

Vybrané druhy motolic & experimentální přístupy k nim



Schistosome Group Prague

Výzkumný záměr
Ekologické procesy v evoluci modelových skupin organismů



Členové helmintologického týmu:



Schistosome Group Prague

Team members 2008

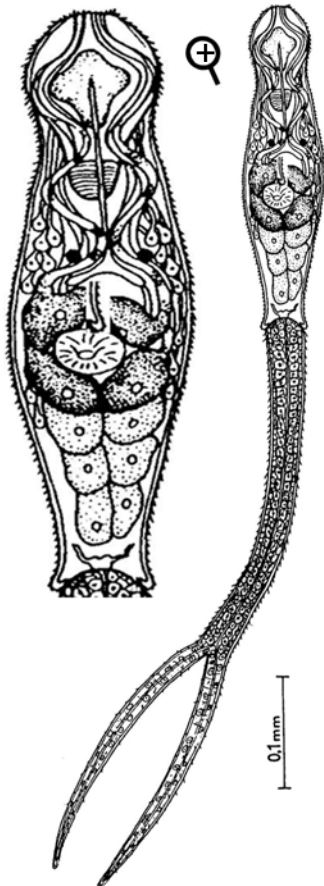


Fig. 1. *Trichobilharzia szidoti* Neuhaus, 1952:



Petr Horak, Ph.D.
(Professor)



Libor Mikes, Ph.D.
(Assistant Professor)



Jitka Rudolfová, Ph.D.
(Research Assistant)



Martin Kasný, Ph.D.
(Research Assistant)



Jana Bulantová
(PhD student)



Katerina Dolecková
(PhD student)



Marta Chanová
(PhD student)



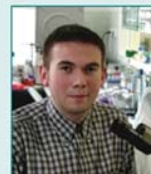
Petra Kolbékova
(PhD student)



Lucie Lichtenbergová
(PhD student)



Katerina Hunová
(MSc student)



Vladimír Škála
(MSc student)



Lenka Houzvíčková
(MSc student)



Martin Vostrý
(MSc student)



Monika Holická
(MSc student)



Lucie Parolová
(BSc student)



Petr Maslo
(BSc student)



Jana Svorcová
(Lab Assistant)

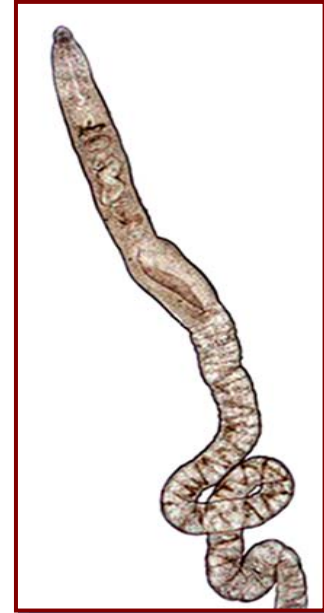


Laboratorní modely: **motolice**



Schistosome Group Prague

- ❑ ***Trichobilharzia regenti*** – ptačí schistosoma (nasální)
- ❑ ***Trichobilharzia szidati*** – ptačí schistosoma (viscerální)
- ❑ ***Fascioloides magna*** – motolice jelenovitých (jaterní)
- ❑ ***Notocotylus attenuatus*** – motolice ptáků (viscerální)
- ❑ ***Diplostomum pseudospathaceum*** - motolice ptáků (viscerální)
- ❑ ***Schistosoma mansoni*** – lidská schistosoma (viscerální)
- ❑ ***Fasciola hepatica*** – motolice hospodářských zvířat (jaterní)



Schistosomy (krevničky)



