

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Lucie Cibulková

**Produkce a eliminace superoxidového radikálu v souvislosti  
s kompatibilitou plžů a motolic**

Production and elimination of superoxide radical in relation to the  
compatibility of snails and trematodes

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: Mgr. Vladimír Skála

Praha 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 5. 2015

Lucie Cibulková

### **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat mému školiteli Vladimíru Skálovi za jeho nezlomnou trpělivost a ochotu mi pomoci při psaní této práce. Dále děkuji za ochotu pomoci celému kolektivu helmintologické laboratoře parazitologie Univerzity Karlovy. Velký dík patří mé rodině za jejich pochopení, finanční a psychickou podporu během mého studia i mimo něj.

## **Abstrakt**

Většina motolic využívá ve svém životním cyklu plže jako mezihostitele. Aby v plži přežily, musí u nich efektivně fungovat mechanismy, kterými se chrání proti obranným reakcím jeho imunitního systému. Nejvýznamnější efektorové buňky, hemocyty, produkují kyslíkové radikály, mezi nimiž je jako první superoxidový radikál. Plž produkuje různé hladiny těchto radikálů v závislosti na své rezistenci nebo vnímavosti k danému druhu či kmeni motolice. Motolice se snaží potlačit toxické působení kyslíkových radikálů produkcí antioxidantních molekul včetně superoxid dismutázy, která katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Tato dismutační reakce je prvním významným krokem v kaskádě oxidačního vzplanutí. Motolice využívá detoxifikační vlastnosti superoxid dismutázy, které ovlivňují její přežívání uvnitř plže. Na základě shrnutých znalostí lze však konstatovat, že produkce a eliminace superoxidového radikálu byla doposud detailněji popsána u velice omezeného spektra modelových druhů plž-motolice, a to např. u *Biomphalaria glabrata-Schistosoma mansoni*. Tato interakce přitom možná hraje klíčovou roli v kompatibilitě mezi uvedenou dvojjící organismů a zasluhuje proto větší pozornost.

**Klíčová slova:** motolice, plži, kompatibilita, hemocyty, oxidační vzplanutí, antioxidantní enzymy superoxid dismutáza, superoxidový radikál

## **Abstract**

Almost all trematodes use snails as the intermediate host in their life cycles. To survive within the host, they have to efficiently avoid defence reactions of its immune system. The most important effector cells, haemocytes, produce reactive oxygen species with the first molecule known as superoxide radical. Various snail species produce different levels of these radicals in relation to the compatibility with the invasive trematode species. The parasite decreases the levels of toxic radicals by using antioxidant enzymes including superoxide dismutase which catalyzes transformation of superoxide radical into hydrogen peroxide. This dismutation reaction is the first step during the oxidative burst and likely influences survival of trematodes within the host. Based on the current knowledge the production and elimination of superoxide radical in relation to the compatibility between snails and trematodes have been described thoroughly for a few models such as for example *Biomphalaria glabrata-Schistosoma mansoni*. However, this interaction appears to play a key role and, therefore, it deserves more attention in another models as well.

**Key words:** trematodes, snails, compatibility, haemocytes, oxidative burst, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, superoxide radical

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Oxidační vzplanutí u plžů po nákaze motolicemi .....	2
2.1. Význam a struktura NADPH oxidázy při oxidačním vzplanutí .....	3
2.1.1. Signalizační kaskády vedoucí k aktivaci NADPH oxidázy .....	4
2.1.2. Metabolické produkty oxidačního vzplanutí.....	6
2.2. Produkce superoxidového radikálu v souvislosti s kompatibilitou plžů a motolic .....	8
3. Antioxidační systém motolic.....	11
3.1 Antioxidační enzymatické a neenzymatické molekuly larev motolic .....	12
3.2. Superoxid dismutáza (SOD) larev motolic.....	15
3.3 Produkce SOD v souvislosti s kompatibilitou plže a motolice .....	16
3.4. Produkce SOD v ontogenetickém vývoji motolic .....	17
4. Závěr.....	19
5. Použitá literatura .....	20

## 1. Úvod

Plži (kmen Mollusca) jsou bezobratlí živočichové s širokým rozšířením a mnoha adaptacemi k různému životnímu prostředí. Uplatňují se také jako mezipřehostitelé parazitických motolic (kmen Platyhelminthes), mezi nimiž nalezneme mnoho významných parazitů obratlovců včetně člověka. Vztah mezi plžem a motolicí probíhá už stamiliony let a je doprovázený neustálým evolučním zápasem mezi oběma aktéry. Plž se snaží eliminovat motolice, které se pokouší dostat do jeho těla. Zatímco motolice se pokouší infikovat co největší počet plžů a vyprodukovat tak co nejvíce stádií, které jsou infekční pro definitivního hostitele. Motolice využívá nejrůznější modifikace svého životního cyklus v závislosti na hostiteli, zde například uvádím stručný životní cyklus motolice *Schistosoma mansoni*. První larvální stádium, miracidium, se pohybuje ve vodě a pátrá po vhodném mezipřehostiteli. Poté, co jej nalezne, pronikne do něj a mění se v mateřskou sporocystu. V té se asexuálně vyvíjí další generace larev - dceřiné sporocysty. Konečným vývojovým stádiem, které se z plžů uvolňuje a je cercárie. Plž však disponuje proti motolici účinným imunitním systémem. Nejvýznamnější imunitní buňky, hemocyty, cirkulují uvnitř plže a bojují proti motolici produkcí mnoha toxických látek, a to kyslíkových radikálů. Každý kmen plže produkuje různé koncentrace těchto molekul, které také závisí na jeho stáří nebo prostředí, ve kterém se nachází. Motolice odpovídá na obranné reakce plže dvěma způsoby. Buď se jim snaží zůstat skrytá nebo se je snaží svými obrannými mechanismy oslabit, často však jde o kombinaci těchto uvedených strategií. Mezi tyto obranné mechanismy patří i antioxidantní systém, který eliminuje toxické působení kyslíkových radikálů produkovaných plžem.

Cílem této práce je shrnout dostupné informace o produkci reaktivních meziproduktů kyslíku u plžů a následné detoxifikaci těchto produktů u motolic. Z toho se dále zaměřuje na produkci superoxidového radikálu a jeho následnou detoxifikaci pomocí enzymu superoxid dismutázy. Shrnuty jsou i modelové druhy plž-motolice u kterých je tato interakce popisována. V práci jsou dále zdůrazňovány faktory, které produkci a eliminaci superoxidového radikálu ovlivňují, a tedy i kompatibilitu mezi plžem a motolicí.

## 2. Oxidační vzplanutí u plžů po nákaze motolicemi

Oxidační vzplanutí patří mezi základní obranné mechanismy imunitního systému plžů proti patogenům. Tento mechanismus zajišťují mobilní fagocytární buňky zvané hemocyty. Poté co je patogen hemocytem rozpoznán, dochází k oxidačnímu vzplanutí, které dále probíhá i po jeho fagocytóze v buněčném fagozómu (Dikeboom et al. 1988; Adema et al. 1991; Van der Knaap et al. 1993). V tomto případě však musí být fagocytovaný objekt přiměřeně velký, a to např. jako bakterie. U larvy motolice dochází kvůli velikostním poměrům nejprve k enkapsulaci hemocyty, následně k oxidačnímu vzplanutí a konečně k fagocytóze částí jejího těla (Van der Knaap et al. 1993; Adema et al. 2015).

Cytotoxickými molekulami oxidačního vzplanutí jsou tzv. ROS (reaktivní produkty kyslíku). Tyto molekuly jsou tvořeny především membránovým enzymatickým komplexem – NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) oxidázou (Adema et al. 1993). Popisovány jsou však i další dráhy vedoucí k produkci ROS, a to například dráha katabolismu xantinu (Hancock et al. 2001). Mezi molekuly vznikající během oxidačního vzplanutí patří výchozí superoxidový radikál  $O_2^-$ , který je přeměňován na další reaktivní produkty zahrnující peroxid vodíku  $H_2O_2$ , kyselinu chlornou  $HOCl$  a hydroxylový radikál  $OH^-$  (Adema et al. 1993; Adema et al. 1994; Bayne et al. 2001). Produkce reaktivních kyslíkových molekul není u všech druhů plžů stejná (Gornowicz et al. 2013), záleží na mnoha faktorech včetně stáří jedince (Dikkeboom et al. 1985). Hlavní cytotoxickou funkcí ROS je peroxidace lipidových membrán, a dále také denaturace proteinů nebo nukleových kyselin (Gornowicz et al. 2013).

Larvy motolic odpovídají na přítomnost ROS molekul zvýšenou expresí antioxidantních enzymů, které je detoxifikují a snižují tak jejich toxické působení (Moné et al. 2011; Gornowicz et al. 2013). Tato vzájemná interakce plž-motolice popisuje koevoluční vztah mezi parazitem a jeho mezipřijímatelem (Webster et al. 2001). V interakci plž-motolice rozeznáváme dva základní vztahy. Je-li motolice schopna detoxifikovat letální hladiny ROS produkované plžem, jedná se o kompatibilního parazita (Adema et al. 1994). Opakem je nekompatibilní parazit, vůči kterému je plž rezistentní (Gornowicz et al. 2013).

Oxidační vzplanutí bylo zkoumáno u mnoha modelových druhů plžů po nákaze motolicemi, a to například u plže *Lymnaea stagnalis* po nákaze motolicemi *Plagiorchis elegans*, *P. radiatum*, *Echinoparyphium aconiatum* *Diplostomum pseudospathaceum* (Gornowicz et al. 2013) nebo *Trichobilharzia szidati* (Adema et al. 1994). Z dalších modelů lze pak uvést plže *Radix lagotis* a motolici *Trichobilharzia regenti* (Skála et al. 2014) nebo

plže *Biomphalaria glabrata* a motolici *Schistosoma mansoni* (Adema et al. 1994; Hahn et al. 2000; Moné et al. 2011).

## 2.1. Význam a struktura NADPH oxidázy při oxidačním vzplanutí

NADPH oxidáza je membránový enzymový komplex zodpovědný za oxidační vzplanutí hemocytů (Adema et al. 1993). Jeho lokalizace je u fagocytárních buněk především na plazmatické membráně, vyskytovat se však může také na membráně specifických granulí nebo na jaderné membráně (Massuko Ushio-Fukai 2006). Struktura i funkce NADPH oxidázy jsou evolučně konzervované struktury. U živočichů se tento enzym rozděluje do několika typů lišících se především svou lokalizací (Sumimoto 2008). Struktura NADPH oxidázy hemocytů plžů nebyla prozatím detailněji prostudována.

Hlavní funkcí NADPH oxidázy je tvorba superoxidového radikálu  $O_2^-$  z molekulárního kyslíku. Z  $O_2^-$  se pak tvoří další produkty oxidačního vzplanutí. Superoxidový radikál může dále reagovat i s radikálem oxidu dusnatého  $NO^\cdot$  za vzniku peroxynitritu  $ONOO^-$ , který se řadí mezi NOS (reaktivní meziprodukty dusíku) (Hancock et al. 2001; Lambert et al. 2007; Hahn et al. 2001). NADPH oxidáza se kromě oxidačního vzplanutí podílí i na jiných buněčných pochodech jako je například proliferace nebo buněčná signalizace (Hancock et al. 2001).

Přestože existují další dráhy vedoucí k oxidačnímu vzplanutí, aktivace NADPH oxidázy patří k nejvýznamnějším (Hancock et al. 2001). U plžů vede její inhibice k potlačení produkce takových hladin ROS, které jsou pro motolici letální (Bayne et al. 2001). Zásadní funkci NADPH oxidázy při oxidačním vzplanutí u plže *L. stagnalis* prokázaly inhibiční testy s využitím specifických inhibitorů tohoto enzymu, a to např. pomocí DPI (diphenyleneiodonium chloride) (Adema et al. 1993). Během podobných testů s mlžem *Crassostrea gigas* byla naměřena enzymová produkce ROS a NOS pomocí NADPH oxidázy a NO syntázy přes 80%. (Lambert et al. 2007) Za zbylých 20% produkce těchto reaktivních molekul zodpovídá buněčný metabolismus (Lambert et al. 2007). Další autoři inhibovali NADPH oxidázu pomocí protokatecholové kyseliny, přičemž závislost produkce ROS na NADPH oxidáze byla více jak 50% (Hahn et al. 2000).

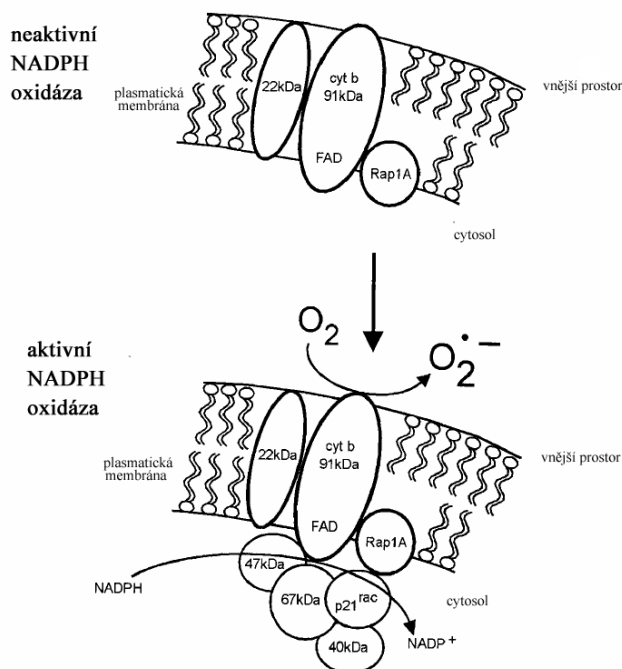
NADPH oxidáza se u fagocytárních buněk skládá ze dvou membránových podjednotek (flavocytochrom b<sub>558</sub>), tří regulačních cytosolických podjednotek a dvou nízkomolekulárních GTPázových podjednotek (Geiszt a Leto 2004). Hlavní katalytickou, elektron transportní a membránovou podjednotkou je p91<sup>phox</sup> (phox; phagocytic oxidase),

kteřá společně s p22<sup>phox</sup> tvoří membránový heterodimer (flavocytochrom b<sub>558</sub>) (Sumimoto 2008, Masuko Ushio-Fukai 2006).

Elektron transportní kanál cytosol – membrána je zajištěn především díky membránové podjednotce p91<sup>phox</sup> (Sumimoto 2008). Druhá membránová podjednotka p22<sup>phox</sup> propojuje membránový heterodimer s cytosolickými podjednotkami (Babior 2004). Cytosolické podjednotky tvoří p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> a jejich interakce s membránovým heterodimerem aktivuje NADPH oxidázu (Hancock et al. 2001) (Obr.1).

### Obr1. Aktivace NADPH oxidázy u fagocytárních buněk

K aktivaci membránových podjednotek NADPH oxidázy dochází díky interakci s cytosolickými podjednotkami. Při oxidoredukčních reakcích se jako první produkt tvoří superoxidový radikál(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Hancock et al. 2001; upraveno)



#### 2.1.1. Signalizační kaskády vedoucí k aktivaci NADPH oxidázy

Buněčné děje související s imunitní odpovědí pľžů jsou regulovány řadou mechanismů včetně aktivovaných signalizačních kaskád. Mezi nejvýznamnější kinázy signalizačních kaskád regulující aktivaci NADPH oxidázy, a tedy i oxidační vzplanutí pľžů patří ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Humphries a Yoshino 2003) a PKC (protein kináza C) (Babior 1999). Dráhy vedoucí k aktivaci ERK a PKC jsou evolučně konzervované, vzájemně spolu kooperují a společně s ostatními drahami tvoří buněčnou signalizační síť (Salamat a Sullivan 2009; Walker a Plows 2003; Walker 2006).

Aktivaci NADPH oxidázy se účastní mnoho dalších kináz, aktivace specifické kinázy je určena mnoha faktory (Lacchini et al. 2006; Humphries a Yoshino 2008). Tyto faktory tvoří např. druh stimulantu, výběr testovaných buněk, sledovaný druh plže nebo použití inhibitoru (Humphries a Yoshino 2008). U již zmíněných kináz ERK a PKC však bylo dokázáno, že jejich inhibice negativně ovlivňuje produkci  $H_2O_2$  a tedy i aktivaci NADPH oxidázy (Lacchini et al. 2006). Specifické aktivace těchto kináz znamenají specifické aktivace těchto kaskád. U obou kaskád obecně dochází k vazbám ligandů a postupné fosforylaci jednotlivých členů kaskády.

První z uvedených kináz je ERK kináza, jejíž význam byl prokázán ve většině prací zabývajících se oxidačním vzplanutím a fagocytózou např. u hemocytů *L. stagnalis* (Plows et al. 2004; Walker a Plows 2003). Signalizační kaskádu aktivující ERK kinázu lze popsat následovně. Extracelulární signál (např. růstový faktor) aktivuje růstový receptor na membráně efektorové buňky, se kterým je spojen SOS protein (son of sevenless). Kaskáda dále pokračuje aktivací dvou GDP/GTP vazebných proteinů (Ras a Raf) (Kolch 2000). Raf dále aktivuje kinázu MEK, která přímo aktivuje ERK kinázu. Díky ERK kináze dochází k translokaci cytosolických podjednotek NADPH oxidázy směrem k membráně, kde mohou reagovat s membránovými podjednotkami a dochází tak k její aktivaci (Humphries a Yoshino 2008). Komerčními stimulanty pro aktivaci ERK kinázy u hemocytů jsou například LPS (lipopolysacharid), PMA či laminarin (Plows et al. 2006; Lacchini et al. 2006; Humphries a Yoshino 2008). K inhibici ERK dochází např. pomocí specifických inhibitorů MEK kinázy. Nejvíce účinný byl u plovatky *L. stagnalis* inhibitor U0126 (Plows et al. 2004) nebo PD098059 (Zelck et al. 2007). Po použití těchto inhibitorů sice došlo ke snížení produkce  $H_2O_2$ , avšak nikoliv k nulovým hodnotám (Plows et al. 2004; Zelck et al. 2007; Walker 2006).

Další kinázou regulující oxidační vzplanutí u plžů je PKC, přičemž její vliv na produkci ROS byl rovněž dokázán například u druhu *L. stagnalis* (Walker a Plows 2003). Během stimulace hemocytů pomocí specifického aktivátoru PKC (např. PMA; phorbol myristate acetate) došlo ke zvýšené produkci peroxidu vodíku  $H_2O_2$ , což dokazuje přímou souvislost aktivace PKC a produkce ROS (Bender et al. 2005). Kaskádu aktivace PKC zahajuje aktivace receptoru protein kinázy C RACK (receptor pro aktivovanou protein kinázu C) (Lardans et al. 1998) a receptoru spřaženého s G proteiny, který dále aktivuje PLC (fosfolipázu C). PLC štěpí PIP2 (fosfatidylinositolbisfosfát), DAG (diacyl glycerol) a IP3 (inostitol-3-fosfát). Tato molekula se dostává do endoplazmatického retikula, kde vede k uvolnění  $Ca^{2+}$ . Vápenaté ionty působí na PKC translokačně a „navádějí“ ji k plasmatické

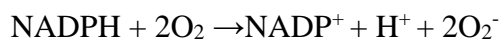
membráně, kde je nakonec aktivována pomocí DAG (Ludtmann et al 2009; Bender et al. 2005; Humphries a Yoshino 2008; Lardans et al 1998). PKC může přímo působit na podjednotky NADPH oxidázy nebo ji může nepřímou stimulovat přes ERK kinázu (Humphries a Yoshino 2008). Mezi popsané aktivátory PKC hemocytů patří například laminarin (Lacchini et al. 2006) nebo PMA (phorbol myristate acetate), který nahrazuje působení DAG (Gorbushin a Iakovleva 2007; Bender et al. 2005). Účinným inhibítozem PKC je např. GF109203X, který vede ke snížení produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lacchini et al. 2006).

