



Středoškolská technika 2016

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

**ROLE OXIDU DUSNATÉHO (NO) V REGULACI
MIGRACE PTAČÍ MOTOLICE *TRICHOBILHARZIA
SZIDATI* (SCHISTOSOMATIDAE) V NÁHODNÉM SAVČÍM
HOSTITELI**

Václav Ryšlink

Gymnázium Kladno

Nám. E. Beneše 1573, Kladno

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma „Role oxidu dusnatého (NO) v regulaci migrace ptačí motolice *Trichobilharzia szidati* (Schistosomatidae) v náhodném savčím hostiteli“ jsem vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Tomáše Macháčka a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Provedené experimenty byly součástí pilotní studie projektu „Úloha oxidu dusnatého při infekci obratlovčích hostitelů viscerotropními a neurotropními druhy ptačích schistosom“ financovaného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt číslo 729516).

V Kladně dne 15. 05. 2016

Podpis:



Poděkování

Největší poděkování patří bezesporu mému školiteli Mgr. Tomáši Macháčkovi nejenom za jeho cenné rady, ale především za velikou trpělivost a obrovské množství času a úsilí, které mi věnoval. Dále bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D., který mi umožnil celou tuto práci vypracovat. Mé poděkování patří i všem členům helmintologického týmu, kteří mi v celém průběhu byli vždy ochotní pomoci či zodpovědět sebemenší dotaz.

Na uskutečnění této práce se také důležitým způsobem podílelo vedení Gymnázia Kladna, z něhož bych chtěl především poděkovat paní ředitelce RNDr. Mileně Minaříkové a třídní profesorce Ing. Vladimíře Englišové, které mi dopomohly s vyřízením veškerých náležitostí spojených s absolvováním této stáže. Mé velké díky patří i paní profesorce Mgr. Jaroslavě Klíbaniové, která mi na samém počátku dodala odhodlání započít s tímto projektem a na konci i dopomohla s úpravou předkládaného textu.

V neposlední řadě nesmím zapomenout ani na svou rodinu, která mě za všech okolností nesmírně podporovala a díky níž jsem celou tuto práci byl schopen úspěšně dokončit.

Anotace

Cerkárie ptačích motolic dokáží pronikat nejen do vodního ptactva, ale i do savčích hostitelů, včetně člověka. Přestože se v nich nedokáží rozmnožit, vyvolávají u nich alergickou kožní vyrážku, označovanou jako cercáriová dermatitida. V současnosti ohlášených případů cercáriové dermatitidy u nás, ale i v celé Evropě stále přibývá, a tak je nutné původce tohoto onemocnění detailněji prozkoumat. Z tohoto důvodu se v předkládané práci zabývám vlivem oxidu dusnatého (NO) na regulaci migrace larválních stádií ptačí motolice *Trichobilharzia szidati* v náhodném savčím hostiteli (laboratorní myš).

Vliv NO na regulaci migrace larválních stádií *T. szidati* jsem zkoumal s využitím aminoguanidinu (AMG), selektivního inhibitoru inducibilní NO syntázy (iNOS), který u laboratorních myší zablokoval produkci NO imunitními buňkami. Posléze jsem u těchto (a kontrolních) myší 3 dny po infekci hodnotil následující parametry: počet, pohyblivost a délku parazitů nalezených v plicích, relativní úspěšnost migrace a patologické změny plic a plicní tkáň.

Získané výsledky neukázaly rozdíl mezi kontrolní a aminoguanidinem ovlivněnou skupinou myší. Účast NO v imunitní odpovědi náhodného savčího hostitele během infekce ptačí motolicí *T. szidati* tak nebyla potvrzena. Práce však přispěla k rozšíření dostupných informací týkajících se působení NO na larvální stádia helmintů v *in vivo* modelech. Jelikož se však jedná o první práci zabývající se touto problematikou, bude v budoucnu potřeba navrhované hypotézy ještě ověřit.

Klíčová slova

ptačí motolice; Schistosomatidae; *Trichobilharzia szidati*; náhodný hostitel; oxid dusnatý; aminoguanidin; plíce

Annotation

Cercariae of bird flukes are able to penetrate not only a skin of waterfowl but also the skin of mammals, including humans. Although the parasites cannot reproduce sexually in these hosts, they induce allergic rash called cercarial dermatitis on their skin. Nowadays, the number of cercarial dermatitis reports is increasing not only in the Czech Republic, but also in all of Europe. Therefore, research on cercarial dermatitis causative agents is very important. Thus, in the presented study, I focused on evaluation of a nitric oxide (NO) role in regulation of migration of a bird fluke *Trichobilharzia szidati* in a non-specific mammalian host (a laboratory mouse).

I studied the role of NO in regulation of migration of *T. szidati* larval stages using aminoguanidine (AMG), a selective inhibitor of inducible NO synthase (iNOS), which ceased the production of NO by murine immune cells. Subsequently, 3 days post infection, I assessed following parameters in control and AMG-treated mice: number, motility and length of worms found in lungs, relative migration success rate and pathological changes of lungs and lung tissue.

The data I obtained didn't show any differences between control and AMG-treated mice. Thus, the involvement of NO in the immune reaction of the non-specific mammalian host during the infection by the bird fluke *T. szidati* wasn't confirmed. Nevertheless, the study contributed to extension of available information regarding the impact of NO on larval stages of helminths *in vivo*. As this is the first study dealing with the presented topic, verification of proposed hypothesis will be necessary.

Keywords

bird flukes; Schistosomatidae; *Trichobilharzia szidati*; non-specific host; nitric oxide; aminoguanidine; lungs

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
2	ÚVOD	8
3	CÍLE PRÁCE	9
4	TEORETICKÁ ČÁST	10
4.1	Motolice (Trematoda)	10
4.1.1	Systematické zařazení	10
4.1.2	Morfologicko-anatomická charakteristika skupiny Digenea	10
4.1.3	Životní cykly zástupců skupiny Digenea	12
4.2	Čeleď Schistosomatidae	13
4.2.1	Životní cyklus	13
4.2.2	Schistosomóza	15
4.2.3	Ptačí schistosomy	16
4.2.4	Cerkáriová dermatitida	17
4.3	<i>Trichobilharzia szidati</i>	18
4.3.1	Druhovú determinace	18
4.3.2	Migrace <i>T. szidati</i> v definitivním hostiteli	19
4.3.3	Patogenita <i>T. szidati</i> v definitivním ptačím hostiteli	20
4.3.4	Migrace a patogenita <i>T. szidati</i> v náhodném savčím hostiteli	20
4.4	Oxid dusnatý	21
4.5	Role NO při parazitárních infekcích	22
4.5.1	Schistosomóza	23
4.5.2	Ostatní helmintární onemocnění	24
5	MATERIÁLY A METODY	25
5.1	Modelové organismy	25
5.2	Podání inhibitoru-aminoguanidin (AMG)	25
5.3	Příprava infekční dávky	26
5.3.1	Sběr cercárií	26
5.3.2	Zjištění celkového počtu cercárií	27
5.4	Infekce myší	27
5.4.1	Stanovení úspěšnosti infekce	27
5.5	Vyšetření hostitelů	28
5.6	Fixace a měření schistosomul	28
5.7	Příprava a zpracování histologických preparátů	28
5.8	Statistické vyhodnocení dat	31
6	VÝSLEDKY	32
6.1	Úspěšnost penetrace	33
6.2	Počet schistosomul ve vyšetřovaných orgánech	34
6.3	Relativní úspěšnost migrace	35
6.4	Pohyblivost schistosomul v plicích	36
6.5	Délka schistosomul	37
6.6	Patologické a histopatologické vyšetření plicní tkáně	38
7	DISKUZE	41
8	ZÁVĚR	45
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
10	INTERNETOVÉ ZDROJE	53
11	PŘÍLOHA	54

1 Seznam použitých zkratk

AMG	aminoguanidin (aminoguanidinem ošetřená skupina)
DH	definitivní hostitel
e/i/n NOS	endoteliální/inducibilní/neuronální syntáza oxidu dusnatého
K	kontrolní skupina
MAGs	miracidia attracting glycoproteins
MH	mezihostitel
NO	oxid dusnatý
p. i.	po infekci
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organization

2 Úvod

Čeď Schistosomatidae zahrnuje kromě notoricky známých krevniček (např. *Schistosoma mansoni*), způsobujících lidskou schistosomózu, i motolice parazitující v krevním řečišti a tkáních vodního ptactva. Larvální stádia ptačích schistosom mohou ovšem proniknout i do savců, včetně člověka, a následně v nich vyvolávat nepříjemné kožní onemocnění označované jako cercáriová dermatitida (Kolářová a kol. 2013). V současné době případů cercáriové dermatitidy začíná po celé Evropě neustále přibývat, čímž si toto alergické onemocnění vyneslo přívlastek tzv. „emerging disease“ (Horák a kol. 2015). Nejvíce pacientů se nakazí při letním koupání v přírodních koupalištích, která jsou kontaminována cercáriemi, larválními stádii ptačích schistosom. V České republice byla kvůli výskytu cercáriové dermatitidy uzavřena v poslední době například koupaliště v Plzni, Příbrami nebo Sokolově.

Jedním z nejčastějších původců cercáriové dermatitidy u nás, ale i v celé Evropě, je spolu s celým rodem *Trichobilharzia* ptačí motolice *Trichobilharzia szidati*, modelový organismus této práce. *T. szidati* využívá v rámci svého životního cyklu 2 hostitelů: mezihostitele (MH) – plži *Lymnaea stagnalis* a *Stagnicola palustris*, a definitivního hostitele (DH) – ptáci z čeledi Anatidae. Kromě DH dokáží larvální stádia *T. szidati* však pronikat i do tzv. náhodných hostitelů (savci, včetně člověka), ve kterých nedokáží svůj vývoj dokončit a jsou imunitním systémem zlikvidována již v kůži nebo při následné migraci hostitelem.

Za jednu z významných efektorových složek imunity proti helmintům se v současnosti považují molekuly oxidu dusnatého (NO), jehož význam byl například už zkoumán u lidské schistosomy *S. mansoni*. Naproti tomu poznatky o vlivu NO na migraci larválních stádií ptačích schistosom v náhodných hostitelích (a jejich potenciální destrukci) zatím dostupné nejsou.

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo **zhodnotit vliv NO na migraci ptačí motolice *Trichobilharzia szidati* v náhodném savčím hostiteli**. Dílčími úkoly vedoucími ke splnění stanoveného cíle bylo: (a) zhodnotit vliv NO na počet, pohyblivost a velikost parazitů nalezených v plicích infikovaných hostitelů a (b) zhodnotit vliv NO na patologické změny plic a plicní tkáň infikovaných hostitelů.

4 Teoretická část

4.1 Motolice (Trematoda)

4.1.1 Systematické zařazení

Třída motolice (Trematoda) patří spolu s tasemnicemi (Cestoda) a žábrohlisty (Monogenea) do monofyletického taxonu Neodermata, který slučuje většinu parazitických skupin z kmene ploštěnců (Platyhelminthes). Název Neodermata je odvozen od společného znaku – neodermis, povrchového syncytia pokrývajícího tělo motolice po převážnou část životního cyklu.

Třída Trematoda je z celého kmene Platyhelminthes výrazně nejpočetnější. Zahrnuje přes 18 000 druhů a dělí se na dvě podtřídy – Aspidogastrea a Digenea. (Horák a Mikeš 2007, Horák a Scholz 1998).

Zástupci podtřídy Aspidogastrea tvoří malou skupinu endoparazitů parazitujících uvnitř těl měkkýšů, paryb, kostnatých ryb a želv. V současné době jsou tyto organismy zkoumány především z hlediska evolučních vztahů k pokročilejším parazitům z podtřídy Digenea (Horák a Mikeš 2007).

Značně početnější skupina Digenea zahrnuje řadu morfologicky odlišných motolic. Jedná se především o endoparazity obratlovců včetně člověka, výjimkou jsou ektoparazité z čeledi Transversotrematidae a Accacoeliidae. I přes své často komplikované životní strategie, zahrnující obligátně dva až čtyři hostitele, se motolice z podtřídy Digenea řadí k neúspěšnějším parazitickým organismům současnosti. Mnohé z nich navíc patří k původcům medicínsky významných onemocnění člověka i hospodářských zvířat (např. čeledi Schistosomatidae a Fasciolidae) (Horák a Mikeš 2007, Horák 2010).

Zástupcem podtřídy Digenea je i modelový organismus *Trichobilharzia szidati*, použitý v předkládané práci, a proto bude tato podtřída charakterizována blíže.

4.1.2 Morfologicko-anatomická charakteristika skupiny Digenea

Motolice z podtřídy Digenea jsou bilaterálně souměrnými organismy s dorzo-ventrálně zploštělým tělem. Dospělí jedinci, nejčastěji oválného či kopinatého tvaru, dosahují rozměrů 0,5–20 mm (zástupci čeledi Fasciolidae a Didymozoidae

až jednotky i desítky cm). Charakteristickým znakem dospělých motolic je přítomnost přísavek v přední a ventrální části těla.

Povrch těla prvního stádia (miracidium) je tvořen ciliárními buňkami, které využívá k pohybu ve vnějším prostředí. Po penetraci prvního mezihostitele (MH) jsou tyto buňky odhazovány a nahrazeny syncytiální neodermis, vzniklé z bezjaderné cytoplazmy kmenových buněk (neoblastů). Povrch těla motolic dotvářejí charakteristické přísavky a další struktury (tegumentální trny, glykokalyx apod.). Mezi hlavní funkce tegumentu patří: mechanická a chemická ochrana, sekrece a exkrece látek a absorpce živin.

Kvůli migraci uvnitř či mezi hostiteli je u motolic poměrně dobře vyvinuta svalová soustava. Ta se směrem od povrchu skládá ze svaloviny okružní, podélné a šikmé. Dobře vyvinutá je též svalovina vnitřních orgánů.

Nervová soustava je u motolic představována párem cerebrálních ganglií umístěných v přední části těla, z nichž do přední i zadní části těla vybíhají nervové provazce (orthogony). Nejvíce inervovanou oblastí jsou přichycovací orgány, jícen a reprodukční soustava.

Kromě několika zástupců z čeledi Cryptogonimidae mají všechny motolice neprůchozí trávicí soustavu. Ústní otvor, často obklopený ústní přísavkou, tedy slouží i jako otvor vyvrhovací. Po něm dále následuje předhltan (prepharynx), hltan (pharynx), jícen (esofagus) a střevo s trávicí funkcí. Živiny z potravy (krev a tkáň hostitele) mohou být přijímány ještě přes tegument nebo může být potrava trávena i mimotělně, pomocí Brandesova orgánu (čeled' Strigeidae).

Vylučování odpadních zplodin metabolismu (exkrece) zajišťuje protonefridiální systém, jehož základem jsou plaménkové buňky a soustava odvodných kanálků. V životních cyklech motolic hrají velkou roli i sekrety, vylučované různými typy žláзовých buněk: jejich produkty napomáhají pronikání do hostitelů (penetrační žlázy), encystaci ve vnějším prostředí (cystogenní žlázy), či se účastní interakcí s imunitním systémem hostitele (inhibitory enzymů).

Přechod k parazitickému způsobu života a r-strategii vedl také k vytvoření vysoce výkonné rozmnožovací soustavy. Ačkoliv jsou motolice hermafrodité (výjimkou je gonochoristická čeled' Schistosomatidae a někteří zástupci čeledi Didymozoidae), při pohlavním rozmnožování dochází ke zkřížené inseminaci. Samčí pohlavní žlázou jsou párová varlata, u samic jde o germarium produkující vaječné buňky (Horák a Mikeš 2007).

4.1.3 Životní cykly zástupců skupiny Digenea

U motolic z podtřídy Digenea se setkáváme s komplikovanými životními cykly obligátně zahrnujícími dva či více hostitelů. Tyto hostitele poté rozdělujeme podle funkce v životním cyklu parazita do dvou základních kategorií: mezihostitelé a definitivní hostitelé (DH).

Uvnitř MH, jimiž jsou měkkýši (v drtivé většině případů plži), se larvální stádia motolic rozmnožují asexuálně za účelem masivního namnožení. Naproti tomu v DH, kterými jsou teplokrevní obratlovci, larvální stádia motolic dosahují pohlavní zralosti, pohlavně se rozmnožují a produkují oplozená vajíčka.

Vajíčka mohou tělo DH opouštět mnoha cestami: společně s trusem hostitele (většina druhů podtřídy Digenea), močí hostitele (např. *Schistosoma japonicum*), sputem (např. *Paragonimus westermani*) hostitele, ale také například přes jeho nosní dutinu (např. *Trichobilharzia regenti*).

K líhnutí prvních larválních stádií (miracidia) dochází zpravidla po prvním kontaktu vajíček s vodou. Miracidia ve vodním prostředí následně aktivně vyhledávají svého MH. Orientaci ve vnějším prostředí, resp. vyhledání MH, jim usnadňují látky, které plži vylučují (jde o tzv. MAGs = miracidia attracting glycoproteins) (Kalbe a kol. 2000), a schopnost pozitivní či negativní fototaxe a geotaxe. Přes tělní povrch plžů miracidia penetrují pomocí proteolytických enzymů uvolňovaných z apikální žlázy v přední části těla. Penetrace je doprovázena svlékáním povrchových ciliárních buněk a vznikem syncytiálního tegumentu (neodermis) na povrchu těla parazitů (viz kap. 4.1.2).

Z miracidii se tak stávají mateřské sporocysty, které se usazují v místě penetrace, již je oblast svalnaté nohy či hlavy plže. Ze zárodečných buněk (neoblastů) mateřských sporocyst se v závislosti na druhu motolice dále uvolňují dceřiné sporocysty, nebo redie.

Dceřiné sporocysty migrují k hepatopankreatu plže, kde se asexuálně rozmnožují a produkují další generace dceřiných sporocyst. Při tom přijímají živiny výhradně přes tegument a svými exkrety narušují tkáň hostitele.

Redie oproti dceřiným sporocystám narušují tkáň hostitele mechanicky a tráví ji uvnitř funkční trávicí soustavy. Nové generace dceřiných redií vznikají opět nepohlavním rozmnožováním ze zárodečných buněk mateřských redií.

Po několika generacích dceřiných sporocyst/redií se v těle parazita začnou vytvářet generace cercárií. Tělo cercárie je nejčastěji tvořeno přední částí

a ocáskem, který slouží k pohybu ve vodním prostředí; u druhů vázaných na suchozemské prostředí je ocásek redukován. Další osud cercárií se liší podle typu životního cyklu jednotlivých motolic.

Druhy dvouhostitelských motolic využívají k přechodu mezi hostiteli několik odlišných strategií, například: (i) cercárie motolic z čeledi Schistosomatidae opouštějí tělo plže a aktivně vyhledávají DH; (ii) u zástupců čeledi Fasciolidae jsou cercárie také uvolňovány do vnějšího prostředí, kde ale pomocí cystogenních žláz encystují v metacercárie a vyčkávají na pozření DH; (iii) v neposlední řadě cercárie motolic z čeledi Leucochloridiidae encystují již v mezihostitelských plžích, s nimiž jsou následovně pozřeny DH.

V rámci tříhostitelských cyklů (např. čeleď Echinostomatidae) je využíváno navíc druhého MH, v němž cercárie encystují a mění se na stádium metacercárie. V takovém stavu přečkávají do doby, než jsou i spolu s druhým MH (měkkýšem, žábou, rybou aj.) pozřeny DH (Horák a Mikeš 2007, Horák 2010, Horák a kol. 2014).

4.2 Čeleď Schistosomatidae

Z třídy Trematoda představují motolice čeledi Schistosomatidae nejlépe prozkoumanou skupinu motolic, poněvadž zahrnují mnoho medicínsky významných parazitů. Těmi jsou primárně lidské schistosomy krevničky (rod *Schistosoma*) a některé druhy ptačích motolic, způsobující cercáriovou dermatitidu (viz kap. 4.2.4).

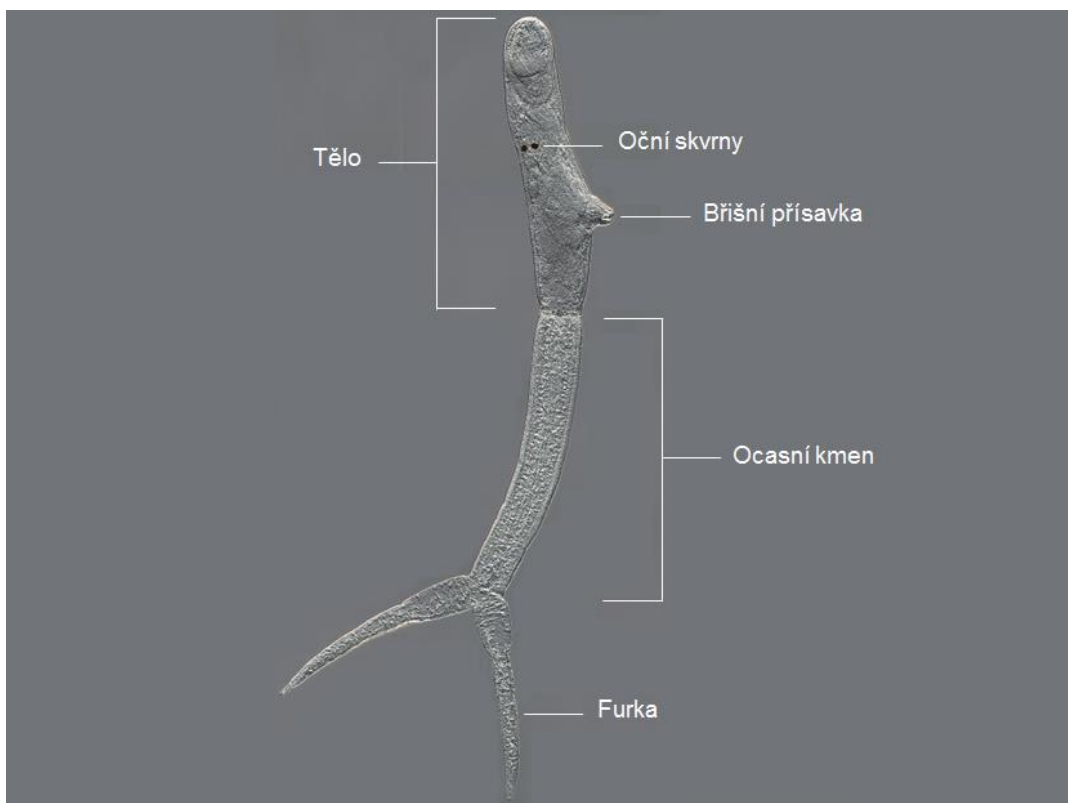
Zástupce čeledi Schistosomatidae můžeme rozlišit na motolice využívající savčí, nebo ptačí DH. Podle finální lokace v DH je poté dělíme na druhy viscerální (dospělci žijí v cévách či tkáních útrobních viscerálních orgánů) a druhy nazální (dospělci obývají tkáň nosní dutiny).

4.2.1 Životní cyklus

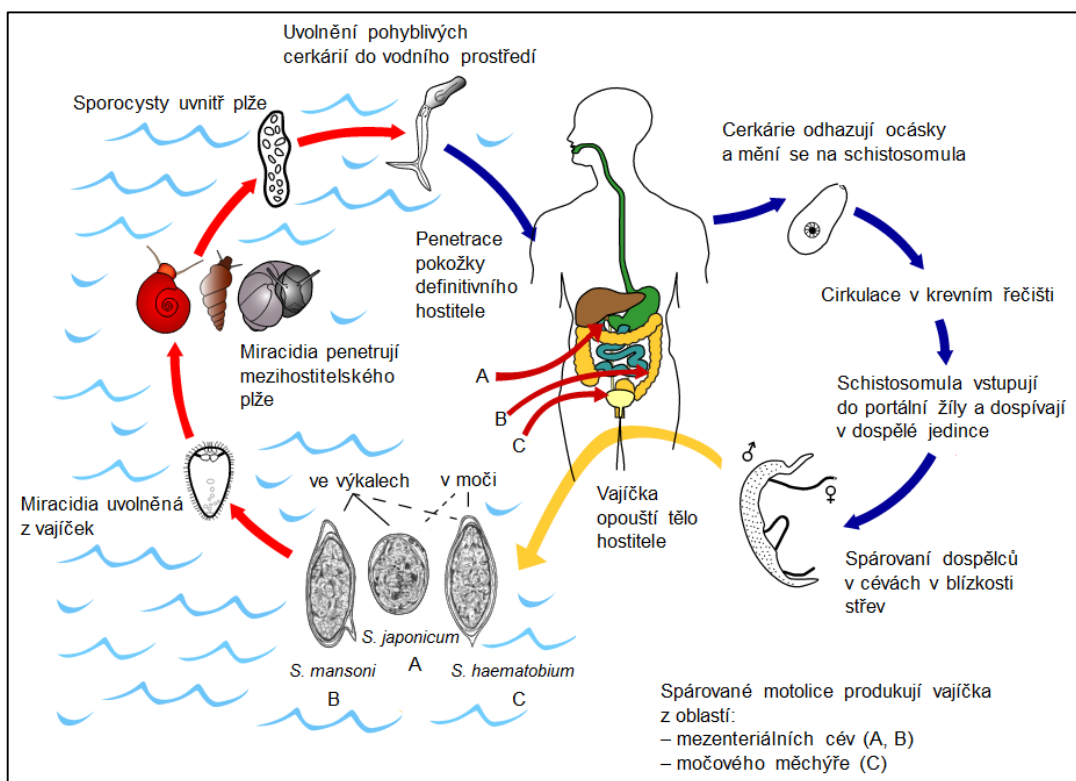
Schistosomy jsou gonochoristé s výrazným pohlavním dimorfismem. Po spárování dospělců v DH je subtilnější samička dočasně či natrvalo usídlena v *canalis gyneacophorus* robustnějšího samce a je jím oplozována. Z vajíček se líhnou miracidia, která pronikají do mezihostitelských plžů, v nichž se po několika generacích mateřských a dceřiných sporocyst začínají vytvářet furkocercárie (viz Obrázek 1). Ty při penetraci DH odhazují své ocásky a mění se na stádia zvaná schistosomula. Během migrace v DH schistosomula pohlavně dozrávají v dospělé

motolice, jež se nejčastěji rozmnožují intravaskulárně, v blízkosti viscerálních orgánů. Schéma životního cyklu je na příkladu lidských krevniček ukázáno na Obrázku 2 (na následující straně) (Horák a Mikeš. 2007, Horák 2010, Horák a kol. 2014).

Obrázek 1: Morfologické schéma furkocerkárie zobrazené na příkladu nazální motolice *Trichobilharzia regenti*, délka asi 760 μm . Foto Tomáš Macháček, upravil V. Ryšlink.



Obrázek 2: Životní cyklus motolic z čeledi Schistosomatidae představený na příkladu krevniček rodu *Schistosoma*. Zdroj: CDC (2007), upravil V. Ryšlink.



4.2.2 Schistosomóza

Lidská schistosomóza, dříve označovaná jako bilharzióza, je parazitární onemocnění člověka a dalších savců, způsobené motolicemi rodu *Schistosoma*. Celosvětově je odhadem nakaženo více jak 260 milionů lidí, pocházejících z tropických a subtropických oblastí Afriky, Asie, Oceánie a Jižní Ameriky (WHO 2016). Hlavními infekčními druhy jsou *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* a *Schistosoma japonicum*. K přenosu infekce dochází ve sladkých vodách, kde se nacházejí mezihostitelští plži (rody *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Oncomelania*) (Gryseels a kol. 2006).