Schistosome Group Prague

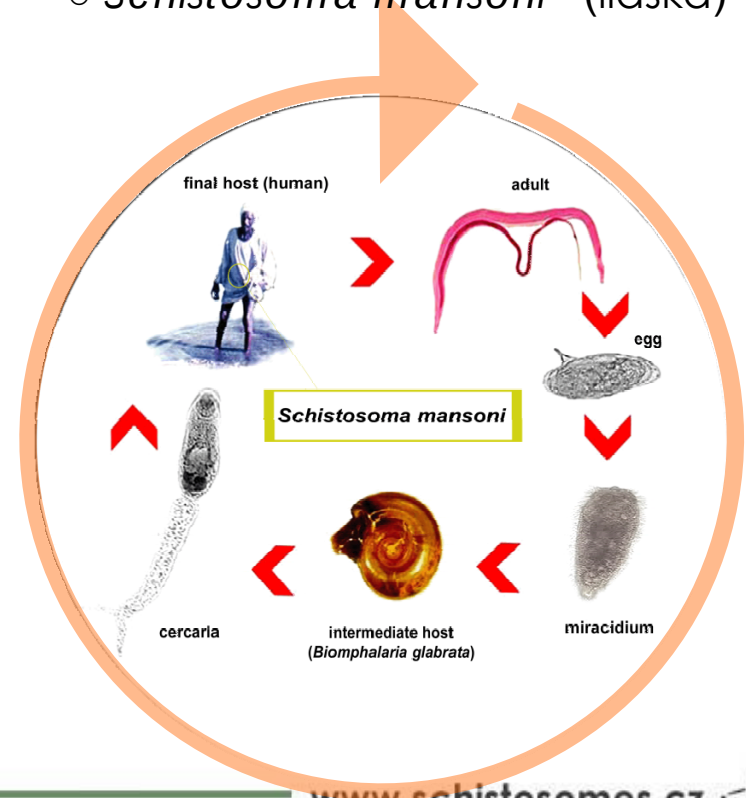
Zástupci neodermátních platyhelmintů třídy Trematoda, podtřídy Digenea

čeleď Schistosomatidae

- *Trichobilharzia regenti* (ptačí)
- *Trichobilharzia szidati* (ptačí)



- *Schistosoma mansoni* - (lidská)



Fascioloides a Fasciola

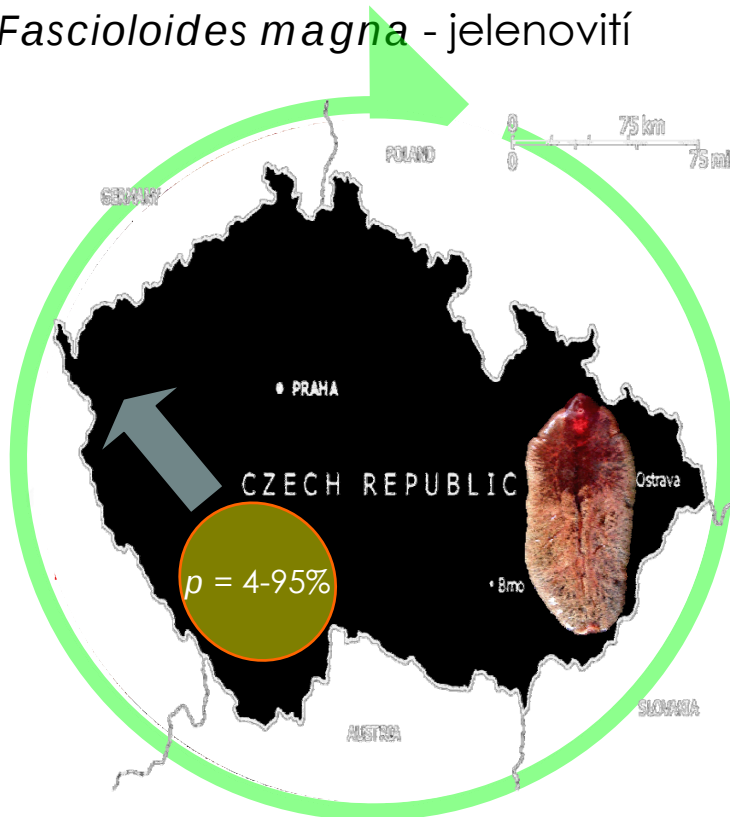


Schistosome Group Prague

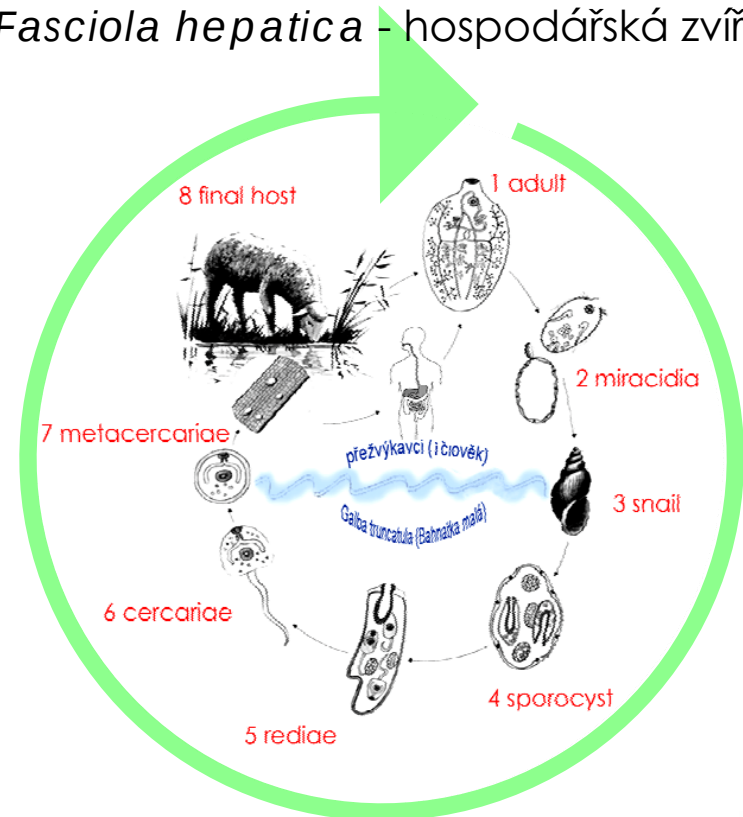
Zástupci neodermátních platyhelmintů třídy Trematoda, podtřídy Digenea

čeleď Fasciolidae

○ *Fascioloides magna* - jelenovití



○ *Fasciola hepatica* - hospodářská zvířata



Řešená problematika: okruhy



Schistosome Group Prague

- **SYSTEMATIKA**
morfologie vývojových stádií (ultrastruktura), molekulární taxonomie
- **IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE, MEZIHOSTITELE a MIGRACE**
zánětlivé reakce - např. cercáriová dermatitida, "šnečí imunita" -
hemocyty, charakterizace antigenů, histopatologie migrace hostitelskými
tkáněmi
- **FUNKČNĚ VÝZNAMNÉ PROTEINY**
enzymatický aparát motolic - proteolytické enzymy (larvální stádia -
cercárie, schistosomuly), lektiny a motoličí hyaluronidázová aktivita
- **KULTIVACE**
in vitro kultivace dospělců a jednotlivých vývojových stádií motolic



Řešená problematika: **přístupy**



Schistosome Group Prague

- **SYSTEMATIKA**

mikroskopie (SEM, TEM, konfokální), izolace DNA, PCR, fylogenetická analýza

- **IMUNITNÍ ODPOVĚĚ HOSTITELE, MEZIHOSTITELE a MIGRACE**

základní imunochemické metody - ELISA, 1D a 2D immunoblot, mikroskopie, experimentální nákazy, pitva

- **FUNKČNĚ VÝZNAMNÉ PROTEINY**

proteomika - základní separační metody (elektroforéza, chromatografie), hmotnostní spektrometrie (*de novo* sekvenování proteinů), klonování genů

- **KULTIVACE**

in vitro kultivace s využitím speciálních médií



Výstupy a Výsledky 2007: **SYSTEMATIKA**



Schistosome Group Prague



Anas penelope (Hvízdák euroasijský)



