

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Zuzana Jindrová

**Aktivity hemocytů plovatkovitých plžů a jejich změny
způsobené nákazou trichobilharziemi**

Lymnaeid snails: hemocyte activities and their changes caused by

Trichobilharzia infections

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant: Mgr. Vladimír Skála

Praha 2013

Čestné 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, 15.8.2013

.....

Poděkování

Zde bych chtěla poděkovat v první řadě svému školiteli Petru Horákovi za vstřícnost a pomoc, která mě doprovázela během celého magisterského studia. Dále bych chtěla poděkovat Vláďovi za pomoc s pokusy, morální podporu ve chvílích, kdy „Ta monovrstva už zase nevyšla!“ a za společné inspirativní seance nad nesmyslnými výsledky. Dále děkuji Aleně Černíkové za pomoc se statistikou. Nakonec se omlouvám a děkuji za výdrž všem těm stovkám šneků, které jsem vysála...

Abstrakt

Měkkýši se stejně jako další bezobratlí živočichové spoléhají pouze na vrozenou imunitní odpověď. Jejich vnitřní obranný systém umí efektivně zakročit proti většině patogenů. Výjimku tvoří např. některé motolice, pro které plži představují tzv. kompatibilní mezihostitele. Motolice se dokážou v plži vyvíjet mj. díky intervenci do vnitřního obranného systému plže. Tato práce popisuje vybrané aktivity hemocytů u dvou plovatkovitých plžů *Lymnaea stagnalis* a *Radix lagotis*, a dále sleduje vliv nákazy motolicí *Trichobilharzia regenti* na hemocyty plže *R. lagotis*. Hemocyty obou plžů produkovaly v reakci na vybrané chemické stimuly různé množství H_2O_2 a NO. Tato odpověď se lišila mezi oběma plovatkovitými plži. Nákaza plžů *R. lagotis* motolicí *T. regenti* zvýšila počet kolujících hemocytů. Většina aktivit hemocytů byla však vlivem infekce inhibována. Snížena byla bazální produkce NO, schopnost fagocytovat bakterie, adherovat k povrchu a tvořit panožky. Práce popisuje mimo hemocytární aktivity i toxický vliv plazmy *L. stagnalis* pro miracidia nekompatibilní motolice *T. regenti*. Odhalení mechanismů, kterými motolice interaguje s vnitřním obranným systémem plžů, nám pomůže pochopit, proč je jeden druh plže vhodný pro její vývoj, zatímco druhý, ač blízce příbuzný, druh plže motolici zabije.

Klíčová slova: hemocyt, *Lymnaea stagnalis*, *Radix lagotis*, *Trichobilharzia regenti*, oxid dusnatý, peroxid vodíku, fagocytóza, spreading, enkapsulace, toxicita plazmy.

Abstract

Molluscs as well as all other invertebrates rely on innate immune response only. Their internal defense system is capable of destroying most pathogens. However, there are some exceptions, e.g. some snails serve as intermediate hosts for some trematodes. Trematodes are able to develop inside these snails due to intervention in the snail internal defense system. The submitted thesis describes hemocyte activities of two lymnaeid snails, *Lymnaea stagnalis* and *Radix lagotis*, and the influence of *Trichobilharzia regenti* infection on *R. lagotis* hemocytes. Hemocytes of both species exposed to various chemicals produced different amounts of H₂O₂ and NO. The response varied between both lymnaeid species. The amount of circulating hemocytes was elevated in *R. lagotis* snails due to *T. regenti* infection. However, the infection attenuated hemocyte activities monitored by us. Hemocyte basal NO production was decreased as well as phagocytosis of bacteria, cell adherence and pseudopodia formation. Toxicity of *L. stagnalis* plasma against *T. regenti* miracidia was also described. Mechanisms used by trematodes to interact with the snail internal defense system will help us to understand why one species is suitable for the development of the trematode whereas another closely related species kills it.

Key words: hemocyte, *Lymnaea stagnalis*, *Radix lagotis*, *Trichobilharzia regenti*, nitric oxide, hydrogen peroxide, phagocytosis, spreading, encapsulation, plasma toxicity.