Jednou z dalších kináz účastnících se aktivace NADPH oxidázy hemocytů je PI3-K (fosfatidylinositol 3-kináza) (Plows et al. 2006). Ta by měla působit na cytosolické podjednotky NADPH oxidázy přímo nebo nepřímou aktivací Raf proteinu a ERK (Kolch 2000; Humphries a Yoshino 2008). Díky těmto poznatkům by stimulace PI3-K měla vést ke zvýšené produkci ROS, což některé práce dokazují (Plows et al. 2005). Existují však protichůdné studie zabývající se rolí PI3-K a oxidačním vzplanutím u plžů (Lacchini et al. 2006). Ve kterých bylo zjištěno, že inhibice PI-3K hemocytů plže *L.stagnalis* inhibítozem LY294002 neovlivňuje fagocytózu ani oxidační vzplanutí (Plows et al. 2005; Lacchini et al. 2006).

### 2.1.2. Metabolické produkty oxidačního vzplanutí

Produkty oxidačního vzplanutí plžů jsou pro patogeny včetně larev motolic různě toxické. Kaskáda oxidačního vzplanutí připomíná řetězovou reakci, přičemž selhání jedné části ovlivňuje selhání částí navazujících (Bayne et al. 2001). Výchozí jednotkou oxidačního vzplanutí je NADPH oxidáza (Adema et al. 1993). K její aktivaci dojde např. pomocí některé signalizační kaskády, což může být reakce na rozpoznání cizorodý objekt nebo např. na buněčnou signalizační molekulu (Kolch 2000; Bender 2005; Humphries a Yoshino 2008).

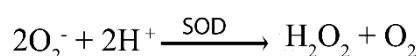
Prvním produktem oxidačního vzplanutí je superoxidový radikál O<sub>2</sub><sup>-</sup>, který vzniká redukcí molekulárního kyslíku za současné oxidace NADPH oxidázy (Babior 2004).



Transportu elektronů se účastní membránové podjednotky NADPH oxidázy (cytochrom b<sub>558</sub>) (Babior 1999). U plžů byl superoxidový radikál poprvé identifikován u druhu *L. stagnalis* (Dikkeboom 1988). Superoxidový radikál působí na proteinové struktury, následně se uvolňují železnaté kationty Fe<sup>II+</sup>, které se dále uplatňují při produkci hydroxylového radikálu, který pak může způsobit poškození DNA (Beckman a Ames 1997; Ernst et al. 1997). Významnou reakcí superoxidového radikálu je jeho reakce s radikálem oxidu dusnatého za

vzniku peroxynitritu  $\text{ONOO}^-$ . Peroxynitrit je reaktivní podobně jako hydroxylový radikál, jde tedy o nestálou molekulu s krátkodobými účinky tím pádem je tak méně toxický než oxid dusnatý (Hahn et al. 2001). Na rozdíl od NO je však  $\text{ONOO}^-$  ovlivňován produkcí superoxidového radikálu (Hahn et al. 2001). Měření spotřeby a produkce  $\text{O}_2^-$  je však problematické vzhledem k jeho nestabilitě a rychlé přeměně na další produkty (Makino et al. 1986).

Následujícím produktem oxidačního vzplanutí je peroxid vodíku. Jeho vznik je spojen s dismutací superoxidového radikálu pomocí detoxifikačního enzymu SOD (superoxid dismutázy) (Zelck et al. 2005; Baehner et al. 1975).



Přeměna peroxidu vodíku na další produkty oxidačního vzplanutí není tak rychlá jako u superoxidového radikálu a jeho přítomnost je tedy ve srovnání se superoxidem snadněji detekovatelná (Dikeboom et al. 1988; Adema et al. 1991).

Peroxid vodíku je dále pomocí enzymu katalázy detoxifikován na vodu a kyslík (Blouin et al. 2013). Většinou je však přeměňován na další reaktivní produkty kyslíku. Oxidací železnatých kationtů  $\text{Fe}^{II+}$  na železité kationty  $\text{Fe}^{III+}$  a redukcí peroxidu vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$  vzniká hydroxylový radikál (Hancock et al. 2001). Reakcí s halogenidovými anionty za katalýzy enzymem myeloperoxidázou (MPO) mohou také vznikat baktericidní kyseliny jako např. kyselina chlorná HOCl (Klebanoff 1968; Bayne 2001). Z té může dále vznikat singletový kyslík  $\text{O}_2^1$  nebo již zmíněný hydroxylový radikál (Bayne et al. 2001).

Cytotoxický efekt ROS molekul byl popsán zejména ve vztahu k mikroorganizmům (Klebanoff 1968, Thomas 1979). Pro motolice *S.mansoni* bylo popsáno, že vysoce reaktivní kyselina chlorná HOCl nebo hydroxylový radikál  $\text{OH}^-$  na ně působí méně toxicky než například peroxid vodíku, což je zřejmě způsobeno jejich nestabilitou (Bayne et al. 2001).

Toxické působení superoxidového radikálu a peroxidu vodíku se liší v několika ohledech. Superoxidový radikál je nabitá molekula, neprostupuje buněčnými membránami a účinný je především v místě produkce v extracelulárním prostoru (Bayne et al. 2001). Na rozdíl od superoxidového radikálu je peroxid vodíku nenabitý a díky tomu je schopen prostupovat membránami buněk (Zelck a Janowsky 2004). Je také stálejší a déle působí na povrchové membrány parazita (Bayne 2001).

Produkce  $O_2^-$  hemocyty plžů může být iniciována i různými komerčně dodávanými stimulanty, a to např. zymosanem (Adema et al. 1991) nebo PMA (phorbol mystrate acetate) (Goodall et al. 2004). Během stimulace hemocytů *L. stagnalis* zymosanem bylo zjištěno, že k produkci superoxidového radikálu dochází extracelulárně po iniciaci fagocytózy (Adema et al. 1991). Podobný pokus s plžem *Littorina littorea* a zymosanem však dokázal přítomnost superoxidového radikálu i uvnitř fagozómu hemocytů (Gorbushin a Iakovleva 2007).

Produkce superoxidového radikálu byla ve většině studií měřena pomocí NBT (nitro blue tetrazolium), který je po reakci s  $O_2^-$  redukován na tmavě modrý produkt formazan (Dikkeboom et al. 1988; Adema et al. 1991; Gorbushin a Iakovleva 2007; Moné et al. 2011). Další popisovanou metodou pro detekci  $O_2^-$  je spektrofotometrické měření aktivity cytochromu C. Během měřené reakce dochází k redukci cytochromu C a zároveň k oxidaci  $O_2^-$ . Při přechodu cytochromu C do redukováného stavu dochází ke změnám hodnot absorbance (Babior et al. 1973, Leslie a Allen 1987, Adema et al. 1991).

## **2.2. Produkce superoxidového radikálu v souvislosti s kompatibilitou plžů a motolic**

Kompatibilitu plžů a motolic ovlivňuje celá řada faktorů včetně produkce a detoxifikace ROS molekul. Rezistentní hostitel je obecně schopen nekompatibilního parazita (larvu motolice) rychle rozpoznat a následně eliminovat (Bayne 2001; Bayne 2009). Kompatibilní parazit je naopak schopen rozpoznávacím mechanismům imunitního systému meziphostitele unikát, nebo se jeho obranným reakcím účinně bránit. V souvislosti s produkcí superoxidového radikálu hemocyty plžů je především významná schopnost účinné detoxifikace této molekuly ze strany parazita (Adema et al. 1994, Moné et al. 2011).

Mnoho prací se zabývá otázkou jaké mechanismy ovlivňují rezistenci plžů vůči motolicím, případně jak by bylo možné takové rezistence dosáhnout. Jedním z možných vysvětlení je diverzita povrchových receptorů hemocytů plžů označovaných jako FREPs molekuly (fibrinogen related proteins), které rozpoznávají muciny na povrchu sporocyst (Adema et al 1997). Kompatibilita receptorů a mucinů může vést k úspěšné adhezii hemocytů *B.glabrata* ke sporocystě *S. mansoni* (Roger et al. 2008) a následné produkci  $O_2^-$ .