Hlavním patogenním agens nejsou u infikovaných pacientů dospělé motolice, nýbrž produkovaná vajíčka (Burke a kol. 2009). Samice lokalizované v cévách kolem střev či močového měchýře produkují denně stovky až tisíce vajíček, která pronikají stěnou močového měchýře (*S. haematobium*) či střev (ostatní druhy) a s močí, resp. stolicí opouštějí tělo hostitele. Část vajec je však krevním oběhem roznesena i do jiných orgánů (především jater), kde vyvolávají zánětlivou reakci doprovázenou fibrotickými změnami postiženého orgánu (Wilson

a kol. 2007). Lékem volby je antihelmintikum prazikvantel, objevují se však případy, kdy jsou k němu schistosomy rezistentní (Wang a kol. 2012). Očkování proti této parazitární infekci není doposud k dispozici.

4.2.3 Ptačí schistosomy

Intenzivní výzkum lidských schistosom vedl v minulosti k mírnému opomíjení ostatních savčích, ale i ptačích schistosom. V současné době se však právě těmto zástupcům začíná věnovat zvýšené pozornosti, především díky stále zvyšujícímu se počtu diagnostikovaných případů cercáriové dermatitidy (viz kap. 4.2.4). Mezi ptačí schistosomy můžeme zařadit zástupce 10 rodů, které přehledně charakterizuje Tabulka 1. Nejlépe prostudovanou skupinou je mezi ptačími schistosomami rod *Trichobilharzia*, jehož zástupce (*T. szidati*) je modelovým organismem použitým v této práci (pro podrobnější seznámení viz kap. 4.3).

Tabulka 1: Přehled rodů ptačích schistosom a jejich základní charakteristika. Upraveno podle Horák a kol. (2015).

Rod	Mezihostitel (čeleď plžů)	Definitivní hostitel (řád ptáků)	Výskyt
Sladkovodní druhy			
<i>Anserobilharzia</i> ^{cd, v}	Okružákovití	Vrubozobí	Severní polokoule
<i>Bilharziella</i> ^{cd, v}	Okružákovití	Vrubozobí, Krátkokřídílí, Brodiví, Potápky	Evropa
<i>Dendritobilharzia</i> ^v	Okružákovití	Vrubozobí, Krátkokřídílí, Veslonozí, Potáplice	Kosmopolitně
<i>Gigantobilharzia</i> ^{a, cd, v}	Plovatkovití	Pěvci	Severní Amerika
<i>Trichobilharzia</i> ^{cd, vn}	Plovatkovití, Levatkovití	Vrubozobí	Kosmopolitně

Mořské druhy			
<i>Austroilharzia</i> ^{cd, v}	Nassariidae, Batillaridae, Littoriniidae, Potamididae	Dlouhokřídří	Kosmopolitně
<i>Ornithobilharzia</i> ^{cd, v}	Batillaridae	Charadriiformes	Kosmopolitně
Neznámé stanoviště			
<i>Allobilharzia</i> ^v	Neznámý	Vrubozobí	Severní polokoule
<i>Jilinoilharzia</i> ^v	Neznámý	Vrubozobí	Čína
<i>Macrobilharzia</i> ^v	Neznámý	Suliformes	Severní Amerika, Afrika

^a Vztaženo pro druh *G. huronesis*.

^{cd} Prokázání původci cercáriové dermatitidy.

^v Zahrnuje pouze viscerální druhy.

^{vn} Zahrnuje viscerální i nazální druhy.

4.2.4 Cercáriová dermatitida

Toto alergické kožní onemocnění je vyvolané průnikem cercárií ptačích schistosom do kůže savců (vč. člověka), kteří jsou pro ně náhodným hostitelem. „Popletení“ parazita je způsobeno podobným složením mastných kyselin a dalších chemických látek (cholesterol, ceramidy apod.) na pokožce teplokrevných obratlovců (ptáků a savců). Cercárie ptačích schistosom tak mohou pronikat i do hostitelů, v nichž nedokáží dokončit svůj vývoj (Feiler a Haas 1988).

Imunitní systém náhodných hostitelů totiž parazity eliminuje zpravidla již při penetraci kůže či později během následné migrace organismem. Typickým projevem je, obzvlášť v případě opakovaných infekcí, kožní vyrážka vzniklá v důsledku obranné zánětlivé reakce; právě tento klinicky zjevný symptom je označován jako cercáriová dermatitida.

Vyrážka je reprezentována růžovými, asi 2 mm v průměru velkými papulami, které se běžně objevují do 2. dne po infekci (p. i.) a následně mizí po několika dnech. U citlivějších pacientů může vyrážka přetrvávat i několik týdnů a navíc být doprovázena horečnatými stavy, zduřením lymfatických uzlin, edémy apod. (Kolářová 1999, Kouřilová a kol. 2004, Kolářová a kol. 2013).

Oproti subtropickým a tropickým krevničkám (*S. mansoni*, *S. haematobium* či *S. japonicum*) jsou ptačí schistosomy schopny přežít i chladnější podmínky mírného pásu, kde představují potenciální zdravotní riziko i pro obyvatele vyspělých států. S ohledem na narůstající počet ohlášených případů začíná být cercáriová dermatitida označována také za tzv. „emerging disease“ (Horák a Kolářová 2011, Horák a kol. 2015).

V České republice, ale i v celé Evropě, se nejvíce lidí nakazí cercáriovou dermatitidou při letních návštěvách přírodních koupališť. V posledních letech tak u nás musela být kvůli výskytu cercáriové dermatitidy přerušena koupací sezóna na přírodních koupalištích, například v Příbrami (Jarolímek 2014), Sokolově (Čurlinová 2015), Plzni (Nedvěd 2013) nebo v Zákupích (Redakce ČTK 2015).

4.3 *Trichobilharzia szidati*

Trichobilharzia szidati NEUHAUS 1952 je ptačí schistosoma střídající v rámci svého životního cyklu dva hostitele. Dospělci jsou v tělech DH (ptáci čeledi Anatidae) nejčastěji lokalizováni ve střevní tkáni či blízkých cévách. Samičky odtud uvolňují vajíčka, která se již se zcela vyvinutými miracidii dostávají do vnějšího prostředí společně s trusem. Při kontaktu vajíček s vodou se miracidia uvolňují do několika minut (NEUHAUS 1952). Mezihostitelskými plži jsou druhy *Lymnaea stagnalis* a *Stagnicola palustris* (Kock 2001). Po několika generacích mateřských a dceřiných sporocyst se z mezihostitelských plžů uvolňují cercárie, napadající jak definitivní, tak náhodné hostitele, u nichž mohou vyvolat cercáriovou dermatitidu (Kolářová 1999).

4.3.1 Druhová determinace

Historicky jsou determinace a popis druhu *Trichobilharzia szidati* (resp. ocelátních furkocerkárií uvolňovaných z evropských sladkovodních plžů) poněkud komplikované. S prvním záznamem se setkáváme v roce 1855, kdy La Valette označil cercárie vylučované z plže *Lymnaea stagnalis* jako *Cercaria ocellata*, klasifikovanou v roce 1931 Brumtem za larvální stádium druhu *Trichobilharzia ocellata*. Ve 30. a 40. letech 20. století přibývalo pozorování výskytu „*C. ocellata*“, avšak tyto cercárie se lišily rozměry i mezihostitelskými plži, což vyústilo v popis několika nových „druhů“ cercárií. V roce 1952 se Neuhausovi podařilo popsat

kompletní životní cyklus jednoho z nich, který pojmenoval *T. szidati*. I přes to bylo nadále často používáno jméno *T. ocellata*, i když se ukázalo, že jde o komplex, ze kterého se postupně vydělilo několik dalších druhů (*T. franki*, *T. regenti*, *T. salmanticensis*, *T. mergi*, *T. anseri*). Rudolfová a kol. (2005) molekulárními metodami prokázali identitu evropských izolátů ocelátních furkocerkárií uvolněných z *L. stagnalis* chovaných v evropských parazitologických laboratořích (Praha, Amsterdam, Erlangen) i odlovených ve volné přírodě (ČR, Polsko). Na základě toho bylo navrženo označovat tyto druhy jednotně jako *T. szidati* a jméno *T. ocellata* dále nepoužívat (Rudolfová a kol. 2005).

4.3.2 Migrace *T. szidati* v definitivním hostiteli

Po průniku do DH se cercárie *T. szidati* mění na poslední larvální stádia – schistosomula. Kvůli potřebě vyhnout se imunitnímu systému hostitele je tato přeměna doprovázena shozením imunogenního povrchového glykokalyxu a zdvojením cytoplazmatické membrány na povrchu těla (Horák a kol. 2002).

Ještě před tím, než schistosomula vstoupí do krevního řečiště, musí prostoupit několika vrstvami kůže hostitele. V nich se orientují pomocí negativní fototaxe (Grabe a Haas 2004a). Kromě toho bylo u schistosomul *T. szidati in vitro* také popsáno pozitivně chemotaktické chování k určitým koncentracím L-argininu a D-glukóze. Autoři navrhuji, že tímto způsobem schistosomula dokáže určit svou polohu v kůži hostitele a lokalizovat blízké cévy (Grabe a Haas 2004b).

Jakmile schistosomula opustí kůži (19 hodin p. i.), pronikají do oběhové soustavy hostitele, odkud se velmi rychle šíří do ostatních orgánů (Bourns a kol. 1973). V rámci plic byly u schistosomul *T. szidati* doposud pozorovány 2 odlišné způsoby migrace. Chanová a kol. (2007) našli schistosomula nejdříve 2. den p. i. uvnitř sekundárních průdušek, odkud následně pozorovali migraci schistosomul do plicních kanálků (parabronchi). Naopak Bourns a kol. (1973) nejprve zaznamenali schistosomula v plicních kanálcích (24 hodin p. i.) a až poté v sekundárních průduškách. Tito autoři navíc pozorovali 5. den p. i. sekundární invazi plic, po které však žádné ze schistosomul nebylo schopno plíce opustit. Chanová a kol. (2007) pozorovali schistosomula v plicích nejpozději 10. den p. i., Bourns a kol. (1973) 16. den p. i..

V játrech byla schistosomula nalezena 2.–9. den p. i.. Do 6. dne p. i. se schistosomula nacházela v jaterních sinusoidách, avšak později byla pozorována výhradně v přilehlých žilách, především v portální (Bourns a kol. 1973).

Dospělé motolice byly v přilehlých žilách tenkého střeva objeveny již 8. den p. i.. Nejvíce dospělých červů byl přítomno ve střevech 10.–21. den p. i., kde obývali prostor mezi buňkami střevní sliznice (Bourns a kol. 1973).

Několik málo schistosomul bylo při experimentálních infekcích objeveno taktéž v ledvinách a srdci (Bourns a kol. 1973, Haas a Pietsch 1991).

4.3.3 Patogenita *T. szidati* v definitivním ptačím hostiteli

Ačkoliv jsou ptáci čeledi Anatidae definitivními hostiteli *T. szidati*, není výzkumu jejich infekcí tímto parazitem věnováno takové úsilí jako v případě náhodných hostitelů.

Penetrace kůže DH je doprovázena zarudnutím v místě průniku cercárií či rozvojem petechií (krevní výrony způsobené porušením podkožních cév). Následná migrace a kumulace schistosomul v plicích může být doprovázena vznikem hemoragií (krváčení) a zánětlivých uzlíků v plicní tkáni tvořených lymfocyty, heterofily, granulocyty a makrofágy (Chanová a kol. 2007). U příbuzného druhu *Anserobilharzia brantae* bylo popsáno, že při uvolňování oplozených vajíček může dojít k jejich zanesení do tkáně jater nebo střev (podobně jako u lidských schistosom), kde mohou spustit zánětlivou imunitní reakci (Wojcinski a kol. 1987); pro *T. szidati* však tato data k dispozici nejsou.

4.3.4 Migrace a patogenita *T. szidati* v náhodném savčím hostiteli

Při experimentálních infekcích bylo dokázáno, že i u náhodných hostitelů jsou cercárie schopny transformace na schistosomula, a dokonce i částečné migrace hostitelem. K průniku přes pokožku a migraci hostitelem dochází především při primárních infekcích, kdy imunitní systém hostitele reaguje méně agresivně, nežli při reinfekcích.

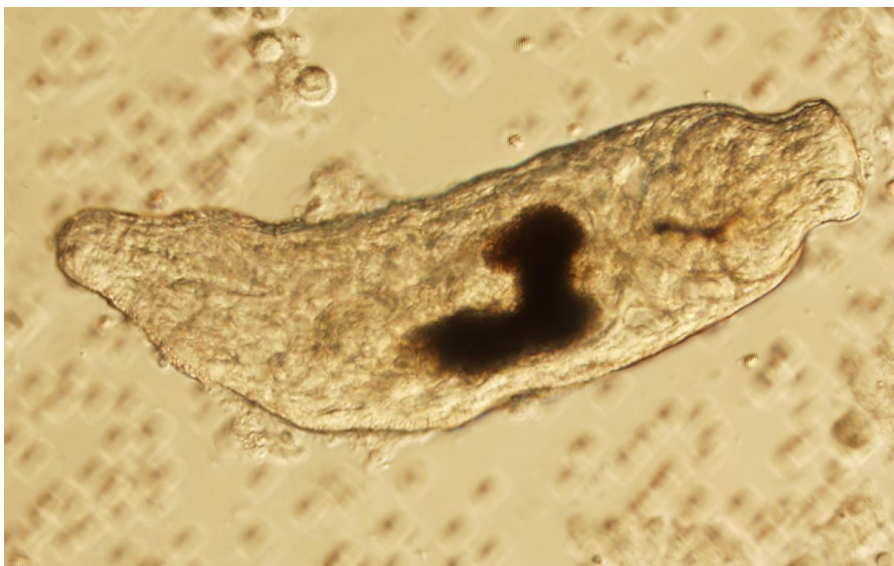
Vývoj a migrace schistosomul (viz Obrázek 3) byly prokázány u myši, křečků, morčat, králíků i makaků rhesus (Olivier 1953). Autor této studie hledal schistosomula v najemno natřaných plicích a játrech infikovaných zvířat pod světelným mikroskopem. V plicích myši byla schistosomula nalezena 2.–5. den p. i., v játrech žádná nalezena nebyla. Při dalších experimentech (Haas a Pietsch 1991) byla radioaktivně značená schistosomula hledána v orgánových roztlacích.

Schistosomula v plicích myši byla pozorována už 10 hodin p. i. a v ostatních orgánech (střevo, ledviny, srdce) nejdříve 3. den p. i..

U infikovaných myši i ostatních zvířat (křečci, králíci, makakové rhesus) byly na povrchu plic zaznamenány četné hemoragie (Olivier 1953, Chanová a kol. 2007). Při histopatologickém vyšetření bylo pozorováno překrvení plicní tkáně a 4. den p. i. také shlukování lymfocytů v okrajových částech plicních laloků (Chanová a kol. 2007).

Schistosomula *T. szidati* byla v plicích myši nalezena nejpozději 10. den p. i.. S přihlédnutím na nepoškozený tegument je jejich úhyn v náhodných hostitelích přisuzován buď neznámému imunologickému faktoru, nebo nedostatku esenciálních nutričních látek. (Horák a Kolářová 2000).

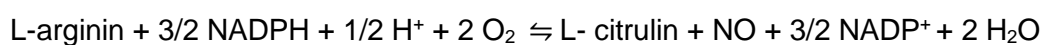
Obrázek 3: Schistosomulum *T. szidati* vypitvané z plic experimentálně infikované myši (3 dny p. i.). Hnědě zbarvený je obsah střeva – natrávená krev. Délka schistosomula je asi 130 μm . Foto V. Ryšlink.



4.4 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je dvouatomová plynná molekula s volným valenčním elektronem, který rozhoduje o jeho velké reaktivitě. Jeho reaktivita může být navíc zvýšena po reakci se superoxidovým aniontem (O_2^-), kdy vzniká mnohem reaktivnější forma – tzv. peroxonitrit (ONOO^-).

V obratlovcích vzniká NO postupnou oxidací L-argininu na L-citrulin pomocí enzymu NOS (syntáza oxidu dusnatého) za účasti kyslíku a koenzymu NADPH (nikotinamidadenindinukletidfosfát):



NOS se vyskytuje celkem ve 3 izoformách: eNOS (endoteliální) – exprimovaná endoteliálními buňkami; nNOS (neuronální) – exprimovaná neurony; iNOS (inducibilní) – exprimovaná především makrofágy. Endoteliální a neuronální NOS produkují NO v menší míře neustále a jejich aktivace vyžaduje přítomnost Ca^{2+} . Naopak inducibilní NOS syntetizuje NO pouze tehdy, jsou-li přítomny určité stimuly (bakteriální lipopolysacharid, cytokin interferon γ apod.) a oproti ostatním není její aktivita podmíněna Ca^{2+} (Stuehr 1999).

Velikost molekuly a dobrá propustnost přes buněčné membrány umožňuje molekulám NO uplatňovat se jako signální molekuly při řízení dilatace cév (eNOS). Dále NO ovlivňuje také mnoho procesů v rámci nervové soustavy, kde se účastní především procesů spojených s pamětí a učením (nNOS). V neposlední řadě se molekuly NO uplatňují jako efektorová složka při obraně proti bakteriím, parazitickým prvokům či helmintům (iNOS) (Muro a Pérez-Arellano 2010).

NO produkovaný buňkami je možné detekovat přímým i nepřímým způsobem. S přihlédnutím k jeho vysoké reaktivitě jsou však metody založené na nepřímé detekci jeho oxidačních produktů (NO_2^- , NO_3^-) mnohem využívanější. V praxi se velmi často používá tzv. Griessova metoda, jež spočívá ve spektrofotometrickém vyhodnocení koncentrace NO_2^- a NO_3^- (oxidačních produktů NO) ve zkoumaném roztoku (Stuehr 1999). Přímé stanovení je možné provést například pomocí elektrod (Kupková a Beneš 2004).

4.5 Role NO při parazitárních infekcích

NO byl tradičně považován za důležitou efektorovou složku imunity hostitele při bakteriálních a protozoárních infekcích. Nyní však vychází najevo, že může hrát významnou roli i při regulaci infekcí parazitickými červy. Údaje jsou však ve většině případů spíše jen kusé a srovnání výsledků experimentů prováděných *in vitro* a *in vivo* je velmi rozporuplné. Při prokazování účinků NO v *in vivo* systémech (tj. při infekcích experimentálních zvířat) je využíváno buď kmenů myši, které nemají funkční geny pro NOS (a nejsou tedy schopné produkce NO),

či inhibitorů NOS. Příkladem selektivního inhibitoru je aminoguanidin (AMG), látka blokující na iNOS vazebné místo pro L-arginin (Misko a kol. 1993).

V následujících podkapitolách je představena úloha NO v regulaci vybraných helmintárních infekcí.

4.5.1 Schistosomóza

Letální účinky NO na schistosomula *S. mansoni* byly *in vitro* prokázány několika studiemi (McLaren a James 1985, Esparza 1987). Při těchto experimentech byla schistosomula po různě dlouho dobu inkubována s aktivovanými makrofágy produkujícími NO. Již po 1 hodině inkubace byly patrné patologické strukturní změny u svalových buněk a také mitochondrií podpvrchových buněk parazita; nebylo ovšem zaznamenáno žádné porušení tegumentu (McLaren a James 1985). Za hlavní příčinu úhynu parazita byla proto posléze určena inhibice mitochondriální respirace v důsledku poškození enzymů dýchacího řetězce NO (James a Glaven 1989).

Pokusy *in vivo* situaci kolem účinnosti NO na schistosomula *S. mansoni* však poněkud komplikují. Výsledkem experimentu Coulsona a kol. (1998) bylo totiž zjištění, že účinky NO na likvidaci schistosomul *S. mansoni* v plicích myši nemají téměř žádný vliv. Předpokládaným důvodem je přítomnost erytrocytů, které schistosomulům v krvi pravděpodobně poskytují ochranu před toxicitou NO.

Jako další důležitý faktor se ukazuje i stáří schistosomul, kdy při experimentech Ahmeda a kol. (1997) byla 3 hodiny stará schistosomula k toxicitě NO mnohem vnímavější než schistosomula stará 1 týden. Tato odlišná vnímavost k NO je s ohledem na předchozí experimenty přisuzována změnám v energetickém metabolismu (viz výše – vliv NO na inhibici mitochondriálních enzymů) schistosomul v průběhu migrace.

Zajímavé je, že pozitivní účinky NO byly prokázány při regulaci patologie způsobené diseminovanými vajíčky *S. mansoni* v játrech. U myši s inhibovanou iNOS docházelo v okolí vajec k mnohem výraznějšímu poškození jater a častější apoptóze jaterních buněk než u kontrolní skupiny (Brunet a kol. 1999).

4.5.2 Ostatní helmintární onemocnění

Vliv NO na průběh helmintárních infekcí je kromě schistosomózy sledován především u echinokokózy (infekce tasemnicemi měchožily), trichinelózy (infekce hlísticemi svalovci) a filariózy (infekce hlísticemi ze skupiny filárií). Tato data jsou pro přehlednost shrnuta v Tabulce 2.

Tabulka 2: Dostupné výsledky o vlivu NO při ostatních helmintózách.

	Echinokokóza	Trichinelóza	Filarióza
Ovlivnění množství produkovaného NO hostitelem	<u>Zvýšení</u> Steers a kol. (2001)	<u>Zvýšení</u> Wandurska- Nowak a Wiśniewska (2002)	<u>Zvýšení</u> Taylor a kol. (1996)
	<u>Snížení</u> Andrade a kol. (2004)	<u>Snížení</u> Bian a kol. (2001)	
Nárůst počtu parazitů v hostiteli při inhibici iNOS	<u>Nedostupné</u>	<u>Nepotvrzeno</u> Kołodziej- Sobocińska (2006)	<u>Potvrzeno</u> Rajan a kol. (1996)
Toxicita NO a jeho oxidačních produktů na larvální stádia parazitů <i>in vitro</i>	<u>Potvrzeno</u> Zeghir- Bouteldja a kol. (2013)	<u>Potvrzeno</u> Wang a kol. (2015)	<u>Potvrzeno</u> Hartmann a kol. (2002)
Způsobení patologického poškození u hostitelů vlivem produkce NO	<u>Nedostupné</u>	<u>Potvrzeno</u> Lawrence a kol. (2000)	<u>Nedostupné</u>

5 Materiály a metody

V této práci jsem používal laboratorní myši kmene C57BL/6 a larvální stádia ptačí motolice *T. szidati*, viz kap. 5.1. Na začátku experimentů jsem rozdělil laboratorní myši do 2 skupin. Jedné skupině myši jsem pro zhodnocení role NO v imunitní odpovědi hostitele podal inhibitor iNOS (skupina AMG). Druhá skupina zdravých myši sloužila jako kontrola (skupina K), viz kap. 5.2.

Před samotnými infekcemi jsem si nejprve odměřil předem stanovenou infekční dávku (1500 cercárií), viz kap. 5.3, a poté jsem infikoval myši, viz kap. 5.4. Úspěšnost infekce jsem zjišťoval spočítáním množství odhozených ocásků, zbylých hlaviček a živých cercárií z obsahu sklenic, ve kterých byly jednotlivé myši infikovány, viz kap. 5.4.1.

Plíce a játra myši jsem na přítomnost schistosomul vyšetřoval vždy 3. den p. i., viz kap. 5.5, některá schistosomula jsem nafixoval pro změření délky, viz kap. 5.6. Od několika vybraných vzorků z obou skupin (K i AMG) jsem orgány zpracoval pro histopatologické účely, viz kap. 5.7.

Po ukončení experimentů jsem rozdíl v datech mezi K a AMG skupinou myši vyhodnocoval pomocí statistického softwaru, viz kap. 5.8.

5.1 Modelové organismy

Cercárie motolice *T. szidati* byly získány z chovů Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kde je cyklus této motolice dlouhodobě udržován. Jako mezihostitelé této motolice jsou využívány plovatky druhu *Lymnaea stagnalis* a jako definitivní hostitelé slouží kachny domácí *Anas platyrhynchos f. domestica*.

Myši kmene C57BL/6 (6–10 týdnů staří samci), využívané v mých experimentech jako náhodní hostitelé, byly získány z chovů téhož pracoviště.

5.2 Podání inhibitoru-aminoguanidin (AMG)

Po 2 hodinách bez přístupu k vodě jsem dal myším (AMG skupina) k dispozici napáječku s vodou obsahující 100mM aminoguanidin hemisulfát (Sigma-Aldrich), specifický inhibitor iNOS. Takto byly myši napájeny 18 hodin před infekcí

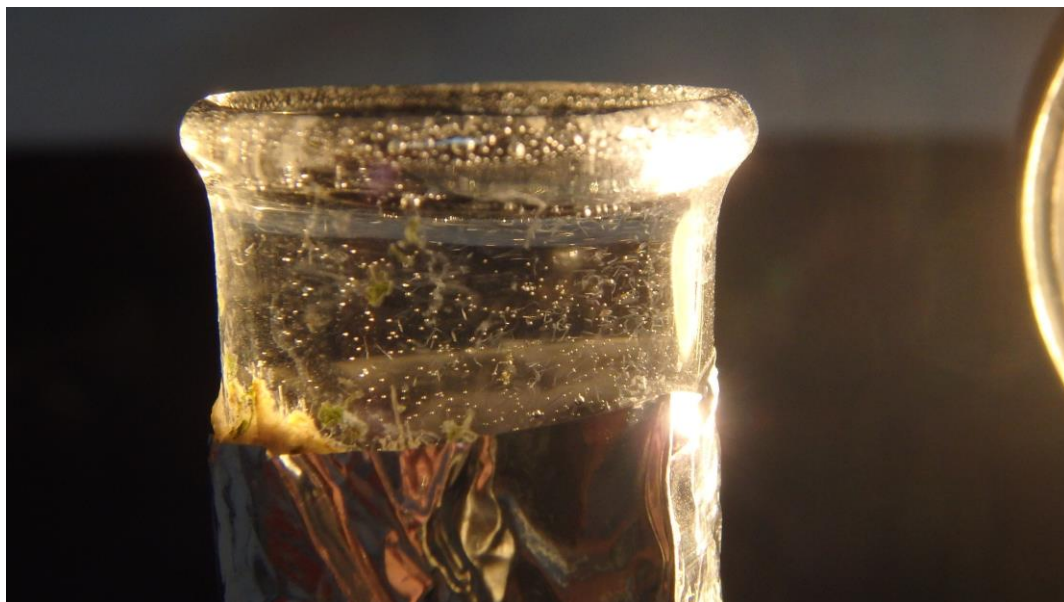
cerkáriemi a dále po celou dobu experimentu až do usmrcení. Myši z kontrolní skupiny byly před a po celou dobu experimentu napájeny vodou bez inhibitoru.

5.3 Příprava infekční dávky

5.3.1 Sběr cercárií

Uvolňování cercárií z mezihostitelských plžů je možné stimulovat světlem. Proto jsem nejprve plže vylovil z akvárií, umístil je do menších nádob s alespoň týden odstátou vodovodní vodou a následně na nádoby namířil zdroj světla v podobě stolní lampičky s 20W žárovkou. Po uplynutí 60 minut jsem plže navrátil do akvárií a vodu s vyloučenými cercářiemi přelil do odměrné baňky až po hrdlo zakryté alobalem, na které jsem z boku znovu namířil zdroj světla, viz Obrázek 4. Kvůli pozitivnímu fototaktismu cercárie začaly postupně vyplouvat k hladině, odkud jsem je Pasteurovou pipetou odebíral do 50ml plastových zkumavek. Po každém odběru jsem rovněž doplnil takové množství vody, aby hladina v baňce znovu dosahovala výše hrdla

Obrázek 4: Hrdlo baňky s vyplouvajícími cercářiemi při nasvícení. Foto V. Ryšlink.



5.3.2 Zjištění celkového počtu cercárií

Počet cercárií v 50ml zkumavce jsem zjistil tak, že jsem z daného objemu automatickou pipetou náhodně odebral 20 vzorků po 50 μ l. Ty jsem postupně prohlížel na podložním sklíčku nad tmavým podkladem, při čemž jsem zjišťoval množství cercárií v jednotlivých vzorcích. Ze zjištěných údajů jsem poté vypočítal průměrný počet cercárií v 1 ml a posléze i v celém objemu ve zkumavce.

5.4 Infekce myši

Po zjištění koncentrací cercárií ve zkumavkách jsem určil objem obsahující 1500 cercárií, které představovaly infekční dávku pro jednu myš (určeno podle Chanová a kol. (2007)). Tento objem jsem automatickou pipetou přenesl do uzavíratelných sklenic obalených alobalem (tma způsobí, že cercárie nemohou reagovat na světlo, a tak se při vyhledávání hostitele orientují pouze chemotakticky). Pak jsem do sklenice dolil odstátou vodou tak, aby hladina uvnitř sklenice dosahovala potřebné výše k ponoření nohou i ocasu myši (cca 1–2 cm). Myš byla před umístěním do sklenice s cercáriemi po dobu 1–2 hodin odstavena bez přístupu k potravě do nádoby s vodou pokojové teploty za účelem defekace. Jinak by hrozilo možné ovlivnění životaschopnosti cercárií v infekční nádobě toxicitou výkalů. Infekce probíhala po dobu 60 minut, po jejímž uplynutí jsem myš navrátil zpět do řádně označeného chovného boxu.

5.4.1 Stanovení úspěšnosti infekce

Po vyjmutí myši ze sklenice jsem z objemu ve sklenici automatickou pipetou náhodně odebral 20 vzorků po 50 μ l a v každém z nich jsem pod mikroskopem (zvětšení: 40x) zjišťoval počet živých cercárií, oddělených ocásků a oddělených hlaviček. Počet úspěšně penetrujících cercárií jsem získal po odečtení množství samostatných hlaviček od samostatných ocásků. Tímto krokem jsem vyčlenil ty cercárie, které do hostitele nepronikly, a přesto odhodily svůj ocásek. Získané hodnoty pro úspěšně penetrující a nepenetrující cercárie jsem posléze převedl na celý objem ve sklenici, který jsem nakonec zjistil pomocí odměrného válce.

5.5 Vyšetření hostitelů

Nakažené myši byly usmrcovány 3. den p. i. cervikální dislokací, kdy smrt zvířete způsobí celkové trauma organismu po přerušení spojení míchy a mozku kmene v oblasti krční páteře. Smrcení zvířat bylo vždy prováděno osobou způsobilou k této činnosti podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Z usmrceného zvířete jsem vypitval plíce a játra, oba orgány jsem opláchl v Tris¹ pufru a rozdělil je po menších částech do Petriho misek s Tris pufrem. Pinzetami jsem orgány najemno rozedral – plíce jsem zpracovával vždy celé, u jater jsem zpracoval vždy jen 3 náhodně vybrané laloky. Misky s roztrhanou tkání jsem umístil ještě alespoň na 20 minut pod intenzivní zdroj světla, abych stimuloval vylézání schistosomul z tkáně. Pokud byla tkáňová suspenze kvůli velkému množství krve špatně průhledná, rozdělil jsem její objem do 2 misek a dořídil Tris pufrem.

Schistosomula jsem v roztrhané tkáni hledal při bočním nasvícení pod binokulární lupou se zvětšením v rozsahu 0,8x–5x. Nalezená schistosomula jsem odebíral automatickou pipetou do hodinového skla pro další zpracování, viz kap. 5.6.

5.6 Fixace a měření schistosomul

Schistosomula vypitvaná z plic jsem po odsátí Tris pufru fixoval co nejdříve po vynětí z natrhané tkáně (max. do 1 hodiny) vroucím 4% formaldehydem. Fixovaná schistosomula jsem přenesl na podložní sklíčko, vyfotil pomocí mikroskopu s kamerou (Olympus BX51) a změřil v programu QuickPHOTO MICRO (verze 2.3).

5.7 Příprava a zpracování histologických preparátů

Neporušené plíce a játra z usmrcené myši jsem ihned po vynětí přenesl do zkumavky s fixační tekutinou (Bouinova fixáž²) a nechal jsem zkumavky nejméně 24 hodin míchat na překlápěcí třepačce.

Fixáž z orgánů jsem vypíral několika lázněmi 75% ethanolu, dokud se uvolňovala žlutá kyselina pikrová. Tkáně jsem následně odvodnil vzestupnou

¹ Pro přípravu Tris pufru jsem rozpustil 1,21 g Tris (TRIZMA ® base, Sigma-Aldrich) a 4,38 g NaCl v 500 ml destilované H₂O; pH jsem upravil pomocí 1M HCl na hodnotu 7,6.

² Složení fixáže: 5% kyselina octová, 9% formaldehyd, 0,9 % kyselina pikrová

alkoholovou řadou (75%, 96%, 100% ethanol). Odvodněné orgány jsem prosytil xylenem a vložil do nasycené směsi xylen/parafin. Čistým parafinem jsem vzorky prosycoval v termostatu předehřátém na 56 °C. Z poslední parafinové lázně jsem preparáty přenesl do silikonové formy a zalil čerstvým parafinem. Parafinové bločky jsem do dalšího zpracování ponechal při pokojové teplotě. Zalévání tkání jsem prováděl podle následujícího protokolu (podle Kliky a Vacka (1974), optimalizováno).

Postup:

- Odvodnění
 - 75% ethanol (3x 30 minut)
 - 96% ethanol (3x 30 minut)
 - 100% ethanol (3x 30 minut)
- Projasnění
 - Xylen I (30 minut)
 - Xylen II (30 minut)
- Prosycení parafinem
 - Parafin/xylen (10 minut)
 - Parafin I (30 minut)
 - Parafin II (30 minut)
 - Parafin III (30 minut)

Ztuhlé parafinové bločky s plicemi a játry jsem krájel na rotačním mikrotomu (SHANDON Finesse ME) na řezy o tloušťce 6 a 8 µm. Vzniklou pásku se 3–4 řezy jsem pinzetou přemístil na hladinu vody ohřáté na 37 °C. Po narovnání řezů jsem pásky umístil na označená podložní sklíčka a nechal přilnout na ploténce o teplotě 37 °C.

Aby bylo možné parafinové řezy nabarvit, preparáty jsem postupně odparafinoval a zavodnil. K barvení řezů jsem využil klasické kombinace histologických barviv – směsi hematoxylin-eosin. Obarvené tkáně jsem před zamontováním do kanadského balzámu či DPX média odvodnil a projasnil xylenem. Všechny operace s preparáty jsem prováděl ve skleněných kyvetách podle následujícího protokolu (podle Kliky a Vacka (1974), optimalizováno).

Postup:

- Odparafinování
 - Xylen I (10 minut)
 - Xylen II (10 minut)
- Zavodnění
 - 100% ethanol (2 minuty)
 - 96% ethanol (2 minuty)
 - 75% ethanol (2 minuty)
 - H₂O (2 minuty)
- Barvení
 - Ehrlichův hematoxylin (5 minut)
 - Promývání vodou do vyplavování hematoxylinu
 - Diferenciace v kyselém ethanolu³ do zmodrání jader
 - Eosin (15 sekund)
 - Promývání vodou do vyplavování eosinu
- Odvodnění
 - 75% ethanol (1 minuta)
 - 96% ethanol (1 minuta)
 - 100% ethanol (1 minuta)
- Projasnění
 - Xylen (1 minuta)
- Zamontování do montovacího média (kanadský balzám / DPX médium)
- Zakrytí preparátů krycími sklíčky
- Zatížení preparátů kovovými maticemi

Obarvené řezy jsem po zaschnutí a očištění sklíček vyfotil pomocí mikroskopu s kamerou (Olympus BX51) v programu QuickPhoto MICRO (verze 2.3). Fotografie jsem následně upravil v programu GIMP (verze 2.8) (ořezání, vyvážení bílé, sklad snímků do panelu).

³ Kyselý ethanol jsem připravil přidáním 3 kapek koncentrované HCl do 100 ml 70% ethanolu.

5.8 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat jsem prováděl v programu GraphPad Prism (verze 6). U každého souboru jsem nejprve pomocí Shapirova-Wilkova testu ověřil normalitu dat. Pro srovnání dvou skupin (úspěšnost penetrace cercárií, počet schistosomul nalezených v plicích, počet pohyblivých, resp. nepohyblivých schistosomul, délka schistosomul) jsem použil dvoustranný nepárový Studentův t-test. Míru korelace počtu penetrujících cercárií a počtu schistosomul nalezených v plicích jsem hodnotil pomocí Pearsonova korelačního koeficientu r . Hladina významnosti byla u všech testů stanovena na $\alpha = 0,05$.

6 Výsledky

Cerkáriemi *T. szidati* bylo celkem infikováno 36 laboratorních myší C57BL/6: 20 myší bylo zařazeno do kontrolní skupiny (skupina K), 16 myším byl před a v průběhu infekce podáván inhibitor iNOS aminoguanidin (skupina AMG), viz Tabulka 3 (na následující straně).

Při vyhodnocování úspěšnosti penetrace cercárií byla kvůli neúměrně vysoké infekční dávce (chyba v přípravě infekční dávky) vyňata data od 2 myší (vyloučení extrémní hodnoty) z AMG skupiny, viz Tabulka 3.

Do analýz týkajících se relativního počtu a pohyblivosti schistosomul v plicích 3 dny p. i. nebyla k dispozici data celkově od 6 myší, neboť: (i) plíce 2 myší z každé skupiny byly využity pro histologické zpracování; (ii) počet schistosomul v plicích 1 myši ze skupiny K nebyl zaznamenán; (iii) 1 myš z AMG skupiny byla v den pitvy (3. den p. i.) nalezena mrtvá. Při zjišťování relativního počtu schistosomul v plicích nebyla do statistiky také zahrnuta data od 1 myši z AMG skupiny, u níž došlo k nepřesnému určení velikosti infekční dávky (vyloučení extrémní hodnoty), viz Tabulka 3.

Za účelem měření délky byla izolována a uschována schistosomula od 8 myší (celkem 49 schistosomul) ze skupiny K a od 5 myší (celkem 41 schistosomul) z AMG skupiny, viz Tabulka 3.

Kromě 1 uhynulé myši (viz výše) nebyla 3. den p. i. u ostatních myší pozorována žádná jiná viditelná zhoršení zdravotního stavu (nepohyblivost, dezorientace apod.).

Tabulky dokumentující výsledky pro jednotlivá experimentální zvířata jsou součástí přílohy.

Tabulka 3: Počty myší využitých pro statistické vyhodnocování jednotlivých experimentů, podrobněji výše v textu.

	Skupina K	Skupina AMG
Infikováno	20	16
Úspěšnost penetrace	20	14*
Relativní počet schistosomul v plicích	17*#	12*#
Pohyblivost schistosomul	17*#	13#
Měření délky schistosomul	5	8
Histopatologie	2	2

* Nižší počet z důvodu subjektivní chyby.

Nižší počet z důvodu objektivní skutečnosti.

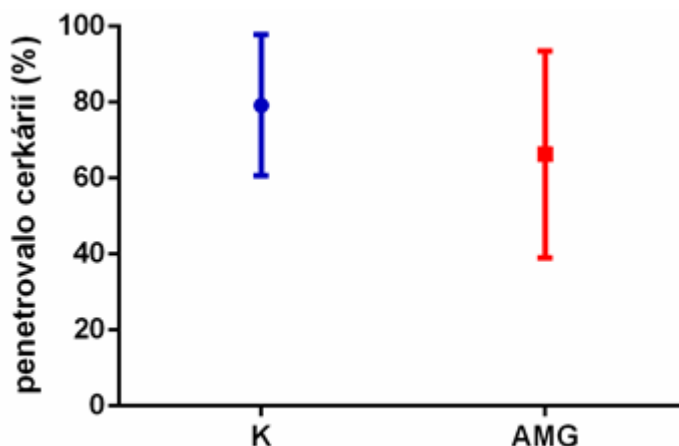
6.1 Úspěšnost penetrace

Relativní úspěšnost penetrace cercárií, stanovená jako podíl penetrujících cercárií ku počtu cercárií použitých k infekci (1500), dosahovala u myší ze skupiny K 79,20 %⁴ ($\pm 18,56$ %, $n = 20$) a v případě myší z AMG skupiny 66,29 % ($\pm 27,26$ %, $n = 14$), viz Obrázek 5 (na následující straně). Podání inhibitoru nemělo vliv na podíl úspěšně penetrovaných cercárií ($p^5 = 0,11$; nepárový t-test).

⁴ Není-li uvedeno jinak, jsou data prezentována vždy jako průměr \pm směrodatná odchylka, n udává počet vzorků.

⁵ Hodnota udávající pravděpodobnost, s jakou je pozorovaný rozdíl způsoben náhodou.

Obrázek 5: Relativní úspěšnost penetrace cercárií u skupiny K a AMG. Podání inhibitoru nemělo na úspěšnost penetrace vliv ($p > 0,05$)⁶.

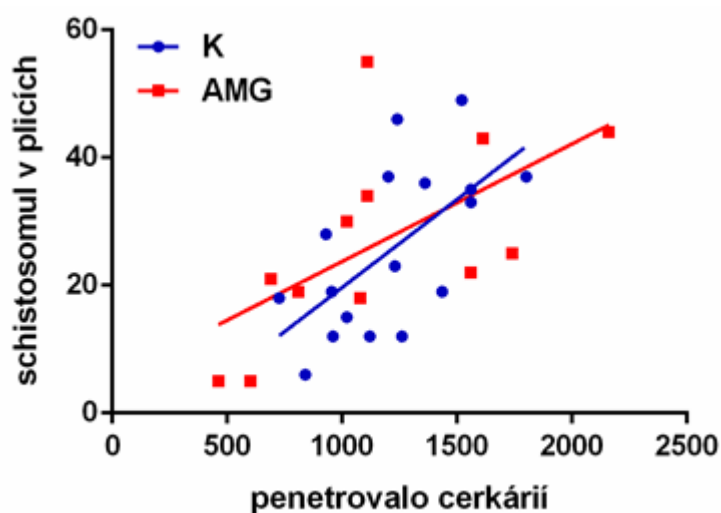


6.2 Počet schistosomul ve vyšetřovaných orgánech

V natrhané plicní tkáni myši ze skupiny K bylo nalezeno 6–49 schistosomul, u myši z AMG skupiny 5–55 schistosomul. Počet nalezených schistosomul v obou skupinách průkazně pozitivně koreloval s počtem penetrovaných cercárií ($r(K) = 0,63$, $p(K) = 0,007$; $r(AMG) = 0,62$, $p(AMG) = 0,03$; Pearsonův korelační test), viz Obrázek 6 (na následující straně).

⁶ Není-li uvedeno jinak, značky v grafech vždy zobrazují průměry jednotlivých skupin a chybové úsečky pak představují směrodatné odchylky.

Obrázek 6: Počty schistosomul z plicní tkáně vztažené k počtu úspěšně penetrujících cercárií s proloženou spojnicí trendu u K a AMG skupiny. U obou skupin byla prokázána pozitivní korelace hodnot ($p < 0,05$).

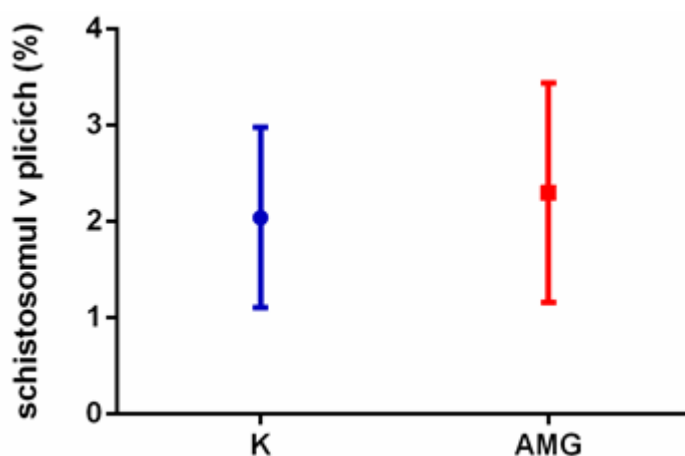


U myší, u nichž byl zjišťován počet schistosomul v plicích, byly také vždy vyšetřeny 3 (z celkem 4) náhodně vybrané laloky jater. V játrech myší ze skupiny K bylo nalezeno celkem 5 schistosomul (tj. průměrně 0,29/myš), v případě myší ze skupiny AMG byla zaznamenána celkem 3 schistosomula (tj. průměrně 0,25/myš).

6.3 Relativní úspěšnost migrace

Relativní počet schistosomul nalezených v plicích, vztažený na počet úspěšně penetrovaných cercárií, dosahoval u skupiny K 2,07 % ($\pm 0,87$ %, $n = 17$) a v případě myší z AMG skupiny, kterým byl podáván AMG, 2,30 % ($\pm 1,14$ %, $n = 12$), viz Obrázek 7 (na následující straně). Přítomnost AMG významně neovlivnila podíl schistosomul, která po úspěšné penetraci domigrovala do plic ($p = 0,23$, nepárový t-test).

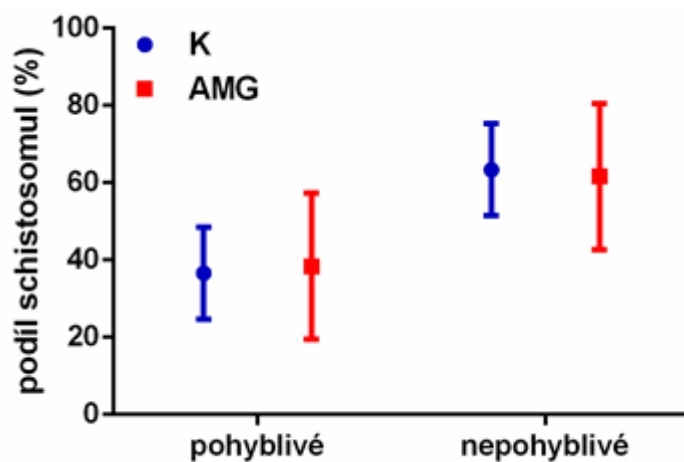
Obrázek 7: Relativní počet schistosomul v plicích myší ze skupiny K a AMG (vztaženo k počtu penetrujících cercárií). Podání AMG nezpůsobilo změnu podílu schistosomul nalezených v plicích ($p > 0,05$).



6.4 Pohyblivost schistosomul v plicích

Z celkového počtu nalezených schistosomul bylo v plicích myší ze skupiny K nalezeno 36,60 % ($\pm 11,90$ %, $n = 17$) pohyblivých schistosomul a 63,40 % ($\pm 11,90$ %, $n = 17$) nepohyblivých schistosomul. V plicích myší z AMG skupiny bylo 38,37 % ($\pm 18,90$ %, $n = 13$) schistosomul označeno za pohyblivé a 61,63 % ($\pm 18,90$ %, $n = 13$) schistosomul jako nepohyblivé, viz Obrázek 8 (na následující straně). Podíl pohyblivých schistosomul byl u skupiny K i AMG nižší než podíl nepohyblivých schistosomul ($p < 0,01$), avšak mezi skupinami (K \times AMG) se podíl pohyblivých (resp. nepohyblivých) schistosomul nelišil ($p = 0,76$).

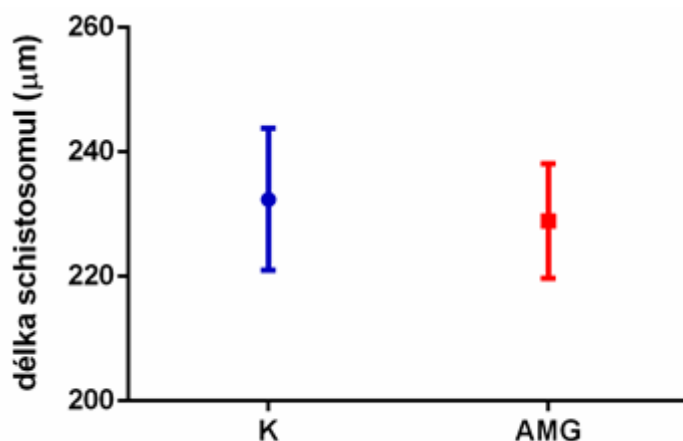
Obrázek 8: Zastoupení pohyblivých a nepohyblivých schistosomul v plicích myší ze skupiny K a AMG. Vliv AMG na změnu podílu ne/pohyblivých schistosomul nebyl prokázán ($p > 0,05$).



6.5 Délka schistosomul

Izolovaná schistosomula z plicní tkáně myší ze skupiny K dosahovala délky $228,9 \mu\text{m}$ ($\pm 9,24 \mu\text{m}$; $n = 8$); schistosomula izolovaná z myší z AMG skupiny, na délku měřila $232,4 \mu\text{m}$ ($\pm 11,37 \mu\text{m}$; $n = 5$), viz Obrázek 9 (na následující straně). Přítomnost AMG významně neovlivnila délku schistosomul nalezených v plicích ($p = 0,56$; nepárový t-test).

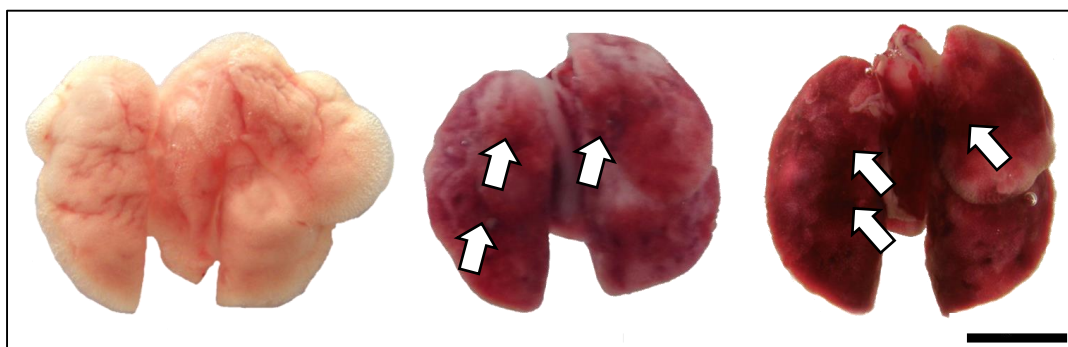
Obrázek 9: Průměrné délky schistosomul nalezených v plicích myší ze skupiny K a AMG. Působení AMG nemělo na velikost schistosomul v plicích vliv ($p > 0,05$).



6.6 Patologické a histopatologické vyšetření plicní tkáně

Makroskopické pozorování plic odhalilo viditelné zakrvácení tkáně a povrchové léze u obou skupin (K i AMG). Zakrvácení plicní tkáně bylo intenzivnější u plic myší z AMG skupiny (viz Obrázek 10)

Obrázek 10: Makroskopická patologie plic (3. den p. i.) myší ze skupiny K (uprostřed), AMG (vpravo) s viditelnými povrchovými lézemi (bílé šipky) v porovnání s plicemi neinfikované myši (vlevo). Měřítko odpovídá 5 mm.



Histopatologicky byly vyšetřeny vzorky plic ze 2 myší ze skupiny K a 2 myší ze skupiny AMG. U každého vzorku bylo provedeno alespoň 20 sériových podélných řezů ve frontální rovině při tloušťce řezu 6 a 8 µm. Celkem bylo tedy pro každý vzorek barveno a vyhodnocováno minimálně 40 řezů. Pro zhodnocení patologie byly jako zdravé kontroly použity vzorky plic ze 2 neinfikovaných myší téhož kmene chovaných v témže chovném zařízení.

Ve zkoumaných vzorcích od myší skupiny K bylo nalezeno celkem 16 schistosomul, ve vzorcích od myší skupiny AMG bylo pozorováno celkem 13 schistosomul. Schistosomula se nacházela v alveolech i alveolárních stěnách a pozorována byla ve středových i okrajových částech plic, viz Tabulku 4.

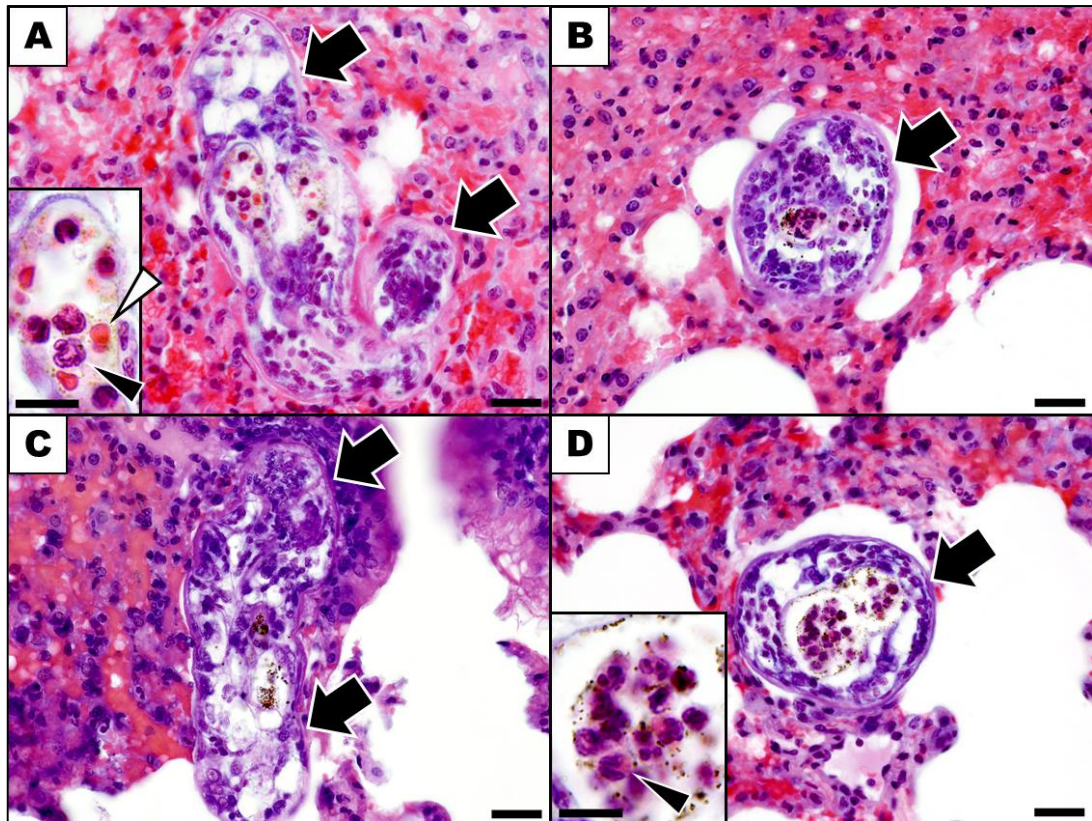
Tabulka 4: Počty schistosomul nalezených v histologických řezech plícemi infikovaných myší.

	Skupina K		Skupina AMG	
	v alveolech	ve stěně alveolů	v alveolech	ve stěně alveolů
Střed plic	5	5	6	6
Okraj plic	1	5	0	1

Plicní tkáň přiléhající ke schistosomulům byla u obou skupin překrvená (kongesce), avšak výrony krve do dýchacích cest pozorovány nebyly, stejně tak tkáň nejevila známky otoku. V okolí schistosomul nebyla ani u jedné ze skupin pozorována zánětlivá infiltrace tkáně leukocyty.

V obou sledovaných skupinách (K i AMG) byla nalezena schistosomula zachycená v příčných i podélných řezech, viz Obrázek 11 (na následující straně). Ani v jedné ze skupin nebylo zaznamenáno poškození povrchu schistosomul či porušení jejich vnitřních struktur pozorovatelné světelným mikroskopem. Uvnitř střev schistosomul byly v obou skupinách detekovány erytrocyty, neutrofilní a eosinofilní granulocyty a hnědá granula hemozoinu (Obrázek 11 A, D – výřezy).

Obrázek 11: Schistosomula *T. szidati* (černé šipky) v plicích infikovaných myší K (A, B) a AMG skupiny (C, D). Ve všech případech je patrné překrvení okolní tkáně, avšak zánětlivý infiltrát není přítomen. Střeva schistosomul (výřezy A a D) obsahují granulocyty (černý trojúhelník), erythrocyty (bílý trojúhelník) a hnědá granula hemozoinu. Barveno hematoxylinem a eosinem, tloušťka řezů 8 μm . Měřítka odpovídají 10 μm , ve výřezech 5 μm .



7 Diskuze

Ačkoliv se NO začíná v současnosti považovat za významnou efektorovou složku imunitní odpovědi při helmintárních nákazách, jednotlivé studie zabývající se touto problematikou se v získaných výsledcích často vzájemně liší. Nejvýrazněji jsou tyto rozdíly patrné při srovnávání výsledků studií prováděných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Totiž, zatímco *in vitro* byly toxické účinky NO prokázány u larválních stádií několika helmintů: *Schistosoma mansoni* (McLaren a James 1985, Esparza 1987), *Brugia malayi* (Hartmann a kol. 2002), *Trichinella spiralis* (Wang a kol. 2015), *Echinococcus granulosus* (Zeghir-Bouteldja a kol. 2013), *in vivo* experimenty tato zjištění však ve většině případů nepotvrdily, či doposud nebyly provedeny: *Schistosoma mansoni* (Coulson a kol. 1998), *Trichinella spiralis* (Kołodziej-Sobocińska 2006).

Pokusy *in vivo* tedy nepochybně způsobily v problematice působení NO v rámci imunitní odpovědi významný převrat. Díky tomu je v současnosti tlak na to, aby byly výsledky získané v *in vitro* experimentech ověřovány i v *in vivo* modelech, aby bylo možné posoudit, nakolik *in vitro* situace odpovídá stavu při reálné infekci. I proto se tato práce zabývala pozorováním vlivu NO na regulaci migrace larválních stádií *T. szidati* náhodným hostitelem, tedy studovala reálný *in vivo* systém. Jde o první práci, která se věnuje sledování tohoto fenoménu u ptačích schistosom, které jsou významným srovnávacím modelem pro schistosomy lidské.

Předkládané výsledky vlivu NO v regulaci migrace schistosomul *T. szidati* v náhodném savčím hostiteli (myš kmene C57BL/6) nepotvrdily, neboť počet schistosomul nalezených v plicích kontrolní skupiny (vyjádřený relativně ku počtu penetrujících cercárií) nebyl odlišný od této hodnoty v AMG skupině. Relativní počet schistosomul nalezených v plicích dosahoval u kontrolní skupiny průměrné hodnoty 2,1 %, u skupiny AMG 2,3 %.

Dřívější studie Haase a Pietsche (1991) detekující radioaktivně značená schistosomula *T. szidati* v plicích myší kmene NMRI uvádí hodnotu relativního počtu schistosomul 9,5 %, tedy více jak čtyřnásobně vyšší než v mém případě. Příčinou odlišných výsledků by zde mohl být jeden z následujících faktorů: (i) jiný způsob infekce hostitelů (přes kůži na břicho), (ii) odlišná polarizace imunitní odpovědi myší kmene C57BL/6 a NMRI nebo (iii) využití odlišné metody při

hledání schistosomul v plicní tkáni. Při hledání schistosomul v natrhané plicní tkáni totiž mohla při našich experimentech některá ze schistosomul zůstat, a způsobit tak zkreslení výsledků. Radioaktivní značení se oproti této metodě jeví jako spolehlivější; pro lepší záchyt parazitů by bylo možné využít i 3D zobrazovací techniky. Ty byly úspěšně použity například pro sledování orgánové lokalizace příbuzného druhu *Trichobilharzia regenti* (Bulantová a kol. 2016).

Hypotézu, že NO není jednou z efektorových molekul, které se podílejí na regulaci infekce *T. szidati*, podporují další skutečnosti. Za prvé se neliší podíl pohyblivých a nepohyblivých schistosomul v kontrolní a AMG skupině, ač například u mikrofilárií hlístic *Brugia malayi* a *Onchocerca linealis* bylo *in vitro* dokumentováno, že NO jejich pohyblivost výrazně snižuje (Taylor a kol. 1996). Výsledky této analýzy však mohla v našich experimentech ovlivnit (a) doba mezi natrháním plicní tkáně a počítáním vymigrovaných schistosomul (během níž mohla uvolněná schistosomula uhynout v pufrujícím roztoku) a také (b) skutečnost, že případná nepohyblivá (~ mrtvá) schistosomula zůstala ve tkáni, ze které nebyla pasivně uvolněna při jejím trhání.

Další skutečností podporující hypotézu o nevýznamném vlivu NO na regulaci migrace je fakt, že mezi schistosomuly z kontrolní a AMG skupiny nebyl pozorován žádný rozdíl ve velikosti. Ten by mohl být případně zapříčiněn působením NO například na enzymy energetického metabolismu, v důsledku jejichž poškození by byl zpomalený vývoj a růst parazita (Bogdan 2015). Srovnání absolutní délky schistosomul z mých experimentů s daty Horáka a Kolářové (2000) není možné, jelikož tito autoři měřili délku živých, ne fixovaných schistosomul.

Podobně jako v mém případě, nebyl význam NO při regulaci průběhu infekce prokázán u příbuzné *S. mansoni* (Coulson a kol. 1998) či u hlístice *Trichinella spiralis* (Kołodziej-Sobocińska 2006). Naproti tomu role NO v imunitní odpovědi hostitelů při helmintárních infekcích byla potvrzena u modelových organismů *Brugia malayi* (Rajan a kol. 1996) a *Strongyloides venezuelensis* (Ruano a kol. 2015).

Informace týkající se role NO v imunitní odpovědi hostitelů při helmintárních infekcích působí tedy přinejmenším nejednotně, a je proto velmi obtížné z nich vyvozovat všeobecné závěry. Zvláště v případě, když odlišné výsledky nenalzáme pouze při mezidruhovém srovnání, nýbrž také v rámci jednoho druhu. Příkladem může být rozepře mezi tím, zda přítomnost hlístice

Trichinella spiralis vyvolává (Wandurska-Nowak a Wiśniewska 2002), či potlačuje (Bian a kol. 2001) produkci NO u hostitele. Za těmito velmi rozličnými výsledky podle mého názoru stojí nesjednocení metod, které byly při vyšetřování hostitelů použity.

V kontextu infekcí náhodných hostitelů ptačími schistosomami a nálezů schistosomul v jejich plicích je dále zajímavé zmínit a diskutovat ještě dvě skutečnosti, které jsem při experimentech zjistil, ačkoliv přímo nesouvisejí s problematikou vlivu NO na regulaci infekce. Předně jde o průkaz pozitivní korelace mezi počtem penetrujících cercárií a schistosomul nalezených v plicích, což u ptačích schistosom zatím nebylo v literatuře dokumentováno, byť jde o předpokládatelný jev.

Druhou zajímavostí byla skutečnost, že jsem při infekcích myší zaznamenal vysokou úspěšnost penetrace cercárií (66,3 % u kontrolní a 79,2 % u AMG skupiny). Ačkoliv v předchozí studii Haase a Pietsche (1991) zabývající se migrací *T. szidati* v náhodném hostiteli (myš kmene NMRI) autoři zaznamenali při stejném způsobu infekce úspěšnost penetrace cercárií ($n = 200$) pouze 3,1 % a v případě infekce přes abdominální kůži 25 %. Domnívám se, že za rozdílné hodnoty by mohl být zodpovědný alespoň jeden z následujících faktorů: (i) ovlivnění životaschopnosti cercárií radioaktivním značením, (ii) odchylky v postupu při infekci myší (defekace myší, zastínění cercárií v průběhu infekce, infekce přes končetiny a ocásek, infekce přes abdominální kůži apod.), (iii) různě zvolená infekční dávka.

Ačkoliv se ze získaných výsledků zdá, že se NO nepodílí na likvidaci či poškození schistosomul *T. szidati*, a ani neovlivňuje jejich migraci, makroskopicko-patologické vyšetření infikovaných plic však nasvědčuje tomu, že by se NO na regulaci působené patologie podílet mohl. V periferní části plic infikovaných myší byly u kontrolní i AMG skupin nalezeny četné hemoragie a léze, korespondující s výsledky předchozích studií (Chanová a kol. 2007, Olivier 1953). Intenzivnější zkrvavení plic myší z AMG skupiny však naznačuje výše zmiňovanou účast NO ve zmírňování projevů infekce. Toto bylo prokázáno například při infekcích savčích hostitelů *S. mansoni*, při nichž NO reguluje poškození tkáně a zmírňuje tvorbu jaterních granulomů vznikajících kolem vajíček (Oliveira a kol. 1998; Brunet a kol. 1999; Hirata a kol. 2001). Tato hypotéza však vyžaduje další ověření.

Na rozdíl od Chanové a kol. (2007), kteří schistosomula při histopatologickém vyšetření tkáně pozorovali pouze ve stěnách alveolů, se mi podařilo schistosomula zachytit také v alveolárním prostoru. Plicní tkáň přiléhající ke schistosomulům byla ve všech případech překrvená, avšak nejevila žádné známky otoku nebo infiltrace leukocytů, ač tyto projevy Chanová a kol. (2007) pozorovali. U nalezených schistosomul jsem v ani jednom případě nezaznamenal jakékoli poškození tegumentu viditelné světelným mikroskopem, což koresponduje s pozorováním Horáka a Kolářové (2000), kteří poškození povrchu nedetekovali ani pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Tyto skutečnosti opět podporují výše uvedenou hypotézu, že NO patrně není zodpovědný za regulaci migrace schistosomul *T. szidati* v myších a není faktorem, který ovlivňuje jejich přežívání v tomto náhodném hostiteli.

8 Závěr

V předkládané práci jsem se zabýval vlivem NO na regulaci migrace subadultních stádií ptačí motolice *Trichobilharzia szidati* v náhodném savčím hostiteli.

Srovnání dat získaných od kontrolní skupiny myší a myší, jímž byl podáván inhibitor iNOS (aminoguanidin), vliv NO v regulaci migrace schistosomul v náhodném hostiteli neprokázalo. Konkrétně jsem zjistil, že:

- NO neměl prokazatelný vliv na počet, pohyblivost ani velikost parazitů nalezených v plicích infikovaných hostitelů.
- na povrchu plic myší z obou skupin byly přítomny hemoragie, které však byly intenzivnější u myší z AMG skupiny. To naznačuje, že NO by mohl sloužit jako faktor, který reguluje rozvoj patologie, která je v jeho nepřítomnosti závažnější.
- histopatologické vyšetření plic odhalilo u obou skupin myší překrvení plicní tkáň přiléhající k schistosomulům, avšak bez přítomnosti otoku či lymfocytárního infiltrátu.

Ačkoliv se jedná o prvotní experimenty zabývající se prezentovanou tematikou, výsledky této práce přispěly k objasnění vlivu NO v regulaci migrace ptačí motolice *T. szidati* v náhodném savčím hostiteli. K úplnému porozumění role NO v imunitní odpovědi náhodných hostitelů při infekcích *T. szidati* bude však zapotřebí předkládané hypotézy ještě ověřit.

V průběhu absolvování této stáže jsem se seznámil s některými postupy a metodami uplatňujícími se při výzkumu parazitů a statistickém vyhodnocování dat. Při sepisování této práce jsem se dále naučil pracovat s odborným textem či plánovat činnosti z hlediska delšího časového období. Za největší přínos ovšem pokládám naučení se práce s cizojazyčnou literaturou, obeznámení se s vysokoškolským prostředím a možnost komunikace s lidmi z vědecké sféry.

9 Seznam použité literatury

AHMED, S.F., OSWALD, I.P., CASPAR, P., HIENY, S., KEEFER, L., SHER, A., JAMES, S.L. Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.*, 1997, 65, 219–226.

ANDRADE, M.A., SILES-LUCAS, M., ESPINOZA, E., PÉREZ-ARELLANO, J.L., GOTTSTEIN, B., MURO, A. Echinococcus multilocularis laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide*, 2004, 10, 150–155.

BIAN, K., HARARI, Y., ZHONG, M., LAI, M., CASTRO, G., WEISBRODT, N., MURAD, F. Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase (NOS-2) during parasite-induced gut inflammation: a path to identify a selective NOS-2 inhibitor. *Mol. Pharmacol.*, 2001, 59, 939–947.

BOURNS, T., ELLIS, F.C., RAU, M.E. Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck hosts. *Can. J. Zool.*, 1973, 51, 1021–1030.

BRUNET, L.R., BEALL, M., DUNNE, D.W., PEARCE, E. J. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. *The Journal of Immunology*, 1999, 163, 4976–4984.

BULANTOVÁ, J., MACHÁČEK, T., PANSKÁ, L., KREJČÍ, F., KARCH, J., JÄHRLING, N., SAGHAFI, S., DODT, H. U., HORÁK, P. *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates. *Micron*, 2016, 83, 62–71.

BURKE, M.L., JONES, M.K., GOBERT, G.N., ELLIS, M.K., MCMANUS, D.P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.*, 2009, 31, 163–176.

COULSON, P.S., SMYTHIES, L.E., BETTS, C., MABBOTT, N.A., STERNBERG, J.M., WEI, X.G., LIEW, F.Y., WILSON, R.A. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent causing challenge parasite elimination. *Immunology*, 1998, 93, 55–63.

ESPARZA, I., MÄNNEL, D., RUPPEL, A., FALK, W., KRAMMER, P.H. Interferon gamma and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 589–594.

FEILER, W., HAAS, W. *Trichobilharzia ocellata*: chemical stimuli of duck skin for cercarial attachment. *Parasitology*, 1988, 96, 507–517.

GRABE, K., HAAS, W. Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. *Parasitol. Res.*, 2004a, 93, 111–113.

GRABE, K., HAAS, W. Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. *Int. J. Parasitol.*, 2004b, 34, 927–934.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, 2006, 23, 1106–1118.

HAAS, W., PIETSCH, U. Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitol. Res.*, 1991, 77, 621–644.

HARTMANN, S., SCHÖNMEYER, A., SONNENBURG, B., VRAY, B., LUCIUS, R. Cystatins of filarial nematodes up-regulate the nitric oxide production of interferon-gamma-activated murine macrophages. *Parasite Immunol.*, 2002, 24, 253–262.

HIRATA, M., HIRATA, K., KAGE, M., ZHANG, M., HARA, T., FUKUMA, T. Effect of nitric oxide synthase inhibition on *Schistosoma japonicum* egg-induced granuloma formation in the mouse liver. *Parasite Immunol.*, 2001, 23, 281–289.

HORÁK, P. Motolice – parazitičtí červi s nejkomplicovanějšími životními cykly. *Živa*, 2010, 5, 230–232.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biol.*, 2011, 56, 779–790.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. Survival of bird schistosomes in mammalian lungs. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 65–68.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L., ADEMA, C.M. Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Adv. Parasitol.*, 2002, 52, 155–233.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L., MIKEŠ L. Schistosomatoidea and Diplostomoidea. V TOLEDO, R., FRIED, B. (Ed.). *Digenetic Trematodes*. 1. vyd. New York: Springer, 2014, 331–364.

HORÁK, P., MIKEŠ, L. Helmintologie. In HORÁK, P., VOLF, P. (Ed.). *Paraziti a jejich biologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.

HORÁK, P., MIKEŠ, L., LICHTENBERGOVÁ, L., SKÁLA, V., SOLDÁNOVÁ, M., BRANT, S.V. Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, 28, 165–190.

HORÁK, P., SCHOLZ, T. *Biologie helmintů*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-782-8.

CHANOVÁ, M., VUONG, S., HORÁK, P. *Trichobilharzia szidati*: the lung phase of migration within avian and mammalian hosts. *Parasitol. Res.*, 2007, 100, 1243–1247.

JAMES, S.L., GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.*, 1989, 143, 4208–4212.

KALBE, M., HABERL, B., HAAS, W. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of “miracidia-attracting glycoproteins”. *Exp. Parasitol.*, 2000, 96, 231–242.

KLIKA, E., VACEK, Z. *Histologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1974. ISBN 08-084-74.

KOCK, S. Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology*, 2001, 123, 67–70.

KOLÁŘOVÁ, L. Cerkárióvá dermatitida stále aktuální – spektrum patogenních agens a jejich vývoj v nespecifickém hostiteli. *Remedia - Klinická mikrobiologie*. 1999, 3, 260–267.

KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P., SKÍRNISSON, K., MAREČKOVÁ, H., DOENHOFF, M. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clinic Rev. Allerg. Immunol.*, 2013, 45, 63–74.

KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, M. Influence of free radicals on *Trichinella spiralis* infection in mice. *Wiad Parazytol Journal*, 2006, 52, 239–241.

KOUŘILOVÁ, P., HOGG K.G., KOLÁŘOVÁ L., MOUNTFORD A.P. Cercarial dermatitis caused by bird Schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *J. Immunol.* 2004, 172, 3766-3774.

KUPKOVÁ, Z., BENEŠ, L. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy*, 2004, 98, 116–122.

LAWRENCE, C., PETERSON, J., WEI, X., LIEW, F., GARSIDE, P., KENNEDY, M. Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. *J. Immunol.*, 2000, 164, 4229–4234.

McLAREN, D.J., JAMES, S.L. Ultrastructural studies of the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by activated macrophages in vitro. *Parasite Immunol.*, 1985, 7, 315–331.

MISKO, T.P., MOORE, W.M., KASTNE, T.P., NICKOLS, G.A., CORBETT, J.A., TILTON, R.G, McDANIEL, M.L., WILLIAMSON, J.R., CURRIE, M.G. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, 233, 119–125.

MURO, A., PÉREZ-ARELLANO, J.L. Nitric oxide and respiratory helminthic diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2010, 1–8.

NEUHAUS, W. Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1952, 15, 203–266.

OLIVEIRA, D.M., SILVA-TEIXEIRA, D.N., CARMO, S.A., GOES, A.M. Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansoni: upregulation of in vitro granuloma formation by N omega-nitro-L-argininemethylester. *Nitric Oxide*, 1998, 2, 57–65.

OLIVIER, L. Observations on the migration of avian schistosomes in mammals previously unexposed to cercariae. *J. Parasitol.*, 1953, 39, 237–246.

RAJAN, T., PORTE, P., YATES, J., KEEFER, L., SHULTZ, L.D. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 3351–3353.

RUANO, A.L., LÓPEZ-ABÁN, J., FERNÁNDEZ-SOTO, P., DE MELO, A.L., MURO, A. Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by *Strongyloides venezuelensis* in mice treated with dexamethasone. *Acta Trop.*, 2015, 152, 90–95.

RUDOLFOVÁ, J., HAMPL, V., BAYSSADE-DUFOUR, C., LOCKYER, A.E., LITTLEWOOD, D.T., HORÁK, P. Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitol. Res.*, 2005, 95, 79–89.

STEERS, N.J., ROGAN, M.T., HEATH, S. In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol.*, 2001, 23, 411–417.

STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. *Acta Biochim. Biophys.*, 1999, 5, 217–230.

TAYLOR, M.J., CROSS, H.F., MOHAMMED, A.A., TREES, A.J., BIANCO, A.E. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. *Parasitology*, 1996, 112, 315–322.

WANDURSKA-NOWAK, E., WIŚNIEWSKA, J. Release of nitric oxide during experimental trichinellosis in mice. *Parasitol. Res.*, 2002, 88, 708–711.

WANG, W., WANG, L., LIANG, Y.S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol. Res.*, 2012, 111, 1871–1877.

WANG, X.L., YANG, X.D., CHANG, X.L., WANG, Y.Y., CUI, J., ZHU, W., XIA, H., FANG, Q. In vitro killing of *Trichinella spiralis* muscle larvae by exogenous nitric oxide from SNP. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 2015, 27, 166–169.

WILSON, M.S., MENTINK-KANE, M.M., PESCE, J.T., RAMALINGAM, T.R., THOMPSON, R., WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell Biol.*, 2007, 85, 148–154.

ZEGHIR-BOUTELDJA, R., AMRI, M., BOUAZIZ, S., MEZIOUG, D., TOUIL-BOUKOFFA, C. Comparative study of nitric oxide (NO) production during human hydatidosis: relationship with cystic fluid fertility. *Parasitology Research*, 2013, 112, 649–654.

10 Internetové zdroje

CDC. Schistosomiasis. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2012 [cit. 2016-03-17]. Dostupné z: www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html.

ČURLINOVÁ, K. Svědivé pupeny a vyrážka, víkendové koupání se některým lidem nevyplatilo. *Sokolovský deník* [online]. 2015 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: www.sokolovsky.denik.cz/zpravy_region/svedive-pupeny-a-vyrazka-vikendove-koupani-se-nekterym-lidem-nevyplatilo-20150612.html.

JAROLÍMEK, M. Nekrmte kachny, napomáhá to cercariím. *Příbram* [online]. 2014 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: www.pribram.cz/clanek/nekrmte-kachny-napomaha-to-cerkariim/405/.

NEDVĚD, J. Bolevák není vhodný ke koupání, přemnožené larvy mohou zalézt pod kůži. *IDNES* [online]. 2013 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: www.plzen.idnes.cz/larvy-v-boleveckem-rybniku-ddo-/plzen-zpravy.aspx?c=A13-0711_103747_plzen-zpravy_ban.

REDAKCE ČTK. Voda v zákupském koupališti obsahuje cercárie. Způsobují svědivou vyrážku. *Českolipský deník* [online]. 2015 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: www.ceskolipsky.denik.cz/zpravy_region/voda-v-zakupskem-koupalisti-obsahuje-cerkarie-zpusobuji-svedivou-vyrazku-20150612.html.

WHO. Schistosomiasis. *World Health Organization* [online]. 2016 [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/.

11 Příloha

Příloha obsahuje tabulky dokumentující získané výsledky při experimentálních infekcích laboratorních myší z kontrolní a AMG skupiny ptačí motolicí *T. szidati*.

KONTROLNÍ SKUPINA

Exp.	Datum infekce	Úspěšná penetrace (abs.)	Úspěšná penetrace (rel.)	Datum pitvy	Počet schistosomul v plicích				Počet schist. v játrech		
					poh.	nepoh.	součet	rel.	poh.	nepoh.	součet
E01	11.8.2015	955	64%	14.8.2015	11	8	19	1,99%	0	0	0
E02	11.8.2015	726	48%	14.8.2015	5	13	18	2,48%	0	2	2
E03	18.8.2015	1360	91%	21.8.2015	8	28	36	2,65%	0	0	0
E04	18.8.2015	1435	96%	21.8.2015	5	14	19	1,32%	0	0	0
E05	25.8.2015	1520	76%	28.8.2015	15	34	49	3,22%	0	0	0
E06	25.8.2015	1120	56%	28.8.2015	5	7	12	1,07%	0	0	0
E07	25.8.2015	1560	78%	28.8.2015	8	25	33	2,12%	0	0	0
E08	1.9.2015	1800	120%	4.9.2015	16	21	37	2,06%	0	3	3
E09	1.9.2015	1240	83%	4.9.2015	18	28	46	3,71%	0	0	0
E10	1.9.2015	1200	80%	4.9.2015	11	26	37	3,08%	0	0	0
E11	22.9.2015	960	64%	25.9.2015	4	8	12	1,25%	0	0	0
E12	22.9.2015	1560	104%	25.9.2015	16	19	35	2,24%	0	0	0
E13	22.9.2015	840	56%	25.9.2015	1	5	6	0,71%	0	0	0
E14	29.9.2015	1200	80%	2.10.2015	nezaznamenáno						
E15	29.9.2015	1020	68%	2.10.2015	9	6	15	1,47%	0	0	0
E16	29.9.2015	1260	84%	2.10.2015	5	7	12	0,95%	0	0	0
E17	13.10.2015	1260	84%	16.10.2015	histologie						
E18	13.10.2015	1230	82%	16.10.2015	9	14	23	1,87%	0	0	0
E19	13.10.2015	930	62%	16.10.2015	12	16	28	3,01%	0	0	0
E20	13.10.2015	1620	108%	16.10.2015	histologie						

AMG SKUPINA

Exp.	Datum infekce	Úspěšná penetrace (abs.)	Úspěšná penetrace (rel.)	Datum pitvy	Počet schistosomul v plicích				Počet schist. v játrech				
					poh.	nepoh.	součet	rel.	poh.	nepoh.	součet		
E01	8.12.2015	1080	72%	11.12.2015	6	12	18	1,67%	1	0	1		
E02	8.12.2015	1613	108%	11.12.2015	17	26	43	2,67%	0	0	0		
E03	8.12.2015	1020	68%	11.12.2015	24	6	30	2,94%	0	0	0		
E04	8.12.2015	1560	104%	11.12.2015	9	13	22	1,41%	0	0	0		
E05	8.12.2015	1740	116%	11.12.2015	15	10	25	1,44%	0	0	0		
E06	15.12.2015	1110	74%	18.12.2015	7	27	34	3,06%	0	0	0		
E07	15.12.2015	1110	74%	18.12.2015	10	45	55	4,95%	0	0	0		
E08	15.12.2015	810	54%	18.12.2015	myš nalezena mrtvá								
E09	15.12.2015	510	34%	18.12.2015	4	30	34	6,67%	0	0	0		
E10	18.12.2015	600	40%	21.12.2015	2	3	5	0,83%	0	0	0		
E11	18.12.2015	2160	144%	21.12.2015	13	31	44	2,13%	1	1	2		
E12	18.12.2015	690	46%	21.12.2015	7	14	21	3,04%	0	0	0		
E13	18.12.2015	810	54%	21.12.2015	6	13	19	2,35%	0	0	0		
E14	19.1.2016	462	31%	22.1.2016	3	2	5	1,08%	0	0	0		
E15	19.1.2016	798	53%	22.1.2016	histologie								
E16	19.1.2016	1260	131%	22.1.2016	histologie								