Obsah

Úvod	1
1 Literární přehled	2
1.1 Měkkýši coby mezipřenositelé ptačích schistosom	2
1.2 Vnitřní obranný systém měkkýšů	2
1.2.1 Buněčná imunita	3
1.2.2 Humorální imunita	3
1.3 Strategie boje hemocytů s parazitární nákazou	4
1.3.1 Vznik kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého	4
1.3.2 Respirační vzplanutí u měkkýšů	7
1.3.3 Produkce NO u měkkýšů	8
1.3.4 Vliv infekce motolicemi na produkci ROS a NO	9
1.3.5 Fagocytóza	11
1.3.6 Vliv infekce motolicí na fagocytózu	11
1.3.7 Enkapsulace	13
1.3.8 Vliv infekce na enkapsulaci a spreading	14
1.3.9 Změna počtu hemocytů vlivem nákazy	15
2 Cíle práce	19
3 Materiál a metodika	20
3.1 Modelové organismy	20
3.2 Příprava homogenátu cercárií <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	20
3.3 Odběr hemolymfy a tvorba monovrstvy hemocytů	21
3.4 Počet hemocytů v monovrstvě	22
3.5 Počet hemocytů u zdravých a nakažených plžů <i>R. lagotis</i>	22
3.6 Produkce radikálů	23
3.6.1 Produkce peroxidu vodíku	24
3.6.2 Produkce oxidu dusnatého	25
3.7 Inhibice produkce NO u hemocytů <i>R. lagotis</i>	26
3.8 Fagocytóza	27
3.8.1 Příprava FITC-značených částic	27
3.8.2 Fagocytóza eukaryotických buněk	29
3.8.3 Fagocytóza bakterií	29
3.9 Adherence hemocytů a tvorba panožek	31
3.10 <i>In vitro</i> enkapsulace larev <i>T. regenti</i> hemocyty <i>L. stagnalis</i>	32

3.11	Toxicita plazmy plže <i>L. stagnalis</i>	33
3.12	Experimentální nákazy plžů nekompatibilními motolicemi	33
3.13	Hodnocení experimentální nákazy pomocí histologie	33
3.14	Statistika	34
4	Výsledky	36
4.1	Počet hemocytů plže <i>R. lagotis</i>	36
4.2	Produkce radikálů	36
4.2.1	Stimulovaná produkce peroxidu vodíku	37
4.2.2	Stimulovaná produkce oxidu dusnatého	39
4.2.3	Bazální produkce NO nakažených a zdravých plžů <i>R. lagotis</i>	40
4.2.4	Vliv čistoty prostředí na produkci NO	41
4.2.5	Inhibice produkce NO u hemocytů <i>R. lagotis</i>	44
4.3	Fagocytóza hemocytů <i>R. lagotis</i>	45
4.3.1	Fagocytóza FITC-značených částic	45
4.3.2	Fagocytóza hemocytů zdravých plžů <i>R. lagotis</i> a plžů nakažených <i>T. regenti</i> s využitím pHrodo	45
4.4	Schopnost hemocytů adherovat na povrch a tvořit panožky	47
4.5	Enkapsulace larev <i>T. regenti</i> hemocyty <i>L. stagnalis</i> <i>in vitro</i>	49
4.6	Toxický efekt plazmy	50
4.7	Hodnocení infekce plže pomocí histologie	51
4.7.1	Efektivita penetrace miracidí do nekompatibilních hostitelů	51
4.7.2	Mikroskopie histologických vzorků	52
5	Diskuse	53
5.1	Počet hemocytů	53
5.2	Produkce kyslíkových radikálů	55
5.3	Produkce oxidu dusnatého	56
5.4	Fagocytóza	60
5.5	Tvorba panožek a adheze hemocytů k povrchu	62
5.6	Enkapsulace larev motolice	62
5.7	Toxicita plazmy plžů pro larvy motolic	64
5.8	Infekce na histologických preparátech	65
	Závěr	68
	Použitá literatura	69

Úvod

Schistosomy jsou považovány za nejpatogennější skupinu motolic způsobující i smrt definitivních hostitelů. Ročně zemře na nákazu těmito motolicemi zhruba 200 000 lidí. Na území České republiky se lidské schistosomy nevyskytují, můžeme se zde ale setkat se zástupci příbuzného rodu *Trichobilharzia*, který parazituje ve vodních ptácích. Trichobilharzie sice nejsou schopné v lidech dospět, ale mohou jim způsobit tzv. cercáriovou dermatitidu (Kolářová 2007). Jejich meziphostitelem jsou plovatkovití plži. Běžně se v České republice vyskytuje plovatka *Lymnaea stagnalis*, která je specifickým meziphostitelem pro motolici *Trichobilharzia szidati*, a plovatka *Radix lagotis*, která je specifickým meziphostitelem pro motolici *Trichobilharzia regenti*.

Vnitřní obranný systém měkkýšů je založen pouze na vrozené odpovědi. Přestože postrádá adaptivní odpověď známou z obratlovců, je schopný efektivně zabíjet patogenní organismy. Výjimkou jsou právě některé druhy motolic, pro které představují určité druhy plžů tzv. kompatibilního meziphostitele. Během dlouhé koevoluce se motolice přizpůsobily tak, že vnitřní obranný systém plže motolici buď nedokáže rozeznat, nebo ji pozná, ale není ji schopen zabít. Toho může motolice dosáhnout např. intervencí do obranného systému plže. Parazit je schopný ovlivnit nejen vnitřní obranný systém svého hostitele, ale i jeho metabolismus, rozmnožování a dokonce i chování (Tunholi a kol. 2011; Boissier a kol. 2003).

Studium vnitřního obranného systému plže je zajímavé nejen z parazitologického, ale i z imunologického hlediska. V poslední době velmi populární toll-like receptory (TLR) zkoumané i u lidí (Medzhitov a kol. 1997; Kawai a Akira 2011) byly nejprve objeveny (ač původně s jinou funkcí než imunologickou) u bezobratlých organismů (toll receptor u drosofil) (Lemaitre a kol. 1996).

Studium obranného systému plžů pomáhá objasňovat jak důmyslnou interakci motolice s plžem, tak by mohlo stejně jako výzkum u drosofil v budoucnu přinést i důležité poznatky o imunitním systému lidí. Cílem této diplomové práce bylo zmapovat různé aktivity hemocytů a pokusit se vysvětlit, jakým způsobem motolice obchází imunitní systém svého kompatibilního plže.

1 Literární přehled

1.1 Měkkýši coby meziphostitelé ptačích schistosom

Měkkýši, konkrétně plži, poskytují vhodné prostředí pro vývoj mnoha druhů motolic, mezi něž patří i ptačí schistosomy. Životní cyklus ptačích schistosom je stejně jako u lidských schistosom dvouhostitelský. Pro úspěšné rozmnožení červa je nutný nejen definitivní hostitel (pták), ale i meziphostitel (vodní plž). V definitivním hostiteli se nachází dospělý jedinec, který produkuje pohlavním rozmnožováním vajíčka, zatímco v meziphostiteli se vyskytují larvální stadia, která se množí vždy asexuálně. Dospělec klade vajíčka, ze kterých se ve vodním prostředí líhne první larva, obrvené miracidium. Jediným jeho cílem je nalézt vhodného meziphostitele, a to vodního plže. Miracidium po penetraci do plže prodělá zásadní změnu v morfologii a metabolismu. Během penetrace odhazuje ciliární destičky (obrvení), na povrchu se objevuje syncytiální vrstva (neodermis). Z aerobního organismu se stává fakultativní anaerob, který je tak lépe přizpůsoben k životu uvnitř plže. Miracidium se tím mění na mateřskou sporocystu, která následně asexuálně produkuje dceřiné sporocysty. Ty se z místa penetrace (oblast nohy nebo hlavy) přesouvají do hepatopankreatu, kde se dále množí (vznikají další dceřiné sporocysty). Asi po 7 týdnech začíná vznikat další typ larev, cercárie, které unikají ven z plže. Začíná tím tzv. období patence, zatímco období před počátkem vylučování cercárií se označuje jako prepatentní perioda. Meziphostitelský plž slouží k obrovskému asexuálnímu namnožení, kdy z jedné larvy vzniknou desetitisíce až statisíce larev nových (de Souza a kol. 1995). Cercárie aktivně hledají definitivního hostitele, kachnu. Po úspěšném nálezů odhazují ocásek a penetrují kůží nohou, migrují hostitelem a dospívají v místě své definitivní lokalizace, kde produkuje vajíčka (Horák a kol. 2002). Schistosomy jsou obecně velmi hostitelsky specifické, a tedy jen jeden nebo dva konkrétní druhy plže jsou obvykle vhodné coby meziphostitel (Kock 2001). Pokud miracidium penetruje do nevhodného plže, je jeho vnitřním obranným systémem zničeno.

1.2 Vnitřní obranný systém měkkýšů

Schopnost motolic dlouhodobě přežívat uvnitř meziphostitele a dokonce se v něm úspěšně množit se vyvinula během dlouhé koevoluce. V případě kompatibilních dvojic plž–motolice

dochází k takovému utlumení imunitní odpovědi hostitele, že ten není schopen adekvátně reagovat a motolici zničit. Proto je jeden druh motolice obvykle vázán na jeden druh plže a v případě penetrace do nekompatibilního plže je motolice zabita (Loker a kol. 1982). Obranný systém měkkýšů je stejně jako u dalších bezobratlých pouze neadaptivní, a odpovídá tak vrozené imunitní odpovědi obratlovců. První bariéru pro penetrující miracidium představuje hlen na povrchovém epitelu. Pokud tuto bariéru překoná, dostává se do kontaktu s hemolymfou, která obsahuje kromě imunitních buněk i různé imunologicky důležité makromolekuly. Na zneškodnění nekompatibilní motolice se tak podílí jak humorální, tak i buněčná složka hemolymfy (van der Knaap a Loker 1990; de Jong-Brink a kol. 2001).

1.2.1 Buněčná imunita

V měkkýších existují čtyři druhy obranných buněk. Fagocytující retikulární buňky, porové buňky a antigen vychytávající endotelové buňky se vyskytují v tkáních, zatímco hemocyty dokážou z tkáně vystoupit, a pak volně kolovat v hemolymfě. Endotelové buňky vychytávající antigen jsou často první buňky, které se setkají s patogenem. Pomocí lektinů jsou schopné rozpoznat cizí částici, zachytit ji a předat ji profesionálním fagocytům – hemocytům. Porové buňky slouží asi hlavně k degradaci vlastních proteinů. Retikulární buňky obsahují velké množství lysosomů, a jsou tedy schopné degradovat celou řadu různých materiálů (Adema a kol. 1991a). Nejdůležitějšími buňkami v boji s infekcí jsou však hemocyty. Jsou schopné v reakci na přítomnost patogena produkovat toxické kyslíkové radikály a oxid dusnatý (viz kap. 1.3.1). Malé částice jako bakterie fagocytují (viz kap. 1.3.5) a objekty velikosti larvy motolice zničí pomocí enkapsulace (viz kap. 1.3.7) (Cheng 1981).

1.2.2 Humorální imunita

Humorální složka vnitřního obranného systému měkkýšů pomáhá rozpoznat cizorodé částice, informuje o tom efektorové buňky (hemocyty), čímž je i aktivuje. Její součástí je řada makromolekul, mezi nimi lektiny, lysosomální enzymy (např. lysozym, aminopeptidáza, fosfolipáza C), bakteriostatické a baktericidní látky (Adema a kol. 1991a) nebo nově objevené FREP proteiny obsahující fibrinogenovou a imunoglobulinovou doménu

(Adema a kol. 1997). Proteiny FREP fungují zřejmě na bázi lektinů jako tzv. „pattern recognition“ receptory (Gorbushin a Iakovleva 2011). Koncentrace FREP proteinů roste po infekci motolicí *Echinostoma paraensei*. Jejich exprese byla zvýšená i u rezistentních plžů *Biomphalaria glabrata* po expozici *Schistosoma mansoni*. Naopak u vnímavých plžů se exprese FREPs po expozici *S. mansoni* nezvýšila (Hertel a kol. 2005). Rezistentní plži, u kterých byla utlumena exprese FREP3, ztratili ve 20 % rezistenci vůči *S. mansoni* (Hannington a kol. 2012). Proteiny FREP tedy hrají důležitou roli v rezistenci plžů vůči nákaze motolicemi.

V plazmě byl také objeven protein s cytotoxickou aktivitou, který specificky zabíjí eukaryotické buňky (prvky, erytrocyty), avšak nikoliv prokaryotické buňky. Má lektinovou povahu a buňky zabíjí perforací membrány (Hubert a kol. 1997).

Za nejdůležitější složku plazmy byly vždy považovány lektiny. Lektiny jsou proteiny, které dokážou specificky rozeznávat jednotlivé sacharidové struktury a vázat se na ně. Jsou zodpovědné za aglutinaci cizích částic a propojují cizí částice s hemocyty. Slouží tak jako důležitý faktor při rozeznávání cizích struktur a zároveň zprostředkovávají tuto informaci hemocytům, které jsou poté schopné cizí částici zneškodnit. Označují cizorodé částice, a fungují tedy také jako opsoniny (Horák a van der Knaap 1997).

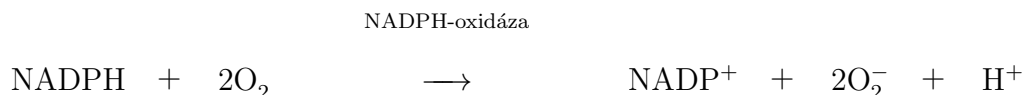
Humorální složka je alespoň z části zodpovědná za rezistenci/vnímavost plže k nákaze (Granath a Yoshino 1984) a nákaza motolicemi také způsobuje změny titrů různých proteinů hemolymfy (Loker a Hertel 1987).

1.3 Strategie boje hemocytů s parazitární nákazou

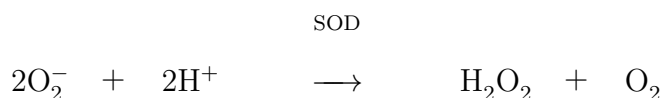
1.3.1 Vznik kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého

Respirační vzplanutí

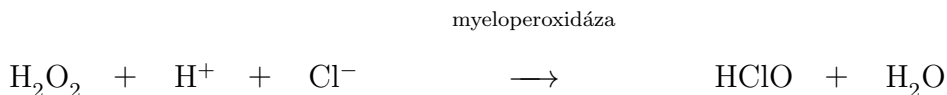
Respirační vzplanutí je obranný buněčný mechanismus, který se spouští v reakci na přítomnost cizí částice. Produktem jsou kyslíkové radikály (ROS, „reactive oxygen species“), které jsou pro patogeny obecně toxické. Jsou schopné denaturovat proteiny, peroxidovat lipidy v membráně nebo poškozovat DNA buněk (Halliwell a Aruoma 1991). Primárním produktem respiračního vzplanutí je superoxidový radikál (O_2^- , dále jen O_2^-) (Makino a kol. 1986). U měkkýšů, stejně jako u dalších organismů (včetně savců), je jeho vznik umožněn membránově vázaným enzymem NADPH-oxidázou (Adema a kol. 1993).



Z O_2^- vzniká H_2O_2 . Reakce je katalyzována enzymem superoxid dismutáza (SOD). Indukovatelná forma Cu/Zn dependentní superoxid dismutázy byla nalezena i u plže *L. stagnalis*. Její exprese je regulována na transkripční úrovni (Zelck a kol. 2005).



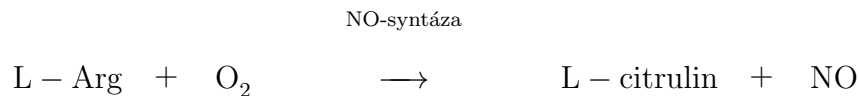
Mnoha reakcemi v buňkách vzniká řada vysoce reaktivních oxidantů (O_2^- , hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), kyselina chlorná (HClO) a peroxynitrit (ONOO^-)) i méně reaktivních produktů s poměrně dlouhým poločasem rozpadu ($\text{NO}\cdot$, H_2O_2). Většina O_2^- je přeměněna na H_2O_2 a většina H_2O_2 je dále přeměněna myeloperoxidázou na HClO (Hampton a kol. 1998).



Produkce ROS je spřažena s fagocytózou. Produkce superoxidu začíná růst současně s vchlipováním membrány fagosomu a extracelulární produkce klesá na bazální úroveň ve chvíli, kdy je částice pohlcena. Intracelulární produkce radikálů však pokračuje dál, což je důležité pro zdárné zničení patogena (Adema a kol. 1991b).

Produkce oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) je vysoce reaktivní a nestabilní plynný volný radikál s poločasem života několik sekund. Je produkován oxidací L-argininu za vzniku L-citrulinu a NO enzymem NO -syntáza (NOS). První potvrzení přítomnosti NOS u měkkýšů pochází ze sladkovodního plže *Viviparus ater* (Conte a Ottaviani 1995).



NOS neprodukuje jen NO, ale při nedostatku cytosolického L-Arg začíná produkovat i O_2^- . Reakcí O_2^- s NO vzniká vysoce reaktivní peroxynitrit (ONOO^-).



Peroxyinitrit sice nemá radikálovou povahu jako jeho prekurzor NO, je však mnohem reaktivnější. Jeho působením dochází k peroxidaci lipidů v membránách, DNA fragmentaci, oxiduje a nitrátuje proteiny. Celkově je tak schopný spustit apoptózu nebo nekrózu buněk (Virág a kol. 2003).

Samotný NO je pro buňky na rozdíl od peroxynitritu jen málo toxický. Ve chvíli, kdy je vznik obou prekurzorů peroxynitritu závislý jen na jednom enzymu, je jeho produkce mnohem efektivnější (O_2^- nestihne být přeměněn SOD na H_2O_2) (Xia a Zweier 1997). Existují tedy dvě nezávislé cesty tvorby O_2^- , přes NADPH-oxidázu a NOS.

U obratlovců zastává NO důležitou funkci nejen v imunitním systému, kde je produkován některými imunitními buňkami (např. makrofágy) v reakci na patogena, ale plní i řadu důležitých úkolů jinde. Molekula NO hraje významnou roli v přenosu signálu uvnitř buněk. Díky němu dochází mj. k relaxaci hladkého svalstva, a následně např. k vazodilataci. Dále má např. funkci neurotransmiteru nebo inhibuje degranulaci a adhezi krevních destiček (Gao 2010).

Buněčná regulace

Respirační vzplanutí i produkce NO jsou alespoň částečně řízeny pomocí MAP kináz („mitogen-activated proteinkinase“). Signální dráhy ze série typicky tří MAP kináz patří mezi evolučně velmi konzervované mechanismy přenosu signálu. Jejich aktivací vzniká odpověď na řadu stimulů, jejichž výsledkem je mimo imunitní obranné reakce i genová exprese, proliferace, diferenciace, změna v buněčném cyklu nebo apoptóza. Existuje šest základních skupin MAP kináz, z nichž nejvýznamnější jsou p38, JNK a ERK 1/2. Kináza

MEK 1/2 aktivuje fosforaylací kinázu ERK 1/2, a ta pak působí na transkripční faktory v jádře a spouští buněčnou odpověď. Řada hormonů, růstových a diferenciačních faktorů má vliv na tuto dráhu. Kinázy MEK i ERK existují ve dvou isoformách (1 a 2), obě MEK kinázy jsou schopné aktivovat obě dvě ERK kinázy. Funkce obou ERK kináz se zdá být stejná a neví se, proč existují dvě isoformy (Kolch 2000).

V obranné funkci hemocytů hraje ERK kináza zásadní roli. Je důležitá pro aktivaci produkce H_2O_2 , fagocytózu, enkapsulaci i schopnost hemocytů adherovat. Aktivací proteinkinázy C (PKC) hemocytů dochází k aktivaci ERK 1/2, a poté k produkci H_2O_2 (Lacchini a kol. 2006). Inhibicí ERK kinázy však není produkce H_2O_2 zcela potlačena, a musí tedy ještě existovat jiná forma aktivace. Tím by mohla být mj. i kináza p38, která se na produkci H_2O_2 také podílí (Humphries a Yoshino 2008).

Produkce NO je regulovaná PKC a ERK kinázou (Wright a kol. 2006). Inhibitor NOS není schopný inhibovat produkci NO u hemocytů stimulovaných různými stimulanty stejně efektivně. U mlže *Ruditapes decussatus* je schopný výrazně utlumit produkci stimulovanou lipopolysacharidem, zatímco produkci stimulovanou zymosanem jen částečně (Tafalla a kol. 2003). Stejně tak i u mlže *Mytilus galloprovincialis* lze produkci NO stimulovanou aktivátorem PKC inhibovat, zatímco produkci stimulovanou laminarinem nikoliv. Je tedy možné, že existuje ještě jiný způsob syntézy NO než pomocí enzymu NOS (Arumugam a kol. 2000).

1.3.2 Respirační vzplanutí u měkkýšů

Pro studium imunitní odpovědi hemocytů se používají různé stimulanty jako laminarin (β -1,3- a β -1,6-glukan), zymosan (β -1,3-glukan), PMA („phorbol myristate acetate“, aktivátor PKC), lipopolysacharid (LPS), interleukin-2 (IL-2), živé i teplem usmrcené bakterie, celá vývojová stadia parazitů nebo jejich exkrečně-sekreceční produkty (ESP).

Hemocyty různých druhů produkují různé molekuly v odpověď na stejné stimulanty. Ne všechny druhy jsou navíc respiračního vzplanutí vůbec schopné. Stejný stimulant, zymosan, spustí respirační vzplanutí u ústřice *Crassostrea gigas*, ne však u mlžů *Cerastoderma edule* nebo *R. decussatus* (López a kol. 1994). Množství vyprodukovaných radikálů po stimulaci zymosanem u hemocytů dvou ústřic *C. gigas* a *Ostrea edulis* se liší jak mezi oběma ústřicemi, tak i v rámci jednoho druhu. Vnitrodruhová variabilita je asi dána různým počtem hemocytů schopných dané odpovědi (Bachere a kol. 1991). Hemo-

cyty *M. galloprovincialis* produkují superoxid po stimulaci PMA i laminarinem. Zatímco vůči PMA jsou hemocyty 1000× citlivější než vůči laminarinu, bakteriální LPS nemá stimulační účinky vůbec (Arumugam a kol. 2000). Ještě vyšší efekt než PMA má však zymosan (Ordás a kol. 2000).

U mlžů bylo vzplanutí pozorováno u druhu *M. galloprovincialis* (Carballal a kol. 1997b), *Crassostrea virginica* (Bramble a Anderson 1997), *C. gigas* (López a kol. 1994) nebo *Tapes philippinarum* (Cima a kol. 2000). U mlžů chybí respirační vzplanutí asi u většiny zástupců řádu *Veneroida* (López a kol. 1994), výjimkou je však např. už zmíněný *T. philippinarum*.

U plžů bylo respirační vzplanutí pozorováno u druhu *B. glabrata* nebo plovatky *L. stagnalis*. Hemocyty *B. glabrata* produkují superoxid při setkání s miracidii *S. mansoni* (Shozawa a kol. 1989). Hemocyty *L. stagnalis* jsou schopné produkovat v reakci na patogena jak superoxid, tak H_2O_2 . Produkci H_2O_2 lze stimulovat laminarinem (Lacchini a kol. 2006), zymosanem nebo larvou nekompatibilní motolice (Zelck a kol. 2005). Zymosan však stimuluje i produkci superoxidu, kdy bazální nestimulovaná produkce dosahuje jen 15 % stimulované hodnoty (Adema a kol. 1991b). Produkce superoxidu byla pozorována také u hemocytů plže *Helix aspersa* a *Planorbarius corneus* (Dikkeboom a kol. 1988). Inkubace larev *Trichobilharzia ocellata* (synonymizace s druhem *Trichobilharzia szidati* (Rudolfová a kol. 2005)) a *S. mansoni* s hemocyty *L. stagnalis* způsobí nárůst produkce kyslíkových radikálů, přičemž nezáleželo na tom, zda byly sporocysty živé nebo fixované. Také nebyl nalezen rozdíl v odpovědi mezi oběma dvěma druhy, přestože jeden je kompatibilní a druhý ne (Adema a kol. 1994b).

Produkci ROS mění i jednobuněčné organismy, prvoci a bakterie. Ke zvýšení produkce ROS dochází např. při nákaze ústřice *C. virginica* alveolárním prvokem *Perkinsus marinus* (Anderson a kol. 1992). Hemocyty *C. virginica* stimulované teplem zabitými bakteriemi *Listonella anguillarum* produkovaly ROS, na živé bakterie však nereagovaly vůbec. Bakterie jsou schopné jakési suprese imunitní odpovědi, např. vychytáváním a enzymatickým zneškodňováním vytvořených radikálů (Bramble a Anderson 1997).

1.3.3 Produkce NO u měkkýšů

Produkce NO hemocyty byla prokázána u mnoha druhů mlžů i plžů. Mlži coby potravina jsou pro nás ekonomicky významnější, proto také existuje o mlžích daleko více prací.

Jeden a ten samý stimulant produkce NO je, stejně jako stimulanty produkce ROS, u různých druhů mlžů a plžů různě efektivní. Silný stimulant u jednoho druhu nemusí fungovat u druhu jiného. Například LPS je efektivní NO-stimulant u druhu *V. ater* (Conte a Ottaviani 1995), zatímco u druhu *M. galloprovincialis* je jeho efekt minimální (Novas a kol. 2004), a u *L. stagnalis* pak vůbec žádný (Wright a kol. 2006). Stejně tak i různé stimulanty jsou schopné u jednoho druhu stimulovat různě. Hemocyty plže *L. stagnalis* jsou vysoce stimulovatelné PMA, zatímco laminarin a zymosan stimulují jen slabě a už zmíněný LPS nemá žádný vliv (Wright a kol. 2006). Hemocyty mlže *R. decussatus* sice nejsou schopné produkovat na obranu proti patogenu kyslíkové radikály (López a kol. 1994), avšak produkovat NO v reakci na přítomnost zymosanu, LPS nebo živých patogenních bakterií *Vibrio tapetis* schopné jsou (Tafalla a kol. 2003). Protože výsledkem stimulace je často superoxid i NO zároveň (Arumugam a kol. 2000), dochází tak pravděpodobně ke vzniku peroxyinitritu. Bylo tak prokázáno, že zymosan opravdu stimuluje produkci peroxyinitritu u hemocytů *M. galloprovincialis* (Torreilles a Guerin 1999).

Také různé druhy bakterií jsou schopné stimulovat různě. Patogenní bakterie *V. tapetis* stimuluje produkci NO dvakrát efektivněji než nepatogenní druh *Vibrio splendidus* (Jeffroy a Paillard 2011). Také prvoci mají vliv na produkci NO. Příkladem může být infekce mlže *C. virginica* infikovaného prvokem *P. marinus*. Inhibicí NO-syntázy se zvýšila početnost parazita, protože NO snižuje množení prvočích buněk (Villamil a kol. 2007). Co se týče stimulace motolicemi, pak ESP *S. mansoni* stimulují produkci NO u těch plžů *B. glabrata*, kteří jsou vůči infekci *S. mansoni* rezistentní (Zahoor a kol. 2009).

Ke zvýšení produkce NO buňkami dochází v různě dlouhých časových intervalech po stimulaci. K maximální stimulaci hemocytů mlže *M. galloprovincialis* pomocí IL-2 dochází až po 24 h (Novas a kol. 2004), zatímco k maximu stimulace *L. stagnalis* pomocí PMA dochází už po 60 min (Wright a kol. 2006).

1.3.4 Vliv infekce motolicemi na produkci ROS a NO

Pro úspěšné zničení patogena je nutné produkovat správné radikály ve správnou dobu. Zdá se, že klíčovou molekulou pro zabití sporocyst v mezihostitelském plži je H_2O_2 , zatímco HClO, superoxid ani hydroxylový radikál nejsou pro zabíjení sporocyst tak důležité (Hahn a kol. 2001a). Protože však inhibice tvorby H_2O_2 nezaručí přežití larev v nekompatibilním hostiteli, musí existovat ještě nějaký další mechanismus. Tím je pravděpodobně produkce

oxidu dusnatého. Obě tyto molekuly, NO i H₂O₂, mají poločas rozpadu několik sekund a dokážou obě, na rozdíl od OH, ONOO a O₂⁻, dobře pronikat membránou. Jsou tedy schopné způsobovat poškození uvnitř těla larev, a to např. deaktivací enzymů důležitých v odstranění toxických molekul. Tegument sporocyst je ochrání před náhlými prudkými výkyvy okolního prostředí, vnitřní změny v delším časovém měřítku jsou však už nevratné (Hahn a kol. 2001b).

Existují však parazité, kteří se dokázali díky dlouhé koevoluci adaptovat na nepříznivé prostředí v hostiteli nebo se naučili, jak zmírnit imunitní odpověď hostitele tak, aby byli schopni v něm dlouhodobě přežít a množit se. Infekcí tzv. kompatibilním červem je tak ovlivněna většina obranných efektorových funkcí, včetně produkce radikálů. Taková intervence byla pozorována např. u mořského plže *Littorina littorea*. Hemocyty tohoto plže nakaženého echinostomní motolicí *Hismathla elongata* produkují 2× méně superoxidu než zdraví plži (Gorbushin a Iakovleva 2008). Na druhou stranu produkce superoxidu u hemocytů plže *L. stagnalis* nakaženého motolicí *T. szidati* byla stejná jako u zdravých jedinců (Dikkeboom a kol. 1988).

Ač je *B. glabrata* specifický mezihostitel pro motolici *S. mansoni*, existuje kmen, který je vůči nákaze *S. mansoni* rezistentní. Takový kmen je schopný eliminovat 80 % larev, zatímco vnímavý kmen jen 10 % (Hahn a kol. 2001a). Souvisí to se schopností produkovat právě pro larvy toxický H₂O₂. Hemocyty rezistentního kmene produkují po stimulaci PMA více H₂O₂ (Bender a kol. 2005) i superoxidu (Connors a Yoshino 1990) než hemocyty vnímavých plžů. Existují ale i práce, podle kterých je produkce superoxidu u rezistentních plžů stejná jako u vnímavých (Dikkeboom a kol. 1988). Sníženou produkci ROS mají na svědomí zřejmě ESP parazita. Za přítomnosti ESP byla snížena jak produkce superoxidu stimulovaná zymosanem (Connors a Yoshino 1990), tak i produkce H₂O₂ stimulovaná PMA. Bazální nestimulovaná produkce radikálů však nebyla přítomností ESP ovlivněna (Humphries a Yoshino 2008).

Nejen ESP motolic ovlivňují produkci radikálů. Také extracelulární produkty prvoka *Pseudