitivní kontrola. Z testovaných frakcí kachního séra o různé molekulové hmotnosti (0-3 kDa, 3-10 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa, více než 50 kDa) byly signifikantně atraktivní frakce 10-30 kDa

a 30-50 kDa. V atraktivitě měla séru nejbližší frakce 10-30 kDa. Proto byla dále testována atraktivita apolipoproteinu A-I (komerčně dostupný lidský apolipoprotein A-I, Sigma), který svou velikostí této frakci odpovídal. Z testovaných koncentrací byla atraktivní koncentrace 1 mg/ml (Tabulka 6).

Tabulka 6: Chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* – testování atraktivity kachního krevního séra, jeho frakcí o různých molekulových hmotnostech a apolipoproteinu A-I v různých koncentracích (metoda č. 2)

| Testovaná látka | Koncentrace | Chemoorientace z celkového počtu schistosomul ^a (%) | Chemoorientace z celkového počtu cercárií ^b (%) |
|---------------------------|---------------|--|--|
| frakce séra 0-3 kDa | | 20 | 9,9 |
| frakce séra 3-10 kDa | | 1,1 | 0,4 |
| frakce séra 10-30 kDa* | | 62,5 | 23,6 |
| frakce séra 30-50 kDa* | | 49,6 | 17,1 |
| apolipoprotein A-I | 1 mg/ml* | 65,2 | 20,8 |
| | 0,5 mg/ml | 22,6 | 14,5 |
| | 0,1 mg/ml | 21,6 | 14,3 |
| | 0,01 mg/ml | 15,4 | 11,5 |
| | 0,001 mg/ml | 0 | 0 |
| | 0,0001 mg/ml | 0 | 0 |
| | 0,0005 mg/ml | 0 | 0 |
| kachní sérum ^c | koncentrované | 67,6 | 22,8 |
| Negativní kontrola | | 0 | 0 |
| Hank's médium | | 20,3 | 4,2 |

* Atraktivita testované látky není signifikantně odlišná od pozitivní kontroly (Tukeyho test; $\alpha = 0,01$)

^a Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze těch, které pronikly vrstvou kyseliny linolové.

^b Procento schistosomul, které vykazovaly chemoorientaci, ze všech cercárií aplikovaných do komůrky.

^c pozitivní kontrola.

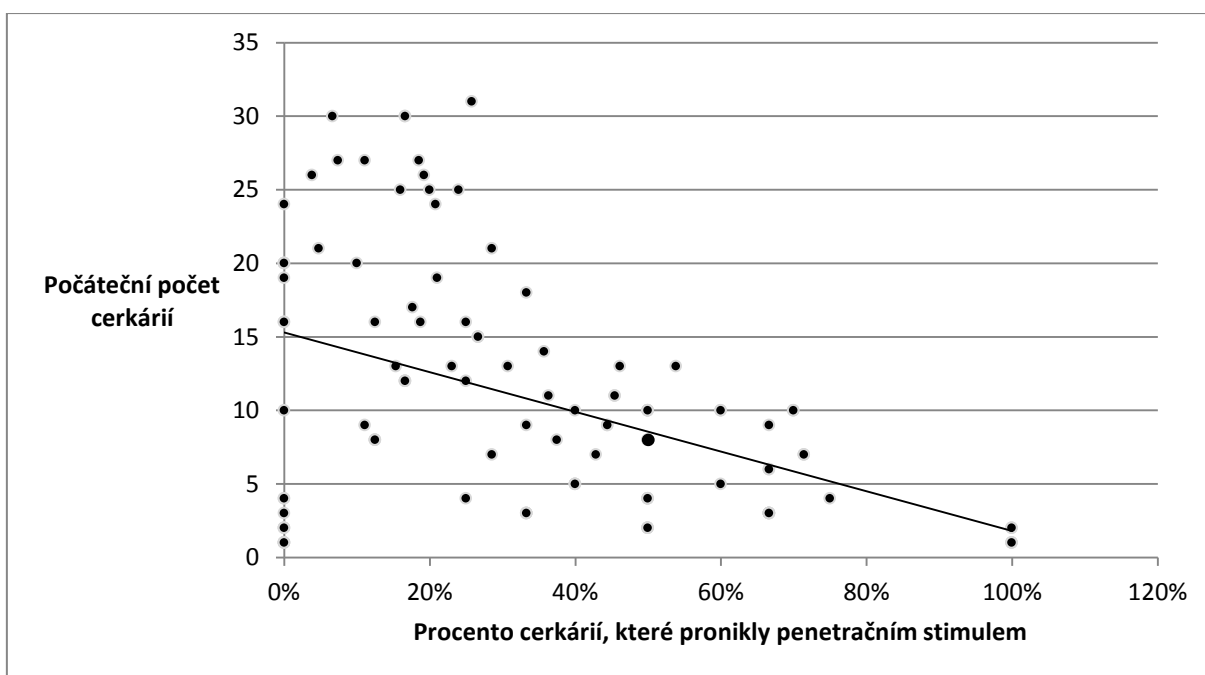
5.1.3. Testování vlivu změn osmolarity médií na migraci schistosomul (metoda č. 3)

Výsledky ukázaly, že schistosomuly nezůstávaly v médiu ve středu migrační komůrky, kde byla koncentrace NaCl 153 mM, tedy koncentrace izotonická s krevním sérem, ale migrovaly do média s NaCl o koncentraci 203 mM. Atraktivita NaCl o koncentraci 205 mM byla v těchto pokusech srovnatelná, jako v pokusech přechozích (21,1 resp. 7,1 %).

5.1.4. Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agarů a kyseliny linolové stimující penetraci

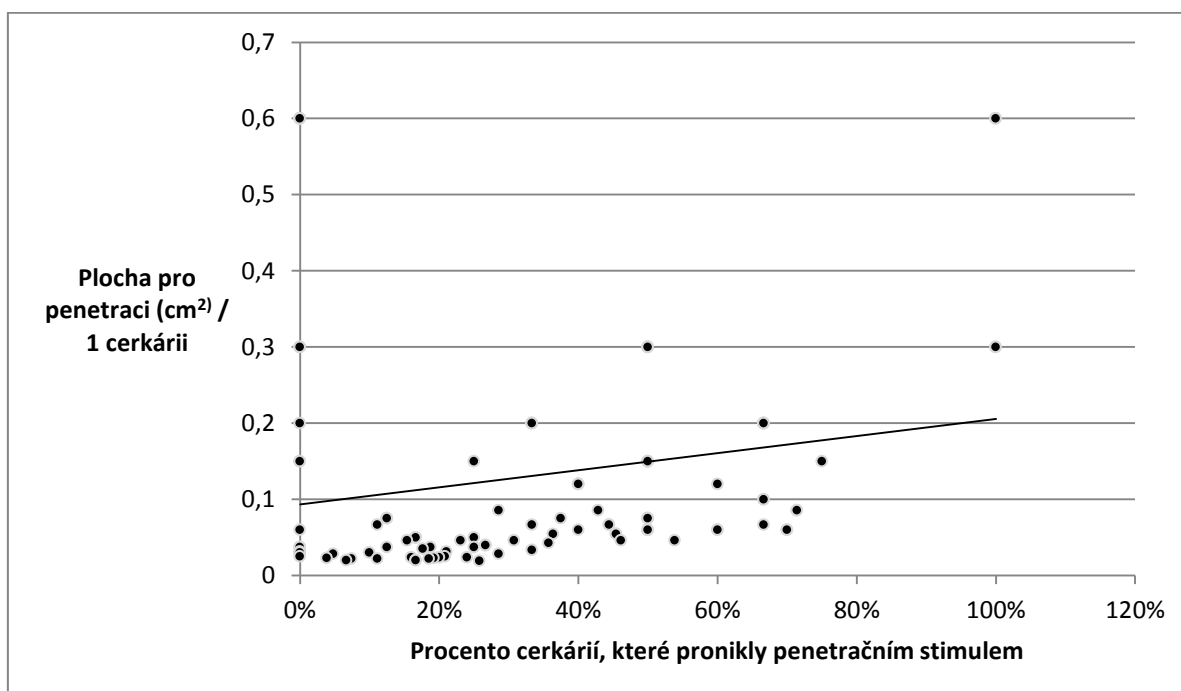
Pokusy s různými iniciálními počty cercárií vykazaly negativní korelaci mezi počátečním počtem cercárií ve W-komůrce a procentem cercárií, které penetrovaly vrstvu agarů s kyselinou linolovou (program R, korelační test, $\alpha = 0,01$). Závislost je znázorněna pomocí grafu 1.