vajíčko 0,26 x 0,065 mm

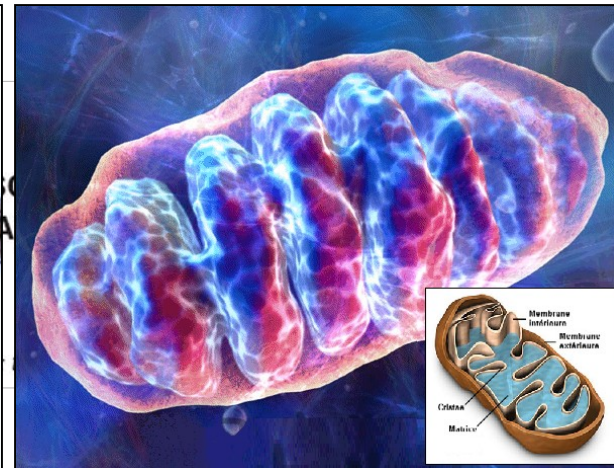
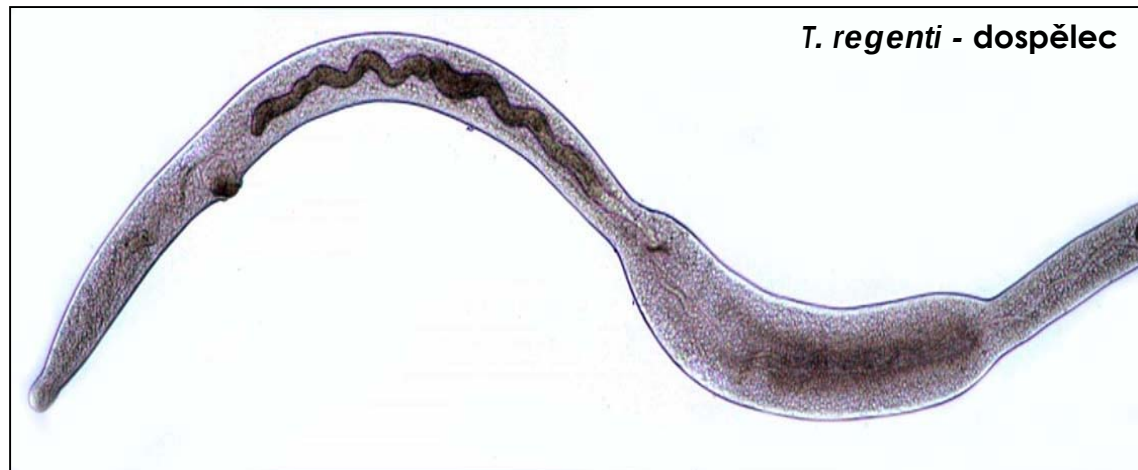
Stěžejní výsledky:

- Pitevně bylo vyšetřeno 102 divokých ptáků z ČR a 73 z Polska.
- Ptačí schistosomy byly zachyceny s prevalencí 21 % a 23 % (pouze u Vrubozobých - Anseriformes)
- Prevalence nasálních a viscerálních schistosom v PL 23 % a 16 % , v ČR 6 % a 19 %.
- Na základě ITS sekvencí byly determinovány 4 druhy ptačích schistosom *T. regenti*, *T. szidati*, *Bilharziella polonica* a neznámá motolice ze střevní stěny *Anas penelope*.

Výstupy a Výsledky 2007: **SYSTEMATIKA**



Schistosome Group Prague



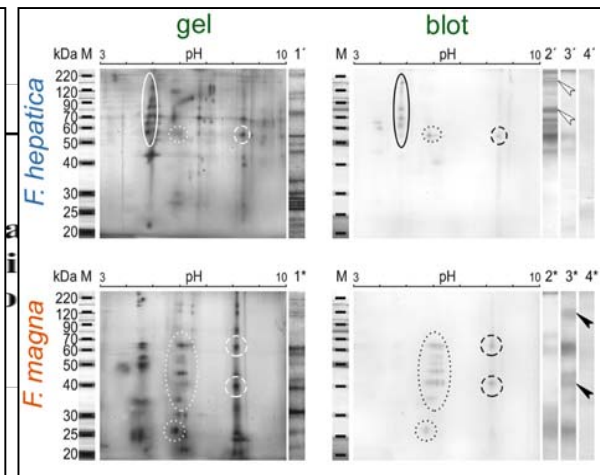
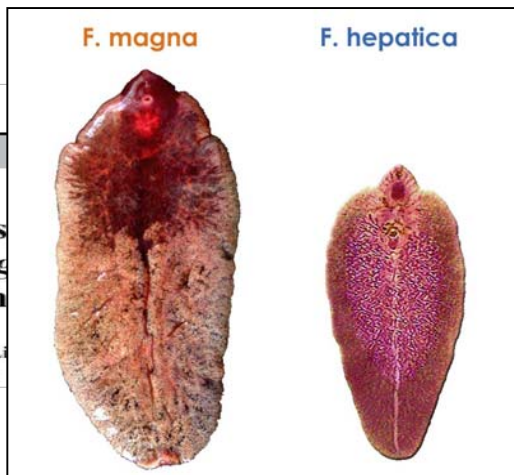
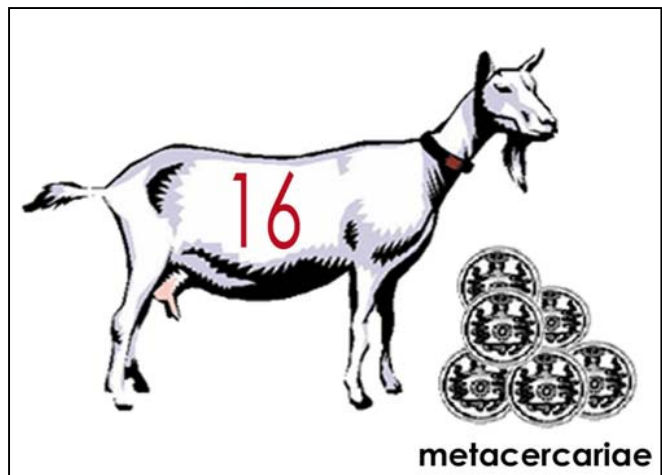
Stěžejní výsledky:

- Byl osekvenován kompletní mitochondriální genom *T. regenti* (14 838 bp)
- Znalosti kompletní mt genomové sekvence je možné využít jako robustního diagnostického markeru v molekulárně taxonomických (fylogenetických) studiích.
- Uspořádání genů v mt genomu *T. regenti* je identické jako u *S. japonicum*. "Blízcí příbuzní."

Výstupy a Výsledky 2007: **IMUNITA**



Schistosome Group Prague



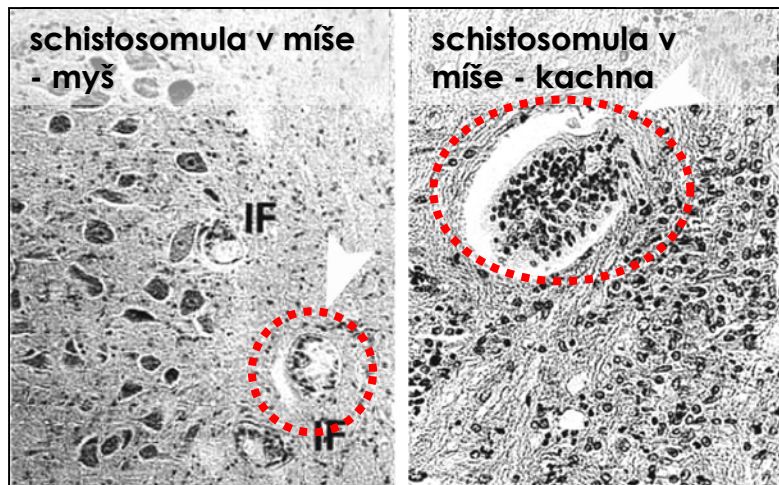
Stěžejní výsledky:

- ELISA – dynamika protilátkové odpovědi v kozách proti ESP obou druhů podobná (silná zkřížená reakce) => v oblastech výskytu obou druhů jsou serodiagnostické "ELISA kity" pro zjištění infekce *F. hepatica* – NEPOUŽITELNÉ !?
- IMUNOBLOT – možnost odlišení infekce *F. magna* a *F. hepatica* na základě druhově specifických antigenů z ESP (slabá zkřížená-reakce).
- Šíření *F. magna* v centrální Evropě => **potřeba diagnostického kitu?!**

Výstupy a Výsledky 2007: **MIGRACE**



Schistosome Group Prague



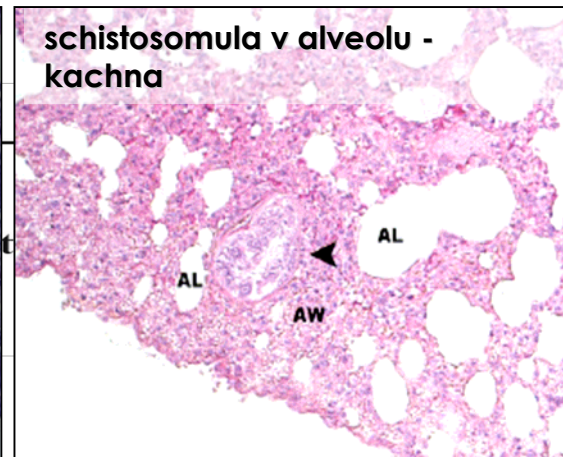
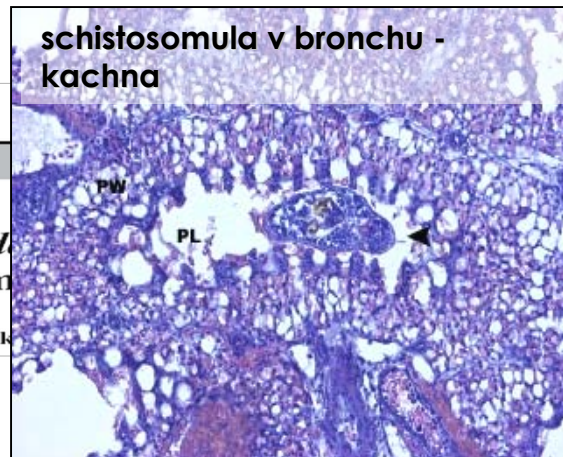
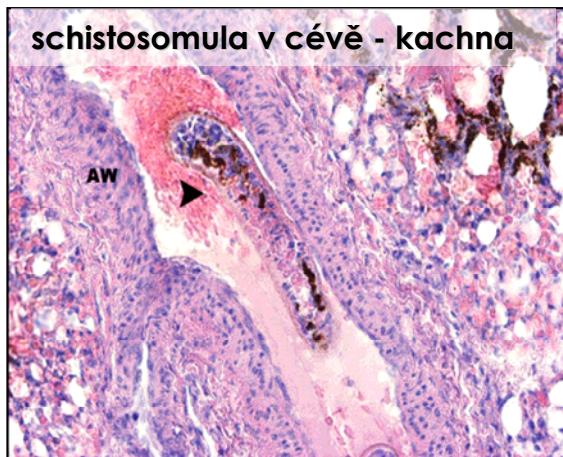
Stěžejní výsledky:

- Schistosomuly *T. regenti* migrující CNS přechází z míchy do mozkových plen, kde přestupují do cév (zde tráví erytrocyty) odtud migrují do nosní dutiny, zřejmě krevním řečištěm.
- Nebyla potvrzená migrační cesta z CNS do nosní dutiny čichovými nervy.
- V místě konečné lokalizace dospělců v okolí nakladených vajíček - četné hemoragie a granulomy s obsahem lymfocytů, eosinofilů, heterofilů.

Výstupy a Výsledky 2007: **MIGRACE**



Schistosome Group Prague



Stěžejní výsledky:

Patologie spojená s migrací plícemi:

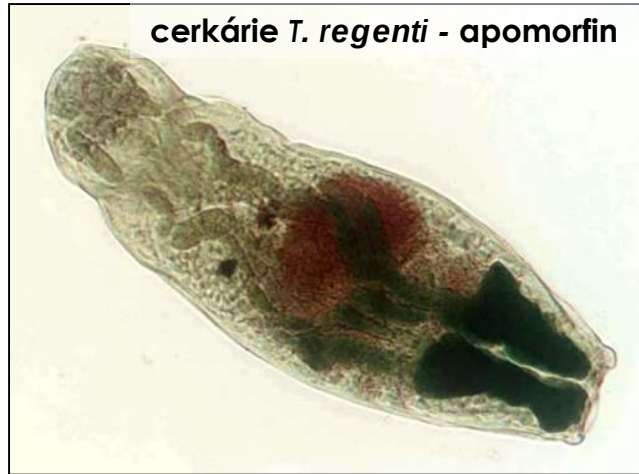
- Specifický hostitel *A. platyrhynchos* - rozsáhlý zápal 2° bronchů spojený s edémem a hemoragiemi v dutině bronchu, parabronchiální hemoragie, alveolární hyperplazie
- Nespecifický hostitel (myš BALB/c) - žádná specifická zánětlivá reakce (kongesce a edémy)
- V souvislosti s infekcí *T. szidati* vzniká riziko poškození tkáně plic jak pro specifického tak pro nespecifického hostitele.



Výstupy a Výsledky 2007: PEPTIDÁZY



Schistosome Group Prague



cerkárie *T. regenti* - apomorfin



vyústění penetračních žláz



sekreční měchýřky

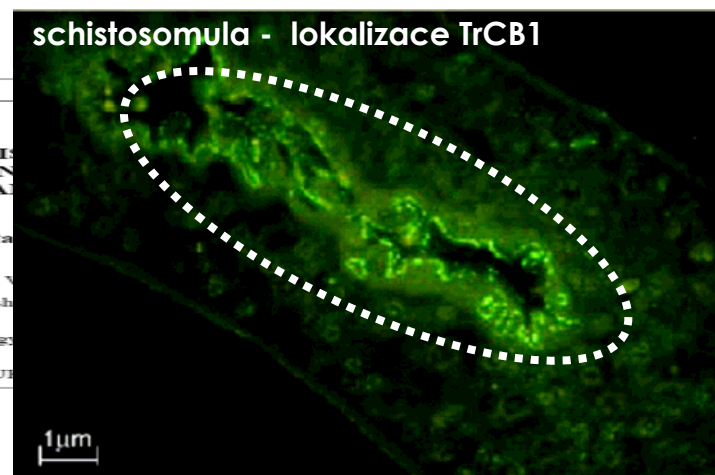
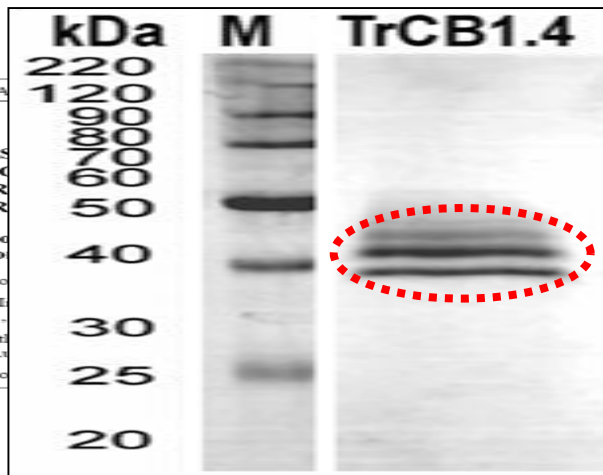
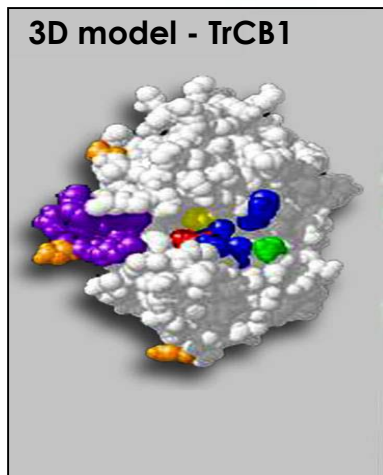
Stěžejní výsledky:

- Cysteine-like peptidolytická aktivita v ESP a frakcích cercárií *T. regenti* a *S. mansoni* je pro oba druhy srovnatelná (pH optima, preferované substráty, zymografické profily, lokalizace pomocí DCG-04 - *T. regenti* 33 kDa, *S. mansoni* 33/34 kDa).
- Nepotvrzena elastázová aktivita (podobně jako u *S. japonicum*)
- Prokázána elastino-lytická aktivita cysteinových peptidáz.

Výstupy a Výsledky 2007: PEPTIDÁZY



Schistosome Group Prague



Stěžejní výsledky:

- Byly klonovány geny - cysteinová peptidáza, cathepsin B, L a serinová peptidáza, elastáza-like
- Získané sekvence (CL a elastáza) "neblastovaly" s anotovanými sekvencemi motoličích genů a byly identifikovány jako šnečí *Radix* sp. cathepsin L a *Radix* sp. serinová peptidáza 1 a 2.
- Vzorky mRNA, následně templáty cDNA byly kontaminovány mRNA šnečího původu.
- Byl klonován gen peptidázy cathepsin B1 cercárií - *T. regenti*, který je z 99 % podobný dříve identifikovanému cathepsinu B1 ze schistosomul.