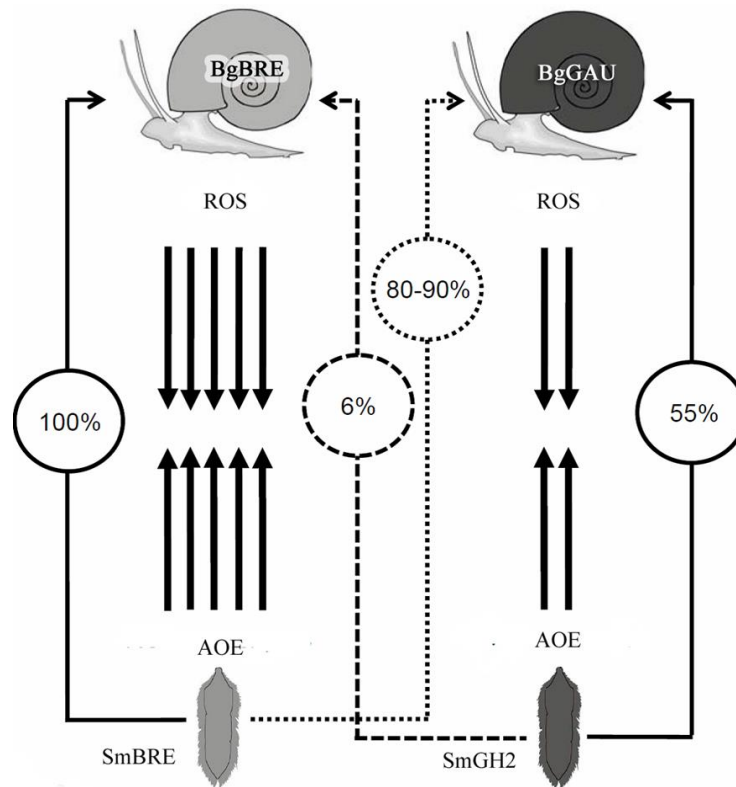
Během výzkumu rezistence plže *B. glabrata* vůči motolici *S. mansoni* nebyl sledován pouze fenotyp jednotlivých kmenů, ale i jejich genotyp. Vzhledem k tomu, že antioxidační enzym superoxid dismutáza zprostředkovává přeměnu  $O_2^-$  na  $H_2O_2$ , který je pro motolice toxičtější, byla genotypová podstata tohoto enzymu označena jako možná příčina rezistence plžů (Blouin et al. 2013). Gen pro superoxid dismutázu leží na stejném chromozomu v těsné

blízkostí dvou dalších antioxidačních enzymů, a to katalázy a peroxidázy. Tyto tři enzymy však nejsou produkovány ve stejné míře. Vyšší je exprese genu SOD1, který kóduje SOD. Zvýšená produkce SOD u rezistentního plže je kompenzována nižší produkcí katalázy. Enzym kataláza zajišťuje rozklad  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ , čímž se snižuje jeho toxické působení. Pokud je tedy produkce katalázy omezena dochází k pomalejší detoxifikaci  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ten pak může déle toxicky působit na povrch motolice (Blouin et al. 2013).

Produkce superoxidu a jeho význam pro kompatibilitu plžů a motolic je popisována v několika pracích lišících se ve studovaných modelech i v metodách studia (např. motolice *S. mansoni* v interakci s *L. stagnalis* nebo *B. glabrata*) (Dikkeboom et al. 1988; Moné et al. 2011). Produkce  $\text{O}_2^-$  byla často studována v rámci infekčních experimentů zahrnujících kombinace různých druhů plžů a motolic. Hlavním cílem těchto pokusů bylo nahradit kompatibilní druh motolici nekompatibilním druhem a sledovat interakci s infikovaným plžem (Dikkeboom et al. 1988). Infikován byl i jeden druh plže několika druhy motolic zároveň (Adema et al. 1994 Gornowitz et al. 2013) nebo několik druhů plžů jedním druhem motolice (Guillou et al. 2007). Během těchto pokusů byla porovnáována produkce ROS, dále pak aktivita detoxifikačních enzymů nebo i fagocytóza (Moné et al. 2011). Jedna z prvních prací zabývajících se produkcí cytotoxických molekul u nekompatibilní dvojice *L. stagnalis*-*S. mansoni* dokázala produkci superoxidového radikálu v prostoru mezi sporocystou a hemocytem (Dikkeboom et al. 1988). Jiná práce se zabývala porovnáním produkce  $\text{O}_2^-$  a aktivit SOD u sympatrické a alopatrické kombinace *B. glabrata*-*S. mansoni* (Moné et al. 2011). Sympatrická kombinace se týká plže a motolice, kteří žijí ve stejném areálu, zatímco alopatrická kombinace plže a motolice zahrnuje druhy žijící v různých areálech. Produkce superoxidového radikálu u sympatrické a alopatrické kombinace byla sledována pro brazilské (BgBRE, SmBRE) a guadeloupské varianty (BgGAU, SmGH2) uvedeného druhu plže a motolice (Obr.2). Během tohoto sledování došli autoři k několika předpokládaným závěrům. Sympatrická brazilská populace *B. glabrata* (BgBRE) produkovala v přítomnosti sympatrické populace larev *S. mansoni* (SmBRE) větší množství superoxidového radikálu, superoxid dismutázy i peroxidu vodíku. Naproti tomu reagovaly larvy motolice zvýšenou tvorbou detoxifikačních enzymů čímž byly tedy schopny v plži přežít. V porovnání s brazilskými subpopulacemi produkovala guadeloupská sympatrická kombinace plže a motolice výrazně méně ROS i detoxifikačních enzymů. Guadeloupská motolice byla adaptována na nižší hladiny ROS sympatrického plže. Při alopatrické kombinaci byla úspěšnější v infikaci plže

brazilská subpopulace motolic. Motolice SmBRE infikovala plže BgGUA téměř v 90 %, kdežto SmGH2 infikovala plže BgBRE pouze v 6 % (Moné et al. 2011).

Z toho plyne, že larvy SmGH2 neměly schopnost produkovat dostatečné množství SOD enzymu, které by detoxifikovaly  $O_2^-$  produkovaný hemocyty plžů BgBRE (Moné et al. 2011).



**Obr.2**

**Kompatibilita plže *Biomphalaria glabrata* a motolice *Schistosoma mansoni* v rámci sympatrické a alopatrické kombinace;** (BRE) brazilská ; (GH2/GAU) guadeloupská varianta plže a motolice, (—) sympatrická, (- - -) alopatrická kombinace. V brazilské sympatrické kombinaci plži produkují větší množství ROS, avšak motolice odpovídají vyšší expresi antioxidačních enzymů (AOE) a jsou tak s plžem kompatibilní. Naproti tomu guadeloupská sympatrická kombinace produkuje méně ROS i AOE, motolice SmGH2 v plži GbBRE téměř nepřežívá (Moné et al. 2011; upraveno)

Výsledná interakce mezi plžem a motolicí v souvislosti s produkcí superoxidového radikálu závisí i na dalších faktorech, a to např. na organickém znečištění prostředí. U mořského plže *Haliotis diversicolor* byla prokázána menší schopnost produkce  $O_2^-$  při znečištění benzopyrenem (Gopalakrishnan et al. 2009). Organismus produkoval méně  $O_2^-$  po stimulaci laminarinem nebo LPS než kontrolní skupina z neznečištěného prostředí (Gopalakrishnan et al. 2009).

### 3. Antioxidační systém motolic

Přežití kompatibilního druhu motolice ve vnímavém druhu plže zajišťuje funkční antioxidační systém, který potřebuje každé vývojové stádium bez ohledu na jeho únikovou strategii před imunitním systémem meziphostitele (Chiumiento a Bruschi 2009). Funkcí antioxidačního systému je detoxifikovat reaktivní meziprodukty kyslíku. Ty zahrnují jak ROS molekuly vznikající uvnitř parazita důsledkem metabolických přeměn, tak i ROS, které produkuje plž v rámci obranných reakcí proti motolici (Vermeire a Yoshino 2007). Během vývoje reaguje motolice na množství přítomných reaktivních meziproduktů kyslíku regulací hladin produkovaných AOE (antioxidačních enzymů) (Connors et al. 1991). Například miracidium *S. mansoni* pohybující se ve volném prostředí musí produkovat vyšší hladiny AOE než sporocysta uvnitř plže *B. glabrata* (Zelck a Janowsky 2004). Ve vnějším prostředí se nachází více molekulárního kyslíku a jeho radikálů, zatímco vnitřní prostředí plže je na kyslík chudší (Tielens et al. 1991; Zelck a Janowsky 2004). Parazit se tak fluktuacemi v koncentracích AOE přizpůsobuje vnějším podmínkám nebo podmínkám uvnitř meziphostitele. Vzhledem k tomu, že antioxidační systém motolic reaguje na ROS specifického plže je parazit schopen infikovat pouze malé množství druhů meziphostitelských plžů (Goodall et al. 2004). Po penetraci motolice *S. mansoni* povrchem těla plže *B. glabrata* dochází přechodně k zvýšené produkci antioxidačních enzymů (Wu et al. 2009). Ty působí jako první obranná linie motolice proti produkovaným ROS molekulám meziphostitele.

Jedním z hlavních důvodů produkce antioxidačních enzymů je ochrana lipidických membrán buněk tegumentu motolice před vznikajícím ROS plže (LoVerde 1998). Lipidy nejsou přítomny pouze u dospělců, ale jakožto součást vnějšího povrchu sporocyst jsou jedním z limitujících faktorů jejich vývoje. Vyšší příjem lipidů v potravě plže *B. glabrata*, který byl krmený žloutky vajec dokonce vyvolává patentní periodu motolic *S. mansoni* rychleji než u plže krmeného salátem (Thompson et al. 1991). Tento příklad dokazuje velký význam lipidů jakožto součást stavby těla motolic, přičemž nutný je výkonný antioxidační systém pro jejich ochranu (Thompson et al. 1991). Pokud motolice dostatečně neeliminuje působící ROS, dochází k peroxidaci membránových sterolů a fosfolipidů, čímž vznikají jejich toxické sekundární produkty (Lo Verde 1998). V návaznosti dochází ke ztrátě permeability membrány a ta následně ztrácí svou ochrannou funkci a integritu (LoVerde 1998).

Molekuly podílející se na detoxifikaci ROS se liší svými vlastnostmi či strukturou. Jako tzv. antioxidanty neoznačujeme pouze antioxidační enzymy o vysoké molekulární hmotnosti typu superoxid dismutázy (SOD) nebo glutathion peroxidázy (GPX) (Mourão et al.