Graf 1: Závislost procenta cercárií, které penetrovaly vrstvu agarů s kyselinou linolovou na iniciálním počtu cercárií umístěných do migrační komůrky, $\alpha = 0,01$, korelační test



Při znázornění vztahu úspěšnosti penetrace cercárií a velikosti plochy, do které mohly penetrovat je zřejmé, že mezi nimi existuje pozitivní korelace (program R, korelační test, $\alpha = 0,01$) (Graf 2). Z grafu 2 je také zřejmé, že úspěšnosti penetrace vyšší než 60 % bylo dosahováno při velikosti plochy 0,06 – 0,6 cm² na 1 cercárii. To v našem případě odpovídalo počtu 1 – 10 cercárií na komůrku.

Graf 2: Závislost procenta cercárií, které penetrovaly vrstvu agaru s kyselinou linolovou na velikosti plochy, do které jim bylo umožněno penetrovat, $\alpha = 0,01$, korelační test



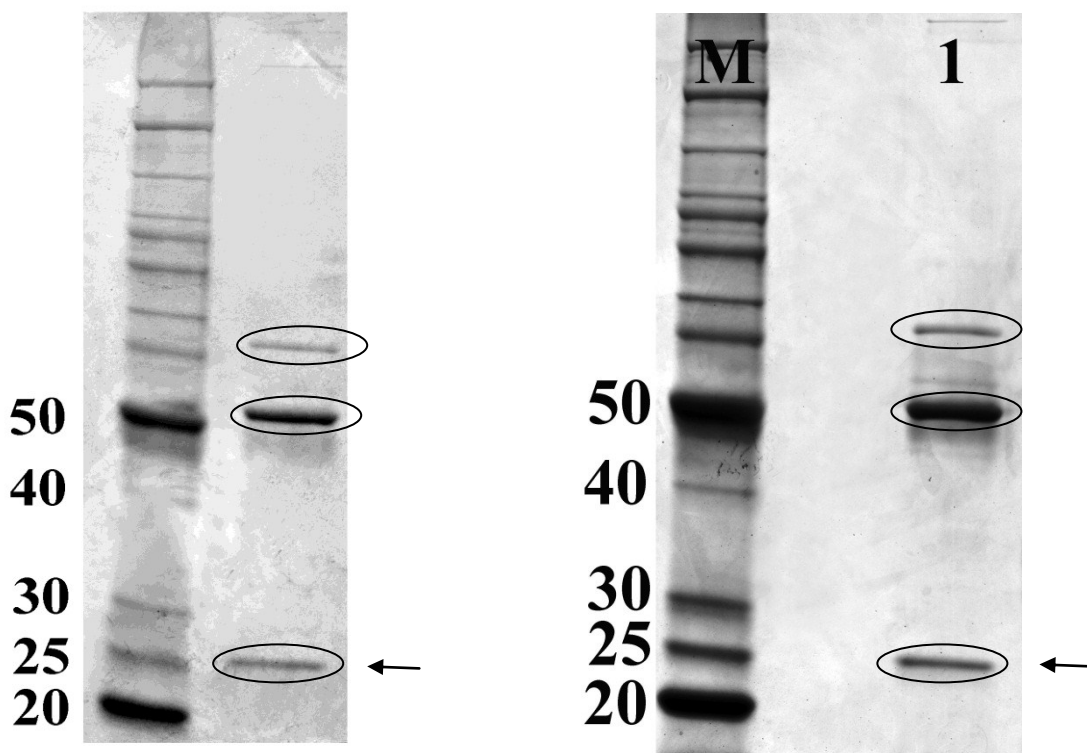
5.2. Analýza kachního séra

Elektroforéza 10-30 kDa frakce kachního séra, která byla pro schistosomuly téměř stejně atraktivní, jako sérum samotné, ukázala opakovaně stejný výsledek (Obr. 8), a to tři výrazné proužky v oblastech přibližně 26, 52 a 60 kDa.

Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovala protein o velikosti přibližně 26 kDa, jako kachní apolipoprotein A-I (Příloha 1). Proteiny o velikosti přibližně 52 a 60 kDa se nepodařilo analyzovat, protože vzorky byly málo koncentrované, a tak nemohl být změřen dostatečný počet trypsinových štěpů pro identifikaci.

Analýzou kachního séra provedenou v Ústavu klinické biochemie a patobiochemie byly získány následující hodnoty. V krevním séru kachny 34 dní staré byla změřena koncentrace glukózy 10,07 mmol/l a koncentrace chloridových iontů 108,6 mmol/l. V krevním séru kachny 47 dní staré byla glukóza v koncentraci 12,24 mmol/l a chloridové ionty v koncentraci 132,1 mmol/l. Koncentraci apolipoproteinu A-I se nepodařilo změřit.

Obr. 8: Výsledek opakované SDS-PAGE elektroforézy 10-30 kDa frakce kachního séra, v kroužku proužky, které byly analyzovány, šipkou označen identifikovaný apolipoprotein AI



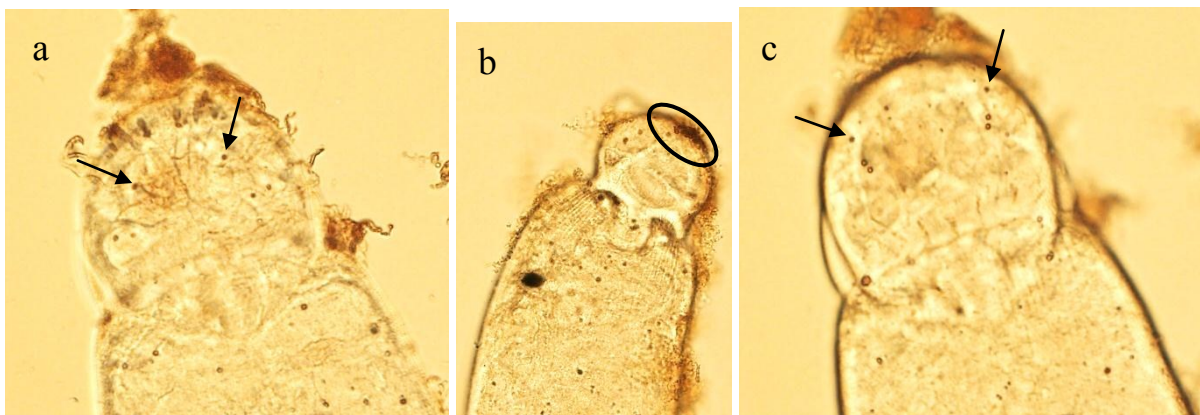
5.3. Sledování změn receptorů na apikálním konci těla cercárií a schistosomul

5.3.1. Barvení dusičnanem stříbrným

Při vizualizaci senzorických papil cercárií pomocí barvení dusičnanem stříbrným byla u cercárií v oblasti CI viditelná jedna papila na dorzální straně a jedna papila na ventrální straně (Obr. 9). Z laterálního pohledu nebylo možné počet papil v této oblasti určit.

Senzorické papily schistosomul se obarvit nepodařilo. To platilo pro schistosomuly, které byly získané kultivací i pitvou.

Obr. 9: Senzorické papily na apikálním konci cercárií *T. regenti* vizualizované stříbřením; a ventrální pohled, b laterální pohled, c dorzální pohled; šipkami označeny senzorické papily v oblasti CI, v kroužku tyto papily z laterálního pohledu.

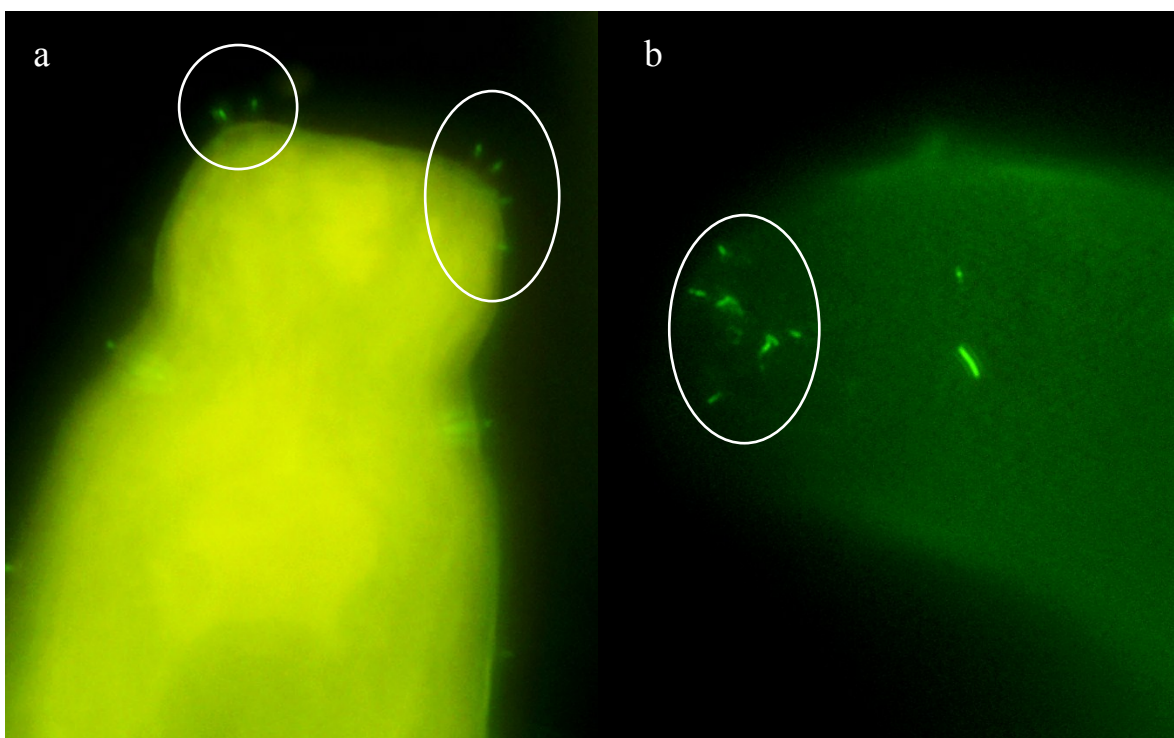


5.3.2. Fluorescenční značení tubulinu

Při použití této metody byly v oblasti CI viditelné papily kolem ústí penetračních žláz cercárií, ovšem jejich typ, přesný počet ani délka se určit nedaly (Obr. 10).

Senzorické papily schistosomul (získaných kultivací a pitvou) se touto metodou vizualizovat nepodařilo.

Obr. 10: Senzorické papily na apikálním konci cercárií *T. regenti* (v kroužku) vizualizované fluorescenčním značením tubulinu; a dorzální pohled, b laterální pohled.



5.3.3. Sledování sensorických papil pomocí SEM

Při použití skenovací elektronové mikroskopie byly sensorické papily cercárií i schistosomul v oblasti CI dobře viditelné, ovšem jen u vzorků fixovaných horkým formaldehydem. Larvy fixované směsí glutaraldehydu a kakovylátového pufru (doplňené glukózou a ionty – viz kapitola 4.3.3) měly apikální konec zanořený. Z dorzálního pohledu nebyla viditelná žádná papila. Z ventrálního pohledu byla viditelná jedna papila. Tato papila byla určena jako papila typu IV (aciliální papila se zřaseným tegumentálním lemlem). Z laterálního pohledu bylo viditelných 10 papil různé morfologie: 7 papil typu VII (cilie dlouhá cca 3 μm s tegumentálním límcem a vysokou tegumentální bazí), 2 papily typu VIII (multiciliární papila, až 6 cilií cca 3 μm) a 1 papila typu X (aciliární, s výrazným tegumentálním podkladem) (Obr. 12). Tyto papily se při transformaci na schistosomuly ani se stářím schistosomul neměnily, pouze se zvětšovala jejich velikost. Ze dvou měřených sensorických papil na apikálním konci těla (Obr. 11) se vzhledem k délce těla zvětšovala velikost pouze papily typu VII. Délka této papily rostla od 1,8 μm u cercárií ke 2,5 μm u schistosomul 72 hodin starých získaných pitvou, resp. 2 μm u kultivovaných schistosomul 72 hodiny starých. Výsledky měření papil typu VII a X jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8.

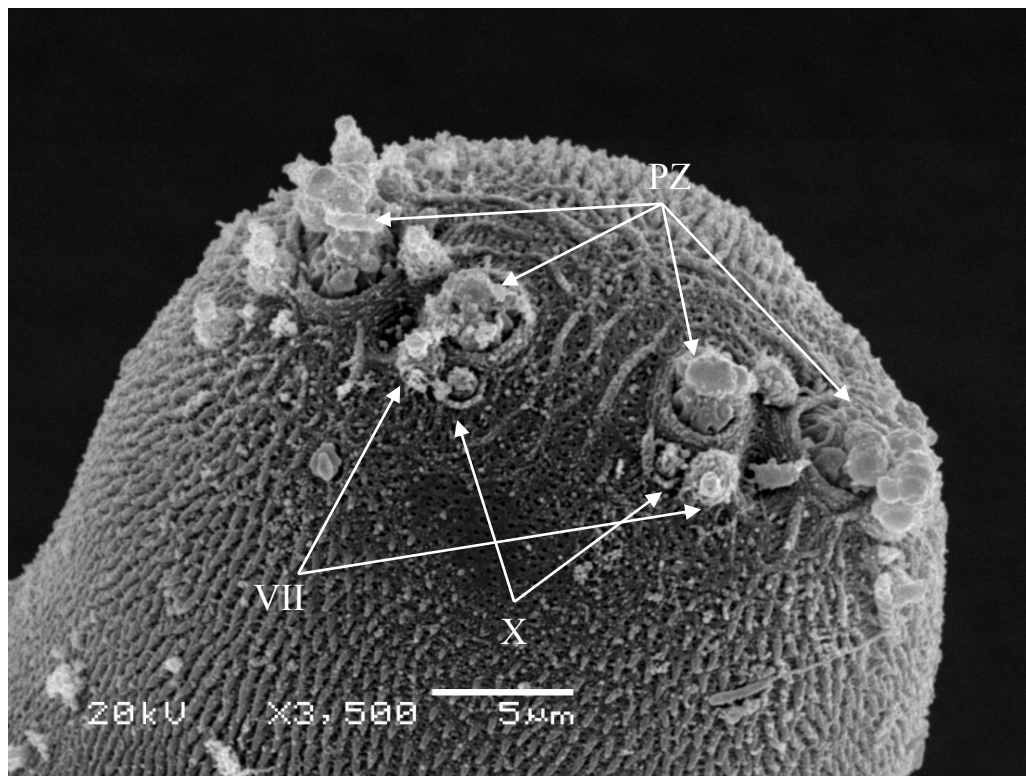
Tabulka 7: Výsledky měření papil typu VII

| Stáří jedince | Délka papily (pitva/kultivované) | SD (pitva/kultivované) | Rozměr papily:délka těla (pitva/kultivované) |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|
| cercárie (n=35) | 1,8 μm | 0,4 | 0,007 |
| schistosomuly 1,5 h (n=23/25) | 2,2/1,9 μm | 0,22/0,19 | 0,009/0,011 |
| schistosomuly 24 h (n=22/31) | 2,14/2 μm | 0,17/0,21 | 0,011/0,009 |
| schistosomuly 48 h (n=33/39) | 3,2/2 μm | 0,19/0,2 | 0,013/0,010 |
| schistosomuly 72 h (n=17/25) | 2,5/2 μm | 0,5/0,2 | 0,013/0,012 |

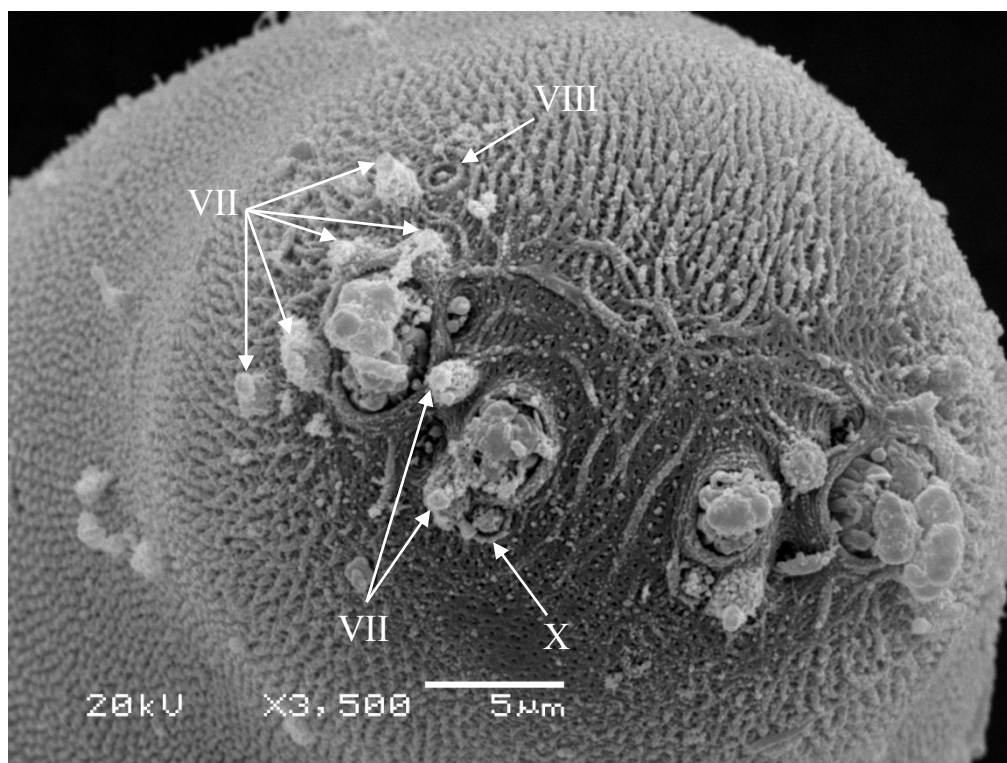
Tabulka 8: Výsledky měření papil typu X

| Stáří jedince | Délka papily (pitva/kultivované) | SD (pitva/kultivované) | Rozměr papily:délka těla (pitva/kultivované) |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|
| Cercárie (n=35) | 0,7 μm | 0,14 | 0,0030 |
| schistosomuly 1,5 h (n=23/25) | 0,2/0,2 μm | 0,03/0,02 | 0,0009/0,0012 |
| schistosomuly 24 h (n=22/31) | 0,14/0,12 μm | 0,02/0,05 | 0,0007/0,0006 |
| schistosomuly 48 h (n=33/39) | 0,27/0,25 μm | 0,03/0,02 | 0,0011/0,0013 |
| schistosomuly 72 h (n=17/25) | 0,2/0,17 μm | 0,06/0,03 | 0,0009/0,0009 |

Obr. 11: Apikální konec cercárie *T. regenti* (SEM); šipkou označeny papily typu VII a X, jejichž délka byla sledována, PZ – vývody penetračních žláz.



Obr. 12: Apikální konec cercárie s označením papil v oblasti CI zde viditelných



6. Diskuze

6.1. Chemoorientace schistosomul *T. regenti*

Při testování chemoorientace schistosomul *T. regenti* byly jako první testovány L-arginin a D-glukóza, protože se očekávalo, že schistosomuly *T. regenti* budou atrahovány stejnými nebo podobnými látkami, jako schistosomuly druhů *S. mansoni* a *T. szidati* (Grabe a Haas 2004), což jsou velmi blízké druhy z čeledi Schistosomatidae. Schistosomuly těchto dvou druhů se orientují podle L-argininu (v koncentraci kolem 0,02 a 0,25 μM u *T. szidati*, *S. mansoni* byla atrahována širokým spektrem koncentrací především kolem 1, 10 a 1000 μM) a D- glukózy (v koncentraci 1 μM u *T. szidati* a kolem 10 a 100 μM u *S. mansoni*). Testovány tedy byly koncentrace 250 μM , 1 μM , 0,5 μM a 0,25 μM . V těchto koncentracích nebyl pro schistosomuly *T. regenti* atraktivní ani L-arginin, ani D-glukóza.

Důvod, proč schistosomuly *T. regenti* nereagují na L-arginin, by mohl být vysvětlen neobvyklou migrační cestou tělem definitivního hostitele. Schistosomuly druhu *T. regenti*, na rozdíl od příbuzných druhů ze skupiny Schistosomatidae, po penetraci do pokožky definitivního hostitele nepronikají do cév, ale vyhledávají periferní nervy, kterými se dostávají do míchy (Hrádková a Horák 2002). Protože koncentrace L-argininu je vyšší v krvi, než jeho koncentrace na povrchu pokožky (Grabe a Haas 2004b), může být významným signálem při vyhledávání krevních cév. Proto by schopnost reagovat na různé koncentrace L-argininu byla pro schistosomuly *T. regenti* irelevantní.

Zdá se, že schistosomuly *T. regenti* se při migraci tělem definitivního hostitele orientují podle iontů, stejně jako diplostomuly druhu *D. spathaceum*. Larvy tohoto parazita reagovaly na NaCl a KCl v koncentraci 225 mM (atraktivní komponentou byly chloridové ionty) a na D-glukózu v koncentraci 1 a 5 mM (Haas a kol. 2007). Schistosomuly *T. regenti* v našich pokusech chemotakticky reagovaly na roztoky NaCl v koncentraci 188 mM a 205 mM a roztok KCl v koncentraci 205 mM, přičemž roztoky NaCl a KCl v koncentraci 273 mM byly pro schistosomuly repelentní. D-glukóza byla pro schistosomuly *T. regenti* atraktivní v koncentraci 5 mM, ovšem jen pokud byla ve směsi s chloridovými ionty. Larvy *T. regenti* a *D. spathaceum* tedy reagují na stejnou koncentraci D-glukózy (*T. regenti* jen když je D-glukóza ve směsi s ionty), ale liší se v tom, na jaké koncentrace NaCl a KCl reagují. Důvodem, proč se schistosomuly *T. regenti* orientují podobně jako diplostomuly *D. spathaceum* by mohlo být to, že larvy obou těchto druhů po proniknutí do hostitele migrují kranálně. Diplostomuly do oka svého definitivního hostitele (ryby) a schistosomuly do nosní

dutiny ptáků. Z námi získaných hodnot vyplývá, že koncentrace glukózy v krvi kachen je 10,07 resp. 12,24 mM, je to tedy koncentrace vyšší, než na kterou reagují schistosomuly *T. regenti*. Nicméně koncentrace glukózy v podkoží a v periferních nervech kachen může být daleko nižší. I schistosomuly *T. szidati* odpovídaly nejlépe na takové koncentrace atraktivních látek, které byly mnohem nižší než obvyklé koncentrace v ptačím séru (Grabe a Haas 2004a).

Schistosomuly *T. regenti* reagovaly stejnou měrou na roztoky NaCl a KCl o stejné osmolaritě, nahrazení sodných iontů draselnými tedy na orientaci nemělo vliv. Z toho bylo odvozeno, že atraktivní komponentou byly chloridové ionty (Tabulka 2C). Na druhou stranu koncentrace D-glukózy osmoticky odpovídající atraktivním roztokům NaCl a KCl (410 mOsm/l) pro schistosomuly atraktivní nebyla. Pro schistosomuly tedy pravděpodobně nejsou rozhodující hodnoty osmolarity, ale koncentrace určitých iontů. Další otázkou bylo, zda je pro schistosomuly atraktivní určitá koncentrace iontů, nebo migrovaly do média s ionty jen proto, že médium ve střední chodbičce neobsahovalo žádné ionty, a bylo to tedy pro ně nepřírozené prostředí. Nicméně při pokusu, kdy výchozí koncentrace NaCl v médiu byla 153 mM, tedy koncentrace izotonická s krevním sérem, se ukázalo, že i v těchto podmínkách schistosomuly migrují do média s vyšší koncentrací iontů, která je lákala v předchozích pokusech (205 mM).

To, že schistosomuly *T. regenti* reagují na chloridové ionty, na rozdíl od schistotomul příbuzných druhů *S. mansoni* a *T. szidati*, je překvapivé zjištění a domníváme se, že to také souvisí s neobvyklou migrační cestou (nervovou soustavou) schistosomul do místa své definitivní lokalizace (Horák a kol. 1998). Koncentrace chloridových iontů v mozkomíšním moku je totiž vyšší než v krevní plasmě (Amtorp a Sorensen 1974).

Roztoky NaCl a KCl o koncentraci 188 mM a 205 mM a objemu 1 l obsahují stejnou koncentraci chloridových iontů (188 mM a 205 mM). Těmto hodnotám odpovídá zjištěná koncentrace chloridových iontů v kachním séru (108 mM u kachny staré 34 dnů a 132,1 mM u kachny staré 47 dnů). Tato koncentrace je nižší, než zjištěná atraktivní koncentrace, ovšem je pravda, že při testování krevního séra schistosomuly domigrovaly až do média s testovaným sérem, zatímco při testování solných roztoků schistosomuly, které se orientovaly, nedomigrovaly až do média s roztokem, ale zůstávaly v médiu blíže střední chodbičce. Zde mohla být koncentrace iontů nižší a pro ně ideální (viz níže).

Jak bylo řečeno výše, velmi dobré výsledky byly získány při testování kombinace NaCl, KCl a D-glukózy, a to ve stejných koncentracích jako v médiu „Hank's balanced salt solution“ (NaCl=136 mM, KCl=5 mM, D-glukóza=5,5 mM). Nicméně D-glukóza samotná, ani kombinace NaCl a KCl (bez D-glukózy) nepůsobily u schistosomul tak výraznou odezvu.

To by mohlo ukazovat na přítomnost dvou chemoreceptorů na těle schistosomul – jednoho pro chloridové ionty a druhého pro D-glukózu, které vyžadují určitou kooperaci. Je možné, že receptor pro D-glukózu začne být funkční až poté, co schistosomulum dostane signál pomocí receptoru na chloridové ionty, a teprve tím pokračuje migrace. Něco podobného se vyskytuje například v průběhu imunitních reakcí. Aby se B-lymfocyty začaly množit a přeměnily se na plasmatické buňky, které produkují protilátky, je třeba, aby přijaly dva signály: prvním je navázání antigenu BCR receptorem a druhým vazba Th2 buňky (Schimpl 1983).

D-glukóza je klíčovou látkou při transformaci cercárií ve schistosomuly (Skelly a Shoemaker 2000). Autoři popsali, že počet cercárií *S. mansoni* transformovaných ve schistosomuly se zvýšil, pokud byly v médiu přítomny ionty i D-glukóza. Ovšem existuje i teorie, že pro úspěšnou transformaci cercárií *S. mansoni* ve schistosomuly stačí jen zvýšení salinity roztoku (Samuelson a Stein 1989). Konkrétně, že pro transformaci cercárií ve schistosomuly stačí přemístění cercárií z říční vody (18 mOsm) do roztoku 300 mOsm PBS obsahujícího 140 mM NaCl. Počet cercárií, které se transformovaly ve schistosomuly, byl při tomto postupu dokonce vyšší, než při přemístění cercárií z říční vody do 300 mOsm média RPMI, které obsahuje i D-glukózu. Funkce D-glukózy při transformaci cercárií na schistosomuly je tedy diskutabilní.

Roztoky solí a kombinace solí a D-glukózy byly sice pro schistosomuly *T. regenti* v určitých koncentracích signifikantně atraktivní (vzhledem k atraktivitě pozitivní kontroly, média „Hank’s balanced salt solution“), nicméně jejich atraktivita zdaleka nedosahovala takových hodnot, jako při testování krevního séra kachny domácí. To může znamenat, že kromě chloridových iontů a D-glukózy existuje ještě jiný atraktant, na který schistosomuly reagují. Dle našich výsledků je to apolipoprotein A-I, a to v koncentraci 1 mg/ml. Tento protein se vyskytuje jak v krevním séru, tak v mozkomíšním moku. U lidí se jeho koncentrace pohybuje kolem 1 mg/ml v séru a 0,004 mg/ml v mozkomíšním moku (Koch a kol. 2001). Schistosomuly *T. regenti* tedy reagují na takovou koncentraci apolipoproteinu A-I, jaká se přirozeně vyskytuje v krevním séru člověka. Jeho hodnotu v krevním séru kachny se nám, nepodařilo změřit. Také schistosomuly *S. mansoni* reagují i na jiné látky, než jsou D-glukóza a L-arginin. Jsou to fibronectin a bradykinin, které se vyskytují v krevní plasmě. Diplostomuly *D. spathaceum* reagují, kromě chloridových iontů a D-glukózy, také na melatonin, D-manózu a maltotriózu.

Oproti očekávání nebyly solubilní frakce nervové soustavy buď vůbec atraktivní, nebo byla atraktivita statisticky neprůkazná. Pravděpodobným vysvětlením bude to, že díky

velkému zředění (vysvětlení kapitola 6.4) byly koncentrace chloridových iontů a apolipoproteinu A-I velmi nízké, a proto na tyto koncentrace schistosomuly nereagovaly. Je velmi pravděpodobné, že neředěný roztok solubilních frakcí nervové soustavy by mohl být pro schistosomuly atraktivní.

Komerčně dostupné neuromediátory nebyly v testovaných koncentracích atraktivní. Nicméně použité koncentrace byly zvoleny podle fyziologických hodnot člověka.

Atraktivita pozitivní kontroly, média „Hank’s balanced salt solution“, se pohybovala od cca 20 % až k hodnotě kolem 40 %. Vysoká atraktivita tohoto média, a zároveň zvýšená atraktivita D-glukózy a L-argininu v prvních pokusech oproti pokusům provedeným později, by mohla být vysvětlena odlišnou metodikou pokusů. Při prvním testování D-glukózy a L-argininu (metoda č. 1, viz kapitola 4.2.2) byly totiž ve všech používaných médiích přítomny i chloridové ionty, které by mohly být za zvýšenou atraktivitu zodpovědné. Do všech médií (i do neutrálního média) se totiž kromě testovaných látek přidával i Ringerův roztok, který v používaných koncentracích 1,8 a 0,9 % obsahoval 306 mM resp. 153 mM roztok NaCl, po zředění dalšími komponenty média 76,5 mM roztok NaCl.

Při testování atraktivity solí obsahovalo médium ve W-komůrkách pouze agar připravený pomocí destilované vody. Neobsahoval žádné ionty, a tedy to bylo prostředí pro schistosomuly hypoosmotické. Nicméně schistosomuly v médiu úspěšně přežívaly i po 1,5 hodině inkubace v termostatu, migrovaly, a nebylo na nich znatelné žádné poškození. Agar tedy pravděpodobně zamezuje pronikání vody do těla schistosomul a zabraňuje osmotickému kolapsu. Při testování atraktivity iontů i jiných nízkomolekulárních látek je zde dále otázka, jaká je skutečná koncentrace v těch částech W-komůrky, kde se cercárie s testovanými látkami setkávají a začínají se orientovat. Je známo, že látky s molekulovou hmotností menší než 3 kDa difundují v 0,25 % agaru do vzdálenosti 7-8 mm za hodinu, látky s molekulovou hmotností větší než 3 kDa do vzdálenosti 0,5-1,5 mm za hodinu (Grabe a Haas 2004a). Vzdálenost mezi vrstvou agaru s kyselinou linolovou a okrajem média s testovanou látkou se pohybovala podle typu pokusu od 7 do 12 mm. Jelikož všechny testované látky (kromě solubilních frakcí nervové soustavy a krevního séra) měly $M_r < 3\text{kDa}$, po 1,5 hodině dosahoval jejich gradient až k schistosomulám. Ovšem přesnou koncentraci v jednotlivých částech komůrky nejsme schopni určit.

6.2. Vliv počtu cercárií na jejich schopnost proniknout vrstvou agaru a kyseliny linolové stimulující penetraci

Je známo, že se zvyšujícím se počtem cercárií *S. mansoni* na plochu se zvyšuje procento těch, které penetrují lidskou pokožku (Griffiths 1953, cit. dle Ingram a kol. 2003). Vysvětluje se to tím, že cercárie/schistosomuly zanechávají v pokožce cestičky, kterými je můžou následovat další, což zvyšuje procento cercárií, které proniknou do pokožky, i rychlost, s jakou se to děje. Jelikož penetrační žlázy cercárií *S. mansoni* obsahují L-arginin, který je pro schistosomuly *S. mansoni* prokazatelně atraktivní, obsah penetračních žláz může vést další schistosomuly rychleji do pokožky (Granzer a Haas 1986). Látky atrahující příslušníky stejného druhu, v odborné terminologii feromony, se mezi parazity vyskytují často. Například klíšťa rozeznávají několik druhů těchto látek. První kategorie jsou shromažďovací feromony, které volně žijící klíšťa vylučují, aby se nahromadila v jedné oblasti v prostředí. Druhá kategorie jsou feromony, které jsou vylučovány zejména samicí při sání. Ty atrahují samce přímo na určitá místa na hostiteli, tedy k samicí. Třetí kategorií jsou feromony, které usnadňují páření (Anderson, 2008).

Výsledky této diplomové práce ovšem vykazují negativní korelaci mezi iniciálním počtem cercárií ve W-komůrce a procentem cercárií, které pronikly vrstvou agaru a kyseliny linolové (Graf 1). Může to být tím, že agar nemá stejné mechanické vlastnosti jako lidská pokožka. V agaru pravděpodobně nezůstávají po schistosomulách žádné chodbičky. Navíc se nezjistilo, že by byly schistosomuly *T. regenti* L-argininem atrahovány. Ingram a kol. (2003) dospěli k tomu, že počet cercárií *S. mansoni*, které proniknou do pokožky, nemá žádný vliv na rychlost pronikání dalších. Stále tedy zůstává sporné, zda má rozdílný počet cercárií na plochu vliv na jejich penetraci. Je možné, že každý druh používá odlišnou strategii.

6.3. Sledování změn receptorů na apikálním konci těla cercárií a schistosomul

Při pronikání do těla definitivního hostitele a orientaci v jeho těle v raných fázích infekce se pravděpodobně nejvíce uplatňují sensorické papily na apikálním konci těla cercárií schistosomul (King a Higashi 1992). Proto byly tyto papily vizualizovány a sledovány pomocí různých metod.

Při barvení sensorických papil pomocí dusičnanu stříbrného byla v oblasti CI viditelná 1 papila na dorzální straně a 1 papila na ventrální straně. To odpovídá dříve publikovaným pracím (Horák a kol. 1998, Podhorský a kol. 2009). Ovšem díky velkému nahloučení papil na apikálním konci a také díky tomu, že se touto metodou barví i produkty penetračních žláz

cerkárií, nebylo možné určit přesný počet papil z laterálního pohledu (Obr. 9b). Tento problém by mohl být řešen důkladnějším promytím cercárií před barvením. Papily schistosomul se touto metodou obarvit nepodařilo, pravděpodobně díky tomu, že po transformaci jejich povrchu se dusičnan stříbrný už na papily neváže. Je velmi pravděpodobné, že se na povrchu schistosomul *T. regenti* po transformaci vytváří zdvojená sedmivrstevná membrána, stejně jako u schistosomul *T. szidati* (Horák a kol. 1998b). Ta může znemožňovat navázání solí stříbra na senzoričké papily schistosomul.

Fluorescenční značení tubulinu ukázalo na apikálním konci cercárií několik papil, ovšem jejich přesný počet, typ a rozložení nebylo možné určit. Nebyla zde jistota, že jsou zobrazeny všechny papily na apikálním konci a díky nerovnoměrnému záření různých částí papil nebylo možné prokazatelně určit jejich délku ani tvar. Senzorické papily různě starých schistosomul se touto metodou zviditelnit nepodařilo, a to ani při různých modifikacích metody. Pravděpodobným vysvětlením je stejně jako u předešlé metody změna vnější membrány schistosomul.

Skenovací elektronová mikroskopie odhalila na apikálním konci cercárií a schistosomul 10 dobře viditelných papil, sedm papil typu VII, dvě papily typu VIII a jednu papilu typu X. To odpovídá výsledkům diplomové práce Podhorského (2006). Tyto papily byly viditelné jen u vzorků fixovaných horkým formaldehydem. Vzorky fixované druhým způsobem měly apikální konec zanořený. Zda to bylo díky osmotickému kolapsu těl schistosomul, kdy byly v průběhu fixace a dalšího zpracování vystaveny hypo- nebo hypertonickým roztokům, nebo zda to byl počátek tvorby ústní přísavky, zůstává otázkou. Nicméně pufr, se kterým byl mísen glutaraldehyd, byl navržen právě tak, aby složením a osmolaritou co nejvíce odpovídal vnitřním podmínkám těla hostitele resp. kultivačnímu médiu.

Délka senzoričkových papil se u schistosomul se stářím zvětšovala, a to jak u kultivovaných, tak u těch, které byly získané pitvou definitivního hostitele. Délka papil u kultivovaných schistosomul byla menší, než u schistosomul z hostitele. Nicméně schistosomuly získané kultivací byly celkově menších rozměrů než larvy získané pitvou. To by pravděpodobně mohlo být tím, že postup kultivace a složení médií nebyly ještě dostatečně optimalizovány. Délka papily vzhledem k délce těla se zvětšovala pouze u papily typu VII. To by mohlo ukazovat na důležitou funkci této papily při orientaci v těle definitivního hostitele. Dle popisu Podhorského (2006) měla být cilie této papily u cercárií přibližně 3 μm dlouhá. Výsledky našeho měření celé papily se pohybovaly od 1,4 do 2,2 μm . Na délku papily ovšem

mohla mít vliv teplota, při které jsou chováni infikovaní plži, stejně jako je tomu u délky těla cercárií (Dönges 1964). Plži v naší laboratoři jsou chováni ve vodě o teplotě 21 °C.

6.4. Problémy metodických přístupů

V průběhu pokusů bylo zaznamenáno velké množství neplatných výsledků. Z více než 200 pokusů bylo úspěšných 159. Úspěšnost pokusů se tedy pohybovala kolem 70 %. Důvodem bylo malé, nebo nulové množství schistosomul, které pronikly vrstvou agarů s kyselinou linolovou v komůrkách s pozitivní kontrolou. Tento problém byl připisován rychlé oxidaci kyseliny linolové na vzduchu. Nicméně ani používání čerstvě dodané kyseliny, ani uchovávání připravené 0,1 mM kyseliny linolové při teplotě -80 °C tento problém nevyřešilo. Protože byla používána taková koncentrace kyseliny linolové, která prokazatelně stimuluje penetraci a transformaci cercárií *S. mansoni* (Grabe a Haas 2004), je možné, že cercárie *T. regenti* reagují na odlišné koncentrace. Hledání takových koncentrací by vyžadovalo další studie.

I když podmínky pokusů byly identické, množství schistosomul, které domigrovaly až do boční komůrky se stimulem, a tedy se orientovaly, se mezi jednotlivými W-komůrkami lišilo, a to i mezi W-komůrkami se stejnou testovanou látkou. Důvod nebyl zjištěn, ovšem podle ústní informace W. Haase se toto stávalo i při testování chemoorientace u druhů *T. szidati*, *S. mansoni* a *D. spathaceum*. Možným vysvětlením by mohlo být to, že cercárie byly získávány osvětlením cca 15 infikovaných plžů umístěných v cca 200 ml sklenicích s odstátou vodovodní vodou. Mezi populacemi cercárií z jednotlivých plžů mohly být rozdíly ve schopnosti chemoorientace. Rozdíly v „chování“ mezi jednotlivými populacemi byly pozorovány u cercárií druhu *S. mansoni*. Dvě populace tohoto druhu z Guadeloupe, jedna izolovaná z vajíček z lidského trusu a druhá z vajíček z trusu krysy, vykazovaly rozdíly mezi dobou, kdy se uvolňovaly ze svého mezihostitelského plže, což zřejmě souviselo s adaptací na chování svých definitivních hostitelů. Lidský kmen opouštěl svého mezihostitele kolem 11 hodiny v poledne, kdy je nejvyšší pravděpodobnost, že se bude ve vodě vyskytovat člověk a kmen z krysy až za šera, kolem 16 hodiny (Théron 1984).

Časté bylo také to, že se cercárie při plnění dostaly do bočních komůrek nestandardní cestou, tedy mezi vrstvou agarů a stěnou W-komůrky. Také bylo třeba dávat pozor na to, které cercárie/schistosomuly migrují agarem a které jsou mezi agarem a stěnou W-komůrky, a tedy nemigrují standardně.

Jak bylo popsáno výše, nebylo možné testovat vyšší koncentrace solubilních složek nervové soustavy. Vzhledem k tomu, že počítání schistosomul v jednotlivých částech W-komůrky bylo závislé na jejich rozeznatelnosti pozorovatelem, znemožňovalo mléčné zbarvení vzorků o vyšší koncentraci zhodnocení atraktivity látky. Navíc v pokusech byl použit je směsný vzorek solubilních frakcí nervové soustavy. Je tedy možné, že při testování atraktivity jednotlivých frakcí nervové soustavy by mohla být odezva schistosomul vyšší.

Z výše uvedených důvodů je studování chemoorientace larev motolic v podmínkách *in vitro* problematické. Všechny dosud získané poznatky o chemoorientaci motolic uvnitř hostitele se týkaly stadií, která se v přirozených podmínkách vyskytují ve tkáni nebo v cévách pokožky definitivního hostitele. V dalších studiích se bude třeba věnovat tomu, jak a podle čeho se larvy orientují v dalších fázích vývoje (infekce).

7. Závěr

V této práci byla testována chemoorientace schistosomul *T. regenti in vitro* při využití cercárií z laboratorního cyklu. Testovány byly frakce nervové soustavy kachny domácí v různých koncentracích, frakce kachního krevního séra o různé molekulové hmotnosti, vybrané soli, D-glukóza, L-arginin, komerčně dostupné neuromediátory a apolipoprotein A-I. Celkem bylo provedeno přes 200 pokusů, z toho bylo 159 pokusů (4770 hodnocených W-komůrek) úspěšných, a to s následujícími hlavními výsledky.

- Nejvyšší atraktivitu vykazovalo neředěné krevní sérum kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*).
- Stejně vysokou atraktivitu vykazovala frakce kachního séra o velikosti 10-30 kDa.
- Jako hlavní atraktant byl prokázán apolipoprotein A-I, a to v koncentraci 1 mg/ml.
- Roztoky NaCl v koncentraci 188 mM a 205 mM a roztok KCl v koncentraci 205 mM byly pro schistosomuly signifikantně atraktivní. Vzhledem k tomu, že roztoky NaCl a KCl o stejné osmolaritě byly obdobně atraktivní, a roztok D-glukózy o osmolaritě 410 mOsm/l atraktivní nebyl, domníváme se, že stimulem pro migraci jsou chloridové ionty.
- Signifikantně atraktivní byla i kombinace NaCl, KCl a D-glukózy v koncentraci identické s pozitivní kontrolou, médiem "Hank's balanced salt solution", a tedy v koncentraci 136 mM NaCl + 5 mM KCl + 5,5 mM D-glukóza.
- Ostatní testované látky, tedy L-arginin, D-glukóza, NaCl a KCl v jiných koncentracích, kombinace NaCl a KCl, neuromediátory a solubilní frakce nervové soustavy nebyly v testovaných koncentracích signifikantně atraktivní.
- Pokusy s různými iniciálními počty cercárií prokázaly negativní korelaci počátečního počtu cercárií a procenta cercárií, které úspěšně penetrovaly vrstvu agarů s kyselinou linolovou, přičemž úspěšnosti penetrace vyšší než 60 % bylo dosaženo při aplikaci 1-10 cercárií na komůrku.

Sledovali jsme i distribuci a morfologii sensorických papil na apikálním konci těla cercárií a schistosomul. Z našich výsledků vyplynulo následující.

- Ideální metoda pro sledování sensorických papil na apikálním konci těla cercárií a schistosomul je skenovací elektronová mikroskopie. Touto metodou bylo v oblasti CI na těle cercárií a schistosomul popsáno 10 papil, sedm papil typu VII, dvě papily typu VIII a jedna papila typu X.

- U cercárií a schistosomul 1,5-72 hodin starých byly měřeny dvě z těchto papil. Z měření vyplynulo, že pouze u papily typu VII se délka papily vzhledem k délce těla zvětšuje, roste tedy rychleji než tělo.

Z výsledků plyne, že látky, na které reagují schistosomuly druhu *T. regenti* v prvních fázích po proniknutí do hostitele (1,5 hodiny po penetraci), jsou odlišné od těch, na které reagují jim příbuzné druhy z čeledi Schistosomatidae. Schopnost orientovat se podle apolipoproteinu A-I nebyla prozatím objevena u žádného jiného druhu motolic. Chemoorientace schistosomul *T. regenti* se částečně podobá chemoorientaci diplostomul druhu *D. spathaceum*, které se také orientují podle chloridových iontů a D-glukózy.

8. Použitá literatura

Alicata J. E. (1962): Life Cycle and Developmental Stages of *Philophthalmus gralli* in the Intermediate and Final Hosts. *The Journal of Parasitology* 48: 47-54.

Amtorp O., Sorensen S.C. (1974): The ontogenetic development of concentration differences for protein and ions between plasma and cerebrospinal fluid in rabbits and rats. *The Journal of Physiology* 243: 387-400.

Anderson J. F., Magnarelli L. A. (2008): Biology of Ticks. *Infection Disease Clinics of North America* 22: 195-215.

Austin F. G., Stirewalt M. A., Danzinger R. E. (1972): *Schistosoma mansoni*: stimulatory effect of rat skin lipid fractions on cercarial penetration behavior. *Experimental Parasitology* 31: 217-224.

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

Betterton C. (1974): Studies on the host specificity of the eyefluke, *Diplostomum spathaceum*, in brown and rainbow trout. *Parasitology* 69: 11-29.

Bogéa T. (2004): Functional and phylogenetic components in cercarial nervous systems. *Folia Parasitologica (Praha)* 51:311-319.

Brachs S., Haas W. (2008): Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. *Parasitology Research* 102: 685-690.

Clegg J. A. (1969): Skin penetration by cercariae of the bird schistosome *Austroilharzia terrigalensis*: the stimulatory effect of cholesterol. *Parasitology* 59: 973-989.

Cunningham D. D., Young D. F. (2003): Measurements of glucose on the skin surface, in stratum corneum and in transcutaneous extracts: Implications for physiological sampling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41: 1224-1228.

- Davis D. J. (1936): Pathological Studies on the Penetration of the Cercaria of the Strigeid Trematode, *Diplostomum flexicaudum*. The Journal of Parasitology 22: 329-337.
- Dönges J. (1964): *Gigantobilharzia suebica* n. sp. (Trematoda), ein dermatitiserreger beim menschen. Zeitschrift für Parasitenkunde 24: 65-75.
- Dorsey C. H., Cousin C. E., Lewis F. A., Stirewalt M. A. (2002): Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. Micron 33: 279-323.
- Evans N. A., Gordon D. M. (1983): Experimental studies on the transmission dynamics of the cercariae of *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea: Echinostomatidae). Parasitology 87: 167-174.*
- Faust E. C. (1918): Eye-spots in Digenea. Biological Bullentin 35: 117-127.
- Feiler W., Haas W. (1988a): Host-finding in *Trichobilharzia ocellata* cercariae: swimming and attachment to the host. Parasitology 96: 493-505.
- Feiler W., Haas W. (1988b): *Trichobilharzia ocellata*: chemical stimuli of duck skin for cercarial attachment. Parasitology 96: 507-517.
- Fried B., Patricia L. P., Reddy A. (1997): Experimental infection of *Rana pipiens* tadpoles with *Echinostoma trivolvis* cercariae. 3:666-669.
- Grabe K., Haas W. (2004a): Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. International Journal for Parasitology 34: 927-934.
- Grabe K., Haas W. (2004b): Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. Parasitology Research 93: 111-113.

Granzer M., Haas W. (1986): The chemical stimuli of human skin surface for the attachment response of *Schistosoma mansoni* cercariae. International Journal for Parasitology 16: 575-579.

Granzer M., Haas W. (1991): Host finding and host recognition of infective *Ancylostoma caninum* larvae. International Journal for Parasitology 21: 429-440.

Griffiths R. B (1953): Further observations on the penetration of mammalian skin by the cercariae of *Schistosoma mansoni*, with special reference to the effect of mass invasion. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 47: 86-94.*

Haas W. (1974a): Analyse der Invasionmechanismen der Cercariae von *Diplostomum spathaceum*. I. Fixation und Penetration. International Journal for Parasitology 4: 311-319.

Haas W. (1974b): Analyse der Invasionmechanismen der Cercariae von *Diplostomum spathaceum*. II. Chemische Invasionsstimuli. International Journal for Parasitology 4: 321-330.

Haas W. (1975): Einfluss von CO₂ und pH auf das Fixationsverhalten der Cercariae von *Diplostomum spathaceum* (Trematoda). Zeitschrift für Parasitenkunde 46: 53-60.

Haas W. (1976): Die Anheftung (Fixation) der Cercariae von *Schistosoma mansoni*. Einfluss natürlicher Substrate und der Temperatur. Zeitschrift für Parasitenkunde 49: 63-72.

Haas W. (1984): *Schistosoma mansoni*: Cercaricidal Effect of 2-Tetradecenoic Acid, a Penetration Stimulant. Experimental Parasitology 58: 215-222.

Haas W. (1992): Physiological analysis of cercarial behavior. Journal of Parasitology 78: 243-255.

Haas W. (1994): Physiological analyses of host-finding behaviour in trematode cercariae: adaptations for transmission success. Parasitology 109: 15-29.

- Haas W. (2001): Host finding mechanisms. In: Encyclopedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function. Edited by H. Melhorn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg new York.
- Haas W. (2003): Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology* 106: 349-364.
- Haas W., Grabe K., Geis C., Päch T., Stoll K., Fuchs M., Haberl B., Loy C. (2002a): Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. *Parasitology* 124: 153-167.
- Haas W., Granzer M., Brockelman C. (1990a): Finding and recognition of the bovine host by the cercariae of *Schistosoma spindale*. *Parasitology Research* 76: 343-350.
- Haas W., Granzer M., Brockelman C. (1990b): *Opisthorchis viverrini*: finding and recognition of the fish host by the cercariae. *Experimental Parasitology* 71: 422-431.
- Haas W., Granzer M., Garcia E. G. (1987): Host identification by *Schistosoma japonicum* cercariae. *The Journal of Parasitology* 73: 568-577.
- Haas W., Haberl B. (1997):. Edited by B. Fried, T. K. Graczyk. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 197-227.
- Haas W., Haberl B., Hofmann M., Kerschensteiner S., Ketzner U. (1999): Ichthyophthirius multifiliis invasive stages find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. *European journal of protistology* 35: 129-135.
- Haas W., Haberl B., Kalbe M., Körner M. (1995a): Snail-host finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. *Parasitology Today* 11: 468-472.
- Haas W., Haberl B., Schmalfuss G., Khayyal M. T. (1994): *Schistosoma haematobium* cercarial host-finding and host-recognition differs from that of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 80: 345-353.

- Haas W., Haeberlein S. (2009): Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. Parasitology Research 105: 1061-1066.
- Haas W., Haeberlein S., Behring S., Zoppelli E. (2008): *Schistosoma mansoni*: Human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. Experimental Parasitology 120: 94-97.
- Haas W., Körner M., Hutterer E., Wegner M., Haberl B. (1995b): Finding and recognition of the snail intermediate hosts by 3 species of echinostome cercariae. Parasitology 110: 133-142.
- Haas W., Ostrowski de Nuñez M. (1988): Chemical signals of fish skin for the attachment response of *Acanthostomum brauni* cercariae. Parasitology Research 74: 552-557.
- Haas W., Schmitt R. (1982a): Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. I. Effective substances, host specificity. Zeitschrift für Parasitenkunde 66: 293-307.
- Haas W., Schmitt R. (1982b): Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. II. Conditions and mode of action. Zeitschrift für Parasitenkunde 66: 309-319.
- Haas W., Stiegeler P., Keating A., Kullmann B., Rabenau H., Schönamsgruber E., Haberl B. (2002b): *Diplostomum spathaceum* cercariae respond to a unique profile of cues during recognition of their fish host. International Journal for Parasitology 32: 1145-1154.
- Haas W., van de Roemer A. (1998): Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. Parasitology Research 84: 787-795.
- Haas W., Wulff C., Grabe K., Meyer V., Haeberlein S. (2007): Navigation within host tissues: cues for orientation of *Diplostomum spathaceum* (Trematoda) in fish towards veins, head and eye. Parasitology 134: 1013-1023.

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

Haberl B., Körner M., Spengler Y., Hertel J., Kalbe M., Haas W. (2000): Host-finding in *Echinostoma caproni*: Miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* 120: 479-486.

Haeberlein S., Haas W. (2008): Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology Research* 102: 657-662.

Harrison D. G. (1997): Perspective series: nitric oxide and nitric oxide synthase: cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2153-2157.

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

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

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

Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998a): *Trichobilharzia regenti* n.sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5: 349-357.

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

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

Cheng T. C., Cooperman J. S. (1964): Studies on Host-Parasite Relationships between Larval Trematodes and Their Hosts. V. The Invasion of the Reproductive System of *Helisoma trivolvis* by the Sporocysts and Cercariae of *Glythelmins pennsylvaniensis*. Transactions of the American Microscopical Society 83: 12-23.

Ingram R. J., Bartlett A., Brown M. B., Marriott C., Whitfield P. J. (2003): Penetration of human skin by the cercariae of *Schistosoma mansoni*: an investigation of the effect of multiple cercarial applications. Journal of Helminthology 77: 27-31.

Kannagi R. (2002): Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. Current Opinion in Structural Biology 12:599-608.

Khoo K. H. (2001): Structural variations in schistosomal glycans. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13: 493-506.

King C. L., Higashi G. I. (1992): *Schistosoma mansoni*: Silver ion (Ag⁺) stimulates and reversibly inhibits lipid-induced cercarial penetration. Experimental Parasitology 75: 31-39.

Koch S., Donarski N., Goetze K., Kreckel M., Stuerenburg H. J., Buhmann C., Beisiegel U. (2001): Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. Journal of Lipid Research 42: 1143-1151.

Kock S., Böckeler W. (1998): Observations on cercarial chaetotaxy as a means for the identification of European species of *Trichobilharzia* Skrjabin & Zakharow, 1920 (Digenea: Schistosomatidae). Systematic Parasitology 43: 159-166.

Körner M., Haas W. (1998a): Chemo-orientation of echinostome cercariae towards their snail hosts: amino acids signal a low host-specificity. International Journal for Parasitology 28: 511-516.

Körner M., Haas W. (1998b): Chemo-orientation of echinostome cercariae towards their snail hosts: the stimulating structure of amino acids and other attractants. International Journal for Parasitology 28: 517-525.

Loy C., Motzel W., Haas W. (2001): Photo- and geo-orientation by echinostome cercariae results in habitat selection. *The Journal of Parasitology* 87: 505-509.

Motzel W., Haas W. (1985): Studies on the attachment response of *Isthmiophora melis* cercariae (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research* 71: 519-526.

Nevhotalu P. A., Salafsky B., Haas W., Conway T. (1993): *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata*: comparison of secreted cercarial eicosanoids. *Journal of Parasitology* 79: 130-133.

Ostrowski de Nuñez M., Haas W. (1991): Penetration of stimuli of fish skin for *Acanthostomum brauni* cercariae. *Parasitology* 102: 101-104.

Pearce E. J. (1993): Schistosomiasis. Proselytizing with immunity. *Nature* 363:19-20.

Podhorský M. (2006): Taxonomie a morfologie larválních stadií ptačích schistosom. Diplomová práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK, Katedra parazitologie.

Podhorský M., Hružová Z., Mikeš L., Horák P. (2009): Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp. *Acta Parasitologica* 54: 28-36.

Richard J. (1971): La chétotaxie des cercaires. Valeur systématique et phylétique. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Nouvelle série. Série A, Zoologie* 67: 1-179.

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

Samuelson J. C., Stein L. D. (1989): *Schistosoma mansoni*: Increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. *Experimental Parasitology* 69: 23-29.

- Senshu T., Akiyama K., Kan S., Asaga H., Ishigami A., Manabe M. (1995): Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *The Journal of Investigative Dermatology* 105:163-169.
- Senshu T., Kan S., Ogawa H., Manabe M., Asaga H. (1996): Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225:712-719.
- Shakarbaev E., Haberl B., Loy C., Haas W. (2001): Recognition of cattle skin by cercariae of *Orientobilharzia turkestanica*. *Parasitology Research* 87: 705-707.
- Schimpl A. (1983): Signals in B lymphocyte proliferation and differentiation. *Annales d'immunologie* 134: 143-53.
- Shiff C. J. (1969): Influence of light and depth on location of *Bulinus (Physopsis) globosus* by miracidia of *Schistosoma haematobium*. *The Journal of parasitology* 55: 108-110.
- Shiff C. J., Cmelik H. W., Ley H. E., Kriel R. L. (1972): The Influence of Human Skin Lipids on the Cercarial Penetration Responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 58: 476-480.
- Shiff C. J., Chandiwana S. K., Graczyk T., Chibatamoto P., Bradley M. (1993): A Trap for the Detection of Schistosome Cercariae. *The Journal of Parasitology* 79: 149-154.
- Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., Shaw L. (1995): Biochemistry and role of sialic acids. In: *Biology of the Sialic Acids*. Edited by A. Rosenberg. Plenum Press, New York, pp. 7-67.
- Sopott-Ehlers B., Haas W., Ehlers U. (2003): Ultrastructure of pigmented and unpigmented photoreceptors in cercariae of *Trichobilharzia ocellata* (Plathelminthes, Trematoda, Schistosomatidae): evidence for the evolution of parasitism in Neodermata. *Parasitology Research* 91: 109-116.

- Skelly P. J., Shoemaker C. B. (2000): Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. *International Journal for Parasitology* 30: 625-631.
- Sukhdeo M. V. K. a Sukhdeo S. C. (2004): Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. *Canadian journal of zoology* 82: 292-315.
- Théron A. (1984): Early and Late Shedding Patterns of *Schistosoma mansoni* Cercariae: Ecological Significance in Transmission to Human and Murine Hosts. *The Journal of Parasitology* 70: 652-655.
- van de Roemer A., Haas W. (1984): Fine structure of a lens-covered photoreceptor in the cercaria of *Trichobilharzia ocellata*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 70: 391-394.
- Wang C.R., Li L., Ni H.B., Zhai Y.Q., Chen A.H., Chen J., Zhu X.Q. (2009): *Orientobilharzia turkestanicum* is a member of *Schistosoma* genus based on phylogenetic analysis using ribosomal DNA sequences. *Experimental Parasitology* 121: 193-197.
- White S. K., Secombes C. J., Chappell L. H. (1991): Studies on the infectivity of *Diplostomum spathaceum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Helminthology* 65: 169-178.
- Wilson R. A. (1987): Cercariae to liver worms: development and migration in the mammalian host. In: *The Biology of Schistosomes. From Genes to Latrines*. Edited by D. Rollinson, A. J. G. Simpson. Academic Press, London, pp. 115-146.
- Wulff C., Haeberlein S., Haas W. (2007): Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitology Research* 101: 91-97.
- Xia M. Y., Jourdane J. (1991): Penetration and migration routes of *Schistosoma japonicum* miracidia in the snail *Oncomelania hupensis*. *Parasitology* 103: 77-83.

Zibulewsky J., Fried B., Bacha W. J. (1982): Skin Surface Lipids of the Domestic Chicken, and Neutral Lipid Standards as Stimuli for the Penetration Response of *Austrobilharzia variglandis* Cercariae. The Journal of Parasitology 68: 905-908.

*sekundární citace

Příloha 1: Výsledek analýzy 26 kDa proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie

Protein View

Match to: **gi|546158** Score: **84** Expect: **0.016**
apolipoprotein A-1, apo A-1 [Beijing ducks, blood, Peptide, 246 aa]

Nominal mass (M_r): **28726**; Calculated pI value: **5.45**

NCBI BLAST search of [gi|546158](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Anas platyrhynchos](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **83**

Number of mass values matched: **27**

Sequence Coverage: **72%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 RYFWQHDEPQ APLDRLRDLV DVYLETVKAS GKDAIAQFEA SAVGQLDLK
51 LADNLDTLGA AAKLREDMA PYYKEVREMW LKDTESLRAE LTKDLEEVKE
101 KIRPFLDQFS AKWTEELEQY RQRLAPVAQE LKELTKQKVE LMQQKLTPVA
151 EEARDRLRGH VEELRKNLAP YSDELRQKLS QKLEEIREKG IPQAAEYQAK
201 VVEQLSNLRE KMTPLVQDFK ERLTPYAENL KTRFISLLDE LQKTVA
```