2009). Mezi tyto látky se obecně zařazují i nízkomolekulární molekuly jako jsou močovina, kyselina močová,  $\beta$ -karoten nebo vitamín C (Zelck a Janowsky 2004, Chiumiento a Bruschi 2009). Na počátku detoxifikace ROS molekul je eliminace superoxidového radikálu, a to pomocí enzymu superoxid dismutázy. Na její působení navazuje kataláza nebo glutathion peroxidáza, které rozkládají peroxid vodíku na vodu a kyslík. Proti destruktivnímu působení ROS a peroxidaci lipidových membrán působí i glutathion-S-transferáza (Chiumiento a Bruschi 2009 Zelck a Janowsky 2004; Mei a LoVerde 1997).

Nejčastěji studovaným modelem pro vzhledem k AOE larev motolic je *S. mansoni* (Zelck a Janowsky 2004; Mei a LoVerde 1997). Mezi další modely v tomto ohledu patří také motolice *F. hepatica* (Gourbal et al. 2008; Chiumiento a Bruschi 2009), *F. gigantica* (Lalrinkima et al. 2015) nebo *Echinostoma paraensei* (Pinheiro et al. 2009).

### **3.1 Antioxidační enzymatické a neenzymatické molekuly larev motolic**

Jednotlivé druhy motolic mají specifický antioxidační systém, produkují různé typy antioxidačních enzymů nebo různé hladiny těchto enzymů (Chiumiento a Bruschi 2009). Většina prací, které se antioxidačními enzymy motolic zabývají, se však týkají stádií z definitivního (obratlovčího) hostitele (Mkoji et al. 1988). Antioxidační enzymy u larválních stádií jsou přitom nepostradatelnou složkou pro jejich úspěšnou interakci s plžem. Doposud jim však nebyla věnována větší pozornost.

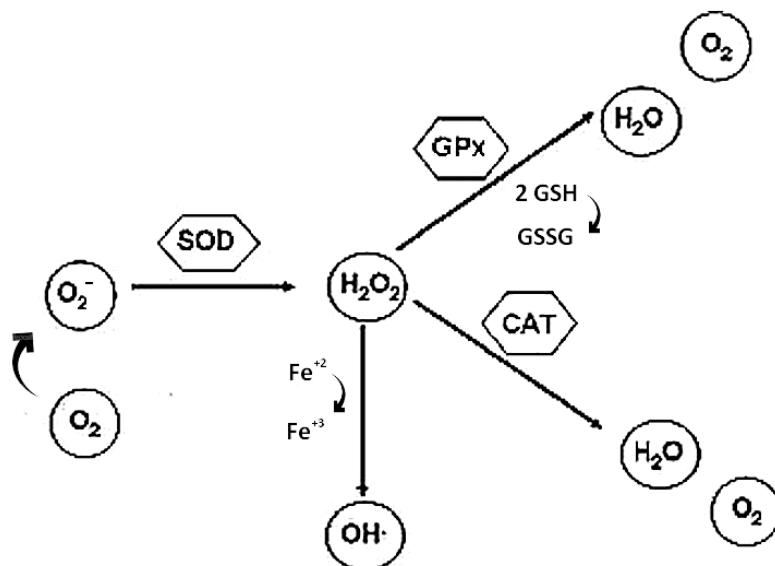
Motolice ve svém vývojovém cyklu přizpůsobují hladiny antioxidačních enzymů prostředí, které je obklopuje. Významná je proto zejména exprese těchto enzymů na povrchu motolice, ale jejich výskyt byl popsán např. i v larválních exkrementně-sekrecních produktech (Zelck a Janowsky 2004; Wu et al. 2009). Antioxidační enzymy jsou vysoce konzervované molekuly (Brophy a Pritchard 1994; Chiumiento a Bruschi 2009). Přítomnost katalytického jádra a jeho elektrontransportní vlastnosti jsou součástí většiny antioxidačních molekul (Chiumiento a Bruschi 2009). Antioxidační reakce jsou principiálně oxidačně-redukční. Každý antioxidační enzym má svou specifickou strukturu a plní v detoxifikační kaskádě jinou úlohu. Liší se také svou lokalizací u jednotlivých larválních stádií motolic (Chiumiento a Bruschi 2009). Kaskádu antioxidačních enzymů zahrnuje (Obr.3):

#### **Superoxid dismutáza (SOD)**

Počáteční enzym antioxidační kaskády plžů je superoxid dismutáza (SOD) (Zelck a Janowsky 2004). SOD je enzym sloužící primárně k dismutaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík. Detailněji bude popsána v následujících kapitolách.

## Kataláza (CAT)

Kataláza (CAT) je významný antioxidantní enzym, který katalyzuje přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ . Bylo zjištěno, že přítomnost katalázy v médiu s  $\text{H}_2\text{O}_2$  zvyšuje životaschopnost sporocyst *S. mansoni* (Zelck a Janovsky 2004; Bender 2002). I přesto se však kataláza u motolic nevyskytuje. Detoxifikace  $\text{H}_2\text{O}_2$  je u nich nahrazena jinými antioxidantními enzymy, a to peroxiredoxiny a glutathionperoxidázami (Mourão et al. 2009; Chiumiento a Bruschi 2009).



**Obr.3 Detoxifikace superoxidového radikálu  $\text{O}_2^-$  a peroxidu vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Antioxidantní enzym superoxid dismutáza (SOD) se podílí na eliminaci  $\text{O}_2^-$  za tvorby  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ze kterého se může dále tvořit nestabilní hydroxylový radikál  $\text{OH}\cdot$ . Další antioxidantní enzym, kataláza (CAT), jejíž role je u motolic nahrazena glutathion peroxidázou (GPx), přeměňuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ . (Chiumiento a Bruschi 2009; upraveno).

## Peroxiredoxiny (Prx) a Glutathionperoxidázy (Gpx)

Enzymové rodiny peroxiredoxinů a glutathionperoxidáz zahrnují enzymy, které u motolic nahrazují funkci katalázy. V rámci oxidačně-redukčních reakcí mezi enzymem a substrátem, nejčastěji glutathionem (GSH), detoxifikují  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ . Mezi peroxiredoxiny patří thioredoxin (Trx), thioredoxin reduktáza (TrxR), peroxiredoxin (Prx) a thioredoxin glutathion reduktáza (TGR) (Chiumiento a Bruschi 2009). Mezi glutathionperoxidázy patří samotná glutathionperoxidáza (Gpx) a glutathion reduktáza (GR) (Salinas et al. 2004; Gourbal et al 2008.; Chiumiento a Bruschi 2009). Jednotlivé druhy motolic se liší v zastoupení těchto enzymů (Chiumiento a Bruschi 2009). Například u všech vývojových stádií motolice *S. mansoni* se vyskytuje enzym Gpx, který se redukuje za současné oxidace svého substrátu GSH. GSH také snižuje reaktivitu hydrofobních molekul, a to např. peroxidovaných lipidů a transformuje je na molekuly hydrofilní, tedy lépe rozpustné a

degradovatelné (Rossi a Masich 1999; Salinas 2004). Podobnou aktivitu jakou má enzym Gpx má i enzym Tpx, který se namísto GPx vyskytuje u sporocyst *F. hepatica* (Gourbal et al. 2008). Funkci enzymů TrxR a GR u motolic nahrazuje enzym TGR, redukující oxidované formy obou molekul Trx i GSSH, které pak mohou znovu působit v antioxidační kaskádě. TrxR byl popsán u motolic *S. mansoni* a *F. hepatica* (Salinas et al. 2006).

Peroxiredoxiny a glutathionperoxidázy však neslouží pouze při detoxifikaci  $H_2O_2$ , ale i při detoxifikaci volných radikálů organických peroxidů vznikajících při peroxidaci lipidických membrán (Salinas et al. 2006; LoVerde 1998). Tyto sloučeniny jsou následně detoxifikovány na příslušný alkohol a vodu (Salinas 2004; Chiumiento a Bruschi 2009). Dále se uplatňují při reaktivaci antioxidačních molekul jako např. vitamínu C (Norberg et al. 2001). U larev motolic *S. mansoni* jsou popisovány jak glutathionperoxidázy, tak peroxiredoxiny (Mourão et al. 2009). Nejnížší hladiny glutathionperoxidázy se u *S. mansoni* vyskytují u dceřiné sporocysty a nejvyšší hladiny naopak u cercárií a miracií (Zelck a Janowsky 2004). Hladiny enzymů detoxifikujících peroxidy jsou ovlivněny prostředím, ve kterém se jednotlivá larvální stádia nachází. Tato prostředí se liší v koncentraci kyslíku a jeho radikálů (Tielens et al. 1991; Yoshino 2010). Peroxiredoxiny byly u miracidia *S. mansoni* detekovány kolem apikální papily a u mateřské sporocysty na povrchovém tegumentu (Vermeire a Yoshino 2007). Práce věnující se peroxiredoxinům navíc dokládá, že larvální stádia mateřské sporocysty po transformaci produkují více Prx než miracidium. (Vermeire a Yoshino 2007).

### **Glutathion-S-transferáza (GST)**

Glutathion-S-transferáza (GST) chrání motolice před poškozením způsobeným sekundárními metabolity vznikajícími při působení ROS molekul (Mei a LoVerde 1997). Takové molekuly představují např. karbonylové sloučeniny vzniklé při peroxidaci lipidových membrán (Zelck a Janowsky 2004). GST také zprostředkovává působení GSH a jeho oxidačně-redukční reakce s dalšími molekulami či toxickými produkty uvnitř hostitelského organismu (Yan et al. 2008; Chiumiento a Bruschi 2009)

U motolice *S. mansoni* je enzym GST produkován u všech vývojových stádií (Zelck a Janowsky 2004). Larvální stádia exprimují GST i bez přítomnosti vyšších hladin toxického  $H_2O_2$ . Během infekce plže *B. glabrata* dochází pouze k mírnému zvýšení produkce u jednotlivých larválních stádií (Zelck a Janowsky 2004). Přesto je patrné, že u cercárie je hladina GST nejvyšší a u dceřiné sporocysty nejnížší (Zelck a Janowsky 2004). Další autoři identifikovali GST jako součást exkrecečně-sekrecečních produktů, které vylučovalo miracidium *S. mansoni* při transformaci v mateřskou sporocystu uvnitř plže *B. glabrata* (Wu et al. 2009).

Bylo prokázáno, že přítomnost tohoto enzymu zvyšuje přežívání nově transformovaných sporocyst (Wu et al. 2009).

### **Neenzymatické antioxidační molekuly**

Dalšími antioxidačními molekulami, jejichž primární funkce není často pouze detoxifikace ROS molekul, jsou například cytochrom C, vitamin C, E,  $\beta$ -karoten nebo a kyselina močová (Chiumiento a Bruschi 2009). V rámci antioxidačních funkcí pomáhají detoxifikovat ROS a jeho produkty vzniklé při peroxidaci lipidových membrán (Chiumiento a Bruschi 2009). Například cytochrom C, který se hlavně uplatňuje při oxidativní fosforylaci mitochondrií, je schopen detoxifikovat jak superoxidový radikál na molekulární kyslík, tak peroxid vodíku na vodu a kyslík (Skulachev 1998). Dále také kyselina močová působí pozitivně při detoxifikaci peroxynitritu a zvyšuje tak přežívání sporocyst (Hahn et al. 2001). Redie motolice *Echinostoma trivolvis* využívá dokonce barviva  $\beta$ -karoten a lutein svého hostitele (plž *Helisoma trivolvis*), které se vyskytují v jeho povrchových epiteliích (Bernard et al. 1993).  $\beta$ -karotenu je u helmintů obecně uváděn jako antioxidant, ale detailnější popis antioxidačních funkcí u motolic chybí (Bernard et al. 1993; Chiumiento a Bruschi 2009). U motolice *S. mansoni* byly sledovány vitamíny E a C jako antioxidanty, přičemž bylo prokázáno, že tyto molekuly nemohou zcela nahradit funkci antioxidačních enzymů (Ivanchenko et al. 1999). Navíc bylo zjištěno, že vitamín C také interaguje s enzymem TrxR, který redukuje jeho oxidovanou formu a tím ho opět reaktivuje (Nordberg et al. 2001). Přes tyto poznatky jsou však neenzymatické antioxidační molekuly u motolic ve vztahu k infekcím plžů málo prostudovány.

### **3.2. Superoxid dismutáza (SOD) larev motolic**

Superoxid dismutáza patří do primárních enzymů detoxifikační kaskády motolic (Chiumiento a Bruschi 2009). Tento enzym detoxifikuje superoxidový radikál na peroxid vodíku podobně jako SOD plže (Goodal et al. 2004, Roger et al. 2008). Poté dochází k detoxifikaci peroxidu vodíku dalšími enzymy detoxifikační kaskády. Superoxid dismutáza byla v detoxifikačním systému dospělých motolic *S. mansoni* popsána ve více izoformách (cytosolická Cu/Zn SOD a signální SP-SOD) (Mei a LoVerde 1997; Cardoso et al. 2004). Naproti tomu byla u larev *S. mansoni* detekována pouze cytosolická Cu/Zn SOD (Wu et al. 2009). Tento typ SOD byl také u *S. mansoni* identifikován jako součást larválních exkrecečně-sekrecečních produktů, kde zvyšoval přežívání mateřských sporocyst (Wu et al. 2009). Stejně tak u motolice *F. hepatica* byla Cu/Zn SOD identifikována jako součást exkrecečně-sekrecečních

produktů mateřské sporocysty (Gourbal et al. 2008). Mateřská sporocysta *Echinostoma caproni* také produkuje v exkrementě-sekrecích produktech Cu/Zn SOD (Guillou et al. 2007), a to dokonce více než mateřská sporocysta *S. mansoni* (Guillou et al. 2007).

Enzym Cu/Zn SOD je strukturálně konzervována napříč eukaryotickými organismy. Tvoří ho dvě podjednotky skládající se z několika  $\beta$ -skládaných listů (Cardoso et al. 2004). Každá podjednotka obsahuje ve své struktuře měďnaté a zinečnaté ionty (Yim et al. 1993; Cardoso et al. 2004). Aktivátorem Cu/Zn SOD je superoxidový radikál. Mále záporně nabitě molekuly, jako je např. KCN mohou blokovat vazebné místo  $O_2^-$  a tím SOD inhibují (Yim et al. 1993). Enzym SOD může také katalyzovat produkci  $OH^\cdot$  a zmírnit tak toxické působení  $H_2O_2$  (Yim et al. 1993). K této funkci však dochází zejména v situacích, když koncentrace  $H_2O_2$  dosáhne takových hodnot, že ochranný peroxiredoxinový systém nestíhá tyto hladiny detoxifikovat (Yim et al. 1993; Mourão et al. 2009). Inhibice in vitro aktivity SOD pomocí  $H_2O_2$  je vzhledem k jeho neutrálnímu náboji pomalá (Roger et al. 2008; Mourão et al. 2009). Během pokusů autoři inhibovali aktivitu enzymu superoxid dismutázy použitím různých koncentrací peroxidu vodíku. (Lalrinkima et al. 2015).

### **3.3 Produkce SOD v souvislosti s kompatibilitou plže a motolice**

Expres SOD je jedním z faktorů podmiňujících kompatibilitu plže a motolice (Zelck a Janowsky 2004). Hladina SOD a dalších AOE fluktuje vzhledem ke stádiu infekce a kompatibilitě mezipřehostitele (Zelck a Janowsky 2004, Roger et al. 2008). Motolice využívají SOD k detoxifikaci superoxidového radikálu, čímž zároveň ovlivňují produkci a následné působení peroxidu vodíku (Connors et al. 1991).

K produkci  $H_2O_2$  využívá plž vlastní SOD, přičemž hladina tohoto enzymu je podobně jako u motolice ovlivněna kompatibilitou plž-motolice (Zelck a Janowsky 2004; Moné et al. 2011). Rezistentní plž produkuje více SOD, čímž se zvyšuje koncentrace  $H_2O_2$ , jenž je pro motolice nejtoxičtější (Moné et al. 2011). V tomto ohledu se zdají reakce plže a motolice protichůdné. Plž produkuje SOD, aby zvýšil toxický účinek ROS, motolice se snaží produkcí SOD o pravý opak - snížení toxického působení ROS, resp. superoxidového radikálu. Superoxid dismutáza je u motolice *S. mansoni* exprimována ve vysokých koncentracích i bez přítomnosti ROS produkovaných hemocyty (Mourão et al. 2009).

Během sledování exprese SOD u motolice se, podobně jako u plžů, autoři snažili porovnat její produkci po nákaze kompatibilního a nekompatibilního plže. Pokud autoři využili miracidia a následně sporocysty motolice *S. mansoni* k nákaze kompatibilního a

nekompatibilního kmene plže *B. glabrata*, pozorovali vyšší expresi SOD u kompatibilní motolice (Roger et al. 2008). Na histologických řezech byla nekompatibilní sporocysta *S. mansoni* také enkapsulována hemocyty. Největší rozdíl mezi kompatibilní a nekompatibilní motolicí v produkci SOD byl pozorován již hodinu po penetraci miracidí *S. mansoni* do meziphostitele *B. glabrata*. U rezistentního hostitele byly dále porovnávány enkapsulované larvy hemocyty plže, a to mezi 4. a 8. hodinou po infekci (Roger et al. 2008). V této době byl také detekována vyšší exprese SOD u kompatibilní motolice. Enkapsulace kompatibilních miracidí nebyla pozorována, což vedlo k rozvinutí infekce plže (Roger et al. 2008). Další autoři inkubovali sporocysty *S. mansoni* in vitro podmínkách s hemolymfou kompatibilního a nekompatibilního plže, která obsahovala přibližně stejný počet hemocytů (Zelck a Janowsky 2004). Během pozorování došli autoři obou prací k tomu, že intenzita exprese SOD je vyšší u kompatibilního kmene motolice. Pozorována byla také vyšší produkce SOD u kompatibilní motolice, a to po 12 hodinách od zahájení inkubace sporocyst *S. mansoni* s hemolymfou *B. glabrata* (Zelck a Janowsky 2004). Kompatibilní motolice produkovala vyšší hladiny SOD po dobu 36 až 48 hodin. Kolem 48. hodiny došlo sice k enkapsulaci larev hemocyty, avšak produkce SOD přetrvávala a motolice byla schopna v plži přežít. Naproti tomu motolice inkubované s hemocyty rezistentního plže produkovaly mezi 24. až 36. hodinou nižší hladiny SOD, docházelo k jejich enkapsulaci a vysoké mortalitě sporocyst. Po 48. hodině již nekompatibilní motolice SOD neprodukovala (Zelck a Janowsky 2004).

Vzhledem k uvedeným poznatkům se však nabízí otázka, jak je možné, že SOD působí v produkci i detoxifikaci ROS molekul motolic. Částečně to lze vysvětlit tím, že motolice je schopna využívat  $H_2O_2$  plže jako vlastní zásoby  $H_2O_2$ , a to např. k produkci  $OH^\cdot$  (Roger et al. 2008). Hydroxylový radikál je totiž pro motolice méně toxický než  $H_2O_2$  (Hahn et al. 2001).

### **3.4. Produkce SOD v ontogenetickém vývoji motolic**

Larvální stádia motolic střídají během svého životního cyklu různá prostředí a tomu přizpůsobují i svůj metabolismus včetně produkce SOD (Zelck a Janowsky 2004; Chiumiento a Bruschi 2009). Jak již bylo zmíněno nejprozkoumanějším druhem je v tomto ohledu motolice *S. mansoni*, která využívá jako meziphostitele plže *B. glabrata* (Bayne 2009; Yoshino et al. 2010). Největší koncentraci ROS čelí povrch larev, kvůli tomu na něm dochází k největší expresi SOD (Zelck a Janowsky 2004; LoVerde 1998). Stádium miracidia a cercarie se pohybuje ve vnějším prostředí, kde je vystaveno vyšším koncentracím kyslíku (Yoshino et

al. 2010). Má proto i vyšší hladiny SOD v porovnání se stádií z mezihostitelského plže (Zelck a Janowsky 2004).

Při transformaci miracidia v mateřskou sporocystu dochází ke kontaktu s imunitním systémem plže. V těchto fázích infekce obsahují exkrečně sekreční produkty mateřské sporocysty *S. mansoni* zvýšené koncentrace SOD, což podporuje její přežití (Wu et al. 2009). Mateřská a dceřiná sporocysta vyskytující se uvnitř hostitelského plže využívá anaerobní metabolismus (Tielens et al. 1991). Dceřiná sporocysta ke svému vývoji potřebuje hypoxické prostředí, díky tomu není potřeba vysoká produkce SOD (Bixler et al. 2001). Někteří autoři také popisují, že dceřiné sporocysty *S. mansoni* jsou chráněny před ROS svou lokalizací okolo hepatopankreatu, kde je nižší výskyt hemocytů (de Souza et al. 1995; Zelck a Janowsky 2004). Další práce také poukazují na to, že v případě *S. mansoni* je součástí hemolymfy jejího mezihostitele *B. glabrata* hemoglobin, který může být pro sporocysty toxický (Misra a Fridowich 1972; Bender et al. 2002). Během autooxidace hemoglobinu, dochází k transportu náboje mezi hemovým železem a kyslíkem, díky čemuž je produkován  $O_2^-$ . Vzhledem k tomu potřebuje sporocysta produkovat SOD a bránit se před poškozením (Mirsa a Fridowich 1972; Bender et al. 2002; Yoshino et al. 2010). V současné době však chybí práce věnující se detailnějšímu popisu produkce SOD v rámci larválního vývoje motolic.

#### 4. Závěr

V této práci byly shrnuty dosavadní znalosti o oxidačním vzplanutí plžů a o antioxidačním systému larev motolic. Zvláštní důraz byl kladen na produkci superoxidového radikálu a jeho eliminaci antioxidačním enzymem superoxid dismutázou. Tato interakce je pravděpodobně jedním z faktorů, který určuje kompatibilitu plžů a motolic. Imunitní odpověď plžů v přítomnosti larev motolic je závislá na druhové a kmenové příslušnosti plže a motolice. V rámci studia mezihostitelské specifity motolice k plži je hlavní otázkou to, jak je možné, že určitý druh motolice může úspěšně nakazit pouze určitý druh plže. Za možného původce rezistence plžů byla označena alela *sod1*, která ovlivňuje produkci superoxid dismutázy plže. Zvýšená exprese superoxid dismutáza potlačuje expresi dalších antioxidačních enzymů včetně katalázy, která detoxifikuje peroxid vodíku na vodu a kyslík. Vzhledem k této nerovnováze kataláza neodbourává peroxid vodíku dostatečně rychle a peroxid vodíku tak déle toxicky působí na povrchový tegument motolic. Nejen plž přizpůsobil motolicím své obranné mechanismy, ale i motolice vyvinula různé adaptace pomocí nichž v plži přežije. Působení superoxidového radikálu a následně pak peroxidu vodíku, vede k nevratnému poškození povrchového tegumentu motolice a k její eliminaci. Především kvůli tomu má motolice výkonný antioxidační systém, kterým detoxifikuje toxické působení reaktivních produktů kyslíku. Díky vysoké specifitě vůči svému mezihostiteli reguluje motolice hladiny superoxid dismutázy vzhledem k produkci reaktivních meziproduktů kyslíku hemocyty plže. Superoxid dismutáza motolice je víceúčelový enzym. Katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu, který je součástí metabolických pochodů motolice a zároveň ji chrání před toxickým působením molekul imunitního systému plže. Produkce superoxid dismutázy závisí na vývojovém stádiu či kompatibilitě motolice k danému druhu plže.

Znalosti o antioxidačních enzimech motolic a jejich interakcích s imunitním systémem plžů vedou k bližšímu poznání fenoménu kompatibility mezi plžem a motolicí. V současné době se však většina poznatků o této problematice týká několika málo druhů. V mém navazujícím studiu bych se proto ráda věnovala rozšíření znalostí o antioxidačním systému motolic a jeho interakci s imunitním systémem plžů, a to u námi dostupných modelů. Ty představují dva druhy ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* (*T. szidati* a *T. regenti*) a dva druhy lymnaeidních plžů (*Lymnaea stagnalis* a *Radix lagotis*). V rámci těchto modelů lze pracovat s kompatibilní dvojicí (např. *T. regenti* a *R. lagotis*) a nekompatibilní dvojicí (např. *T. regenti* a *L. stagnalis*). U nich bude možné porovnat produkci superoxidového radikálu, detekovat enzym superoxid dismutázu, a sledovat její aktivaci, expresi a další. K tomu budou

využity různé biochemické metody nebo histochemické analýzy. Provedeny budou jak infekční experimenty plžů motolicemi, tak experimenty v in vitro podmínkách. Získaná data budou pro popsané druhy organismů zcela nová a navíc platná i z hlediska srovnávací imunologie.

## 5. Použitá literatura

- Adema CM, Loker ES. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Dev Comp Immunol*. 2015;48:275-283. doi:10.1016/j.dci.2014.06.014
- Adema CM, Hertel L a, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:8691-8696. doi:10.1073/pnas.94.16.8691.
- Adema CM, Van Deutekom-Mulder EC, Van Der Knaap WPW, Sminia T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitol*. 1994; 109:479-485.
- Adema CM, Van Deutekom-Mulder EC, Van Der Knaap WPW, Sminia T. NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *J Leukoc Biol*. 1993;54:379-383
- Adema CM, Van Deutekom-Mulder EC, Van Der Knaap WPW, Meuleman EA, Sminia T. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Dev Comp Immunol*. 1991;15: 17-26
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:42-47. doi:10.1016/j.coi.2003.12.001.
- Babior BM. NADPH oxidase: An Update. *Blood*. 1999;93:1464-1476.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological Defense Mechanism: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973;52:741-744. doi:10.1172/JCI107236.00.02
- Baehner RL, Murrmann SK, Davis J, Johnston RB. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. *J Clin Invest*. 1975;56:571-576. doi:10.1172/JCI108126.
- Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: A 2009 assessment. *Mol Biochem Parasitol*. 2009;165:8-18. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.01.005.

- Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitol.* 2001;123 Suppl:S159-S167. doi:10.1017/S0031182001008137.
- Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 1997;272:19633-19636. doi:10.1074/jbc.272.32.19633.
- Bender RC, Broderick EJ, Goodall CP, Bayne CJ. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than susceptible snails. *J Parasitol.* 2005;91:275-279. doi:10.1645/GE-415R.
- Bender RC, Bixler LM, Lerner JP, Bayne CJ. *Schistosoma mansoni* sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to in vitro oxidative stress. *J Parasitol.* 2002;88:14-18. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0014:SMSICH]2.0.CO;2.
- Bernard F, Kelly B, Sherma J. Thin-Layer Chromatographic Analysis of Beta-Caroten and Lutein in *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) Rediae. *J Parasitol.* 1993;79:113-114
- Bixler LM, Lerner JP, Ivanchenko M, McCormick RS, Barnes DW, Bayne CJ. Axenic culture of *Schistosoma mansoni* sporocysts in low O<sub>2</sub> environments. *J Parasitol.* 2001;87:1167-1168. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[1167:ACOSMS]2.0.CO;2.
- Blouin MS, Bonner KM, Cooper B, Amarasinghe V, O'Donnell RP, Bayne CJ. Three genes involved in the oxidative burst are closely linked in the genome of the snail, *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol.* 2013;43:51-55. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.020.
- Brophy PM, Pritchard DI. Parasitic Helminth Glutathione S-Transferases; An Update on Their Potential as Targets for Immuno- and Chemotherapy. *Exp parasitol.* 1994;79:89-96.
- Cardoso RMF, Silva CHTP, De Araújo APU, Tanaka T, Tanaka M, Garratt RC. Structure of the cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2004;60:1569-1578. doi:10.1107/S0907444904016798.
- Connors VA, Lodes MJ, Yoshino TP. Identification of *Schistosoma mansoni* Sporocyst Excretory-Secretory Antioxidant Molecule and Its Effect on Superoxide Production by *Biomphalaria glabrata* Hemocytes. *J Invertebr Pathol.* 1991;58:387-395
- De Souza CP, Cunha RDE C, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev Inst Med trop Sao Paulo.* 1995;37:201-206
- Dikkeboom R, Van der Knaap WP, Meuleman E a, Sminia T. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunol.* 1985;55:547-553.

- Dikkeboom R, Bayne CJ, Wil PV, Van der Knaap, Jolanda MGH Tijnagel. Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol Res.* 1988;75:148-154.
- Ernst S, Linn H, Linn S. Formation, Prevention and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem.* 1997;272:19095-19098.
- Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J Biol Chem.* 2004;279:51715-51718. doi:10.1074/jbc.R400024200.
- Goodall CP, Bender RC, Broderick EJ, Bayne CJ. Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Mol Biochem Parasitol.* 2004;137:321-328. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.06.011.
- Gopalakrishnan S, Thilagam H, Huang W, Wang K. Chemosphere Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere.* 2009;75:389-397. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.027.
- Gorbushin AM., Iakovleva NV. Functional characterization of *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia) blood cells. *J Mar Biol Assoc UK.* 2007;87:741. doi:10.1017/S0025315407050801.
- Gornowicz D, Dmochowska K, Zbikowska E, Zóltowska K. Total antioxidative status and the activity of peroxidase and superoxide dismutase in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* (L.) naturally infected with digenean trematodes. *J Molluscan Stud.* 2013;79:225-229. doi:10.1093/mollus/eyt019.
- Gourbal BEF, Guillou F, Mitta G, Sibille P, Théron A, Pointier JP, Coustau C. Excretory-secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;161:63-66. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.05.002.
- Guillou F, Roger E, Mone Y, Rognon A, Granau C, Théron A, Mitta G, Coustau C, Gourbal BEF. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;155:45-56
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. *Dev a Comp Immunol.* 2000;24:531-541.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 2001;87:778-785. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0292:KOSMSB]2.0.CO;2.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:345. doi:10.1042/BST0290345.

- Humphries JE, Yoshino TP. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates. *Integr Comp Biol.* 2003;43:305-312. doi:10.1093/icb/43.2.305.
- Humphries JE, Å TPY. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. 2008:554-562. doi:10.1016/j.dci.2007.09.001.
- Chiumiento L, Bruschi F. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitol Res.* 2009;105:593-603. doi:10.1007/s00436-009-1483-0.
- Ivanchenko MG, Lerner JP, McCormick RS, Toumadie A, Allen B, Fischer K, Hedstrom O, Helmrich A, Barnes DW, Bayne CJ . Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4965-4970. doi:10.1073/pnas.96.9.4965.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide Antibacterial System. *J Bacteriol.* 1968;95:2131-2138.
- Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;351:289-305.
- Lacchini AH, Davies AJ, Mackintosh D, Walker AJ. Beta-1, 3-glucan modulates PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* defence cells: a role for PKC in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and downstream ERK activation. *J Exp Biol.* 2006;209:4829-4840. doi:10.1242/jeb.02561.
- Lalrinkima H, Raina OK, Chandra D, Jacob SS, Bauri RK, Chandra S, Yadav HS, Singh MN, Rialch A, Verghese A, Banerjee PS, Kaur N, Sharma A. Isolation and characterization of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol.* 2015;151-152:1-7. doi:10.1016/j.exppara.2015.01.014.
- Lambert C, Soudant P, Jegaden M, Delaporte M, Labreuche, Moal J, Samain JF. In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture.* 2007;270:413-421. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.074.
- Lardans V, Serra E, Capron a, Dissous C. Characterization of an intracellular receptor for activated protein kinase C (RACK) from the mollusc *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 1998;88:194-199. doi:10.1006/expr.1998.4236.
- Leslie RGQ, Allen R. Evaluation and improvements of a rapid microassay for measuring superoxide anion production by phagocytes: 2. Biochemical aspects. *Journal of Immunol Methods.* 1987;103:261-266.
- Lo Verde PT. Do Antioxidants Play a Role in Schistosome Host – Parasite Interactions?. *Parasitol Today.* 1998;14.

- Ludtmann MHR, Rollinson D, Emery AM, Walker AJ. Protein kinase C signalling during miracidium to mother sporocyst development in the helminth parasite, *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*. 2009;39:1223-1233. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.002.
- Makino R, Tanaka T, Iizuka T, Ishimuras Y, Kanegasaki S. Stochiometric Conversion of Oxygen to Superoxide Anion during the Respiratory Burst in Neutrophils. *J Biol Chem*. 1986;261:11444-11447.
- Mei H, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol*. 1997;86:69-78. doi:10.1006/expr.1997.4150.
- Misra HP, Fridovich I. The Generation of Superoxide Radical during the Autoxidation of Hemoglobin. *J Biol Chem*. 1972;64:6960-6962.
- Mkoji GM, Smith JM, Prichard RK. Antioxidant system in *Schistosoma mansoni*: evidence for their role in protection of the adult worms against oxidative killing. *Int J Parasitol*. 1988;18:667-673. doi:10.1016/0020-7519(88)90102-6.
- Moné Y, Ribou AC, Cosseau C, Duval D, Théron A, Mitta G, Gourbal B. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *Int J Parasitol*. 2011;41:721-730. doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007.
- Mourão MDM, Dinguirard N, Franco GR, Yoshino TP. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3. doi:10.1371/journal.pntd.0000550.
- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Biochim Biophys Acta*. 2001;31:1287-1312.
- Pinheiro J, Maldonado Júnior a., Lanfredi RM. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. *Parasitol Res*. 2009;106:55-59. doi:10.1007/s00436-009-1630-7.
- Plows LD, Cook RT, Davies AJ, Walker AJ. Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2004;1692:25-33. doi:10.1016/S0167-4889(04)00042-4.
- Plows LD, Cook RT, Davies AJ, Walker AJ. Carbohydrates that mimic schistosome surface coat components affect ERK and PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Int J Parasitol*. 2005;35:293-302. doi:10.1016/j.ijpara.2004.11.012.
- Plows LD, Cook RT, Davies AJ, Walker AJ. Phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes: A potential role for phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase A. *J Invertebr Pathol*. 2006;91:74-77. doi:10.1016/j.jip.2005.10.011.

- Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchet A, Rognon A, Granau C, Boissier J, Théron A, Gourbal BEF. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;157:205-216. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.003.
- Roger E, Grunau C, Pierce RJ, Hiraj H, Gourbal B, Galinier R, Emans R, Cesari IM, Cosseau C, Mitta G. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2. doi:10.1371/journal.pntd.0000330.
- Rossi LCG; Masih DT. Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 1999;119:627-633.
- Salamat Z, Sullivan JT. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *Dev Comp Immunol*. 2009;33:725-727. doi:10.1016/j.dci.2009.01.001.
- Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM, Fernández C. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol*. 2004;20:340-346. doi:10.1016/j.pt.2004.05.002.
- Salinas G, Lobanov A V, Gladyshev VN. Selenoproteins in parasites. *Selenium*. 2006:355-366. doi:10.1007/0-387-33827-6\_31.
- Skála V, Černíková A, Jindrová Z, Kašný M, Vostrý M, Walker AJ, Horák P. Influence of *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae) on the Defence Activity of *Radix lagotis* (Lymnaeidae) Haemocytes. *PLoS ONE*. 2014;9:e111696. doi:10.1371/journal.pone.0111696.
- Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*. 1998;423:275-280. doi:10.1016/S0014-5793(98)00061-1.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. 2008;275:3249-3277. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x.
- Tielens Aloysius GM, Van de Pas Franciscus AM, Van den Heuvel Josephus M, Van den Bergh Simon G. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mol Biochem Parasito*. 1991; 46:181-184.
- Thomas EL. Myeloperoxidase Hydrogen Peroxide Chloride Anti-Microbial System - Effect of Exogenous Amines on Antibacterial Action Against *Escherichia Coli*. *Infect Immun*. 1979;25:110-116.
- Thompson SN, Mejia-Scales V, Borchardt DB. Physiologic studies of snail-schistosome interactions and potential for improvement of in vitro culture of schistosomes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1991;27:497-504. doi:10.1007/BF02631151.

- Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE*. 2006; 8. doi:10.1126/stke.3492006re8.
- Van der Knaap WPW, Adema CM, Sminia T. Invertebrate blood cells: Morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp Haematol Int*. 1993;3:20-26. doi:10.1007/BF00394923.
- Vermeire JJ, Yoshino TP. Antioxidant gene expression and function in in vitro-developing *Schistosoma mansoni* mother sporocysts: possible role in self-protection. *Parasitology*. 2007;134:1369-1378. doi:10.1017/S0031182007002697.
- Walker AJ. Do trematode parasites disrupt defence-cell signalling in their snail hosts? *Trends Parasitol*. 2006;22:154-159. doi:10.1016/j.pt.2006.02.003.
- Walker AJ, Plows LD. Bacterial lipopolysaccharide modulates Protein Kinase C signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biol Cell*. 2003;95:527-533. doi:10.1016/j.biolcel.2003.09.001.
- Webster JP, Davies CM. Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system. *Parasitol*. 2001;123:41-56. doi:10.1017/S0031182001008071.
- Wu JX, Sabat G, Brown JF, Zhang M, Taft A, Peterson N, Harms A, Yoshino TP. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Mol Biochem Parasitol*. 2009;64:32-44. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.11.005.
- Yan F, Yang WK, Li XY, Lin TT, Lun YN, Lin F, Lv SW, Yan GL, Liu JQ, Shen JC, Mu Y, Luo GM. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2008;1780:869-872. doi:10.1016/j.bbagen.2008.03.003.
- Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Enzyme Function of Copper, Zinc Superoxide-Dismutase as a Free-Radical Generator. *J Biol Chem*. 1993;268:4099-4105.
- Yoshino TP, Dinguirard N, Mourao MDM. *In vitro* manipulation of gene expression in larval *Schistosoma*: a model for postgenomic approaches in Trematoda. *Parasitology*. 2010;137:463-483. doi:10.1017/S0031182009991302.
- Zelck UE, Von Janowsky B. Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression. *Parasitology*. 2004;128:493-501. doi:10.1017/S0031182004004895.
- Zelck UE, Janje B, Schneider O. Superoxide dismutase expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by hemocytes of the trematode intermediate host *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda). *Dev Comp Immunol*. 2005;29:305-314. doi:10.1016/j.dci.2004.09.002.
- Zelck UE, Gege BE, Schmid S. Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. *Dev Comp Immunol*. 2007;31:321-331. doi:10.1016/j.dci.2006.06.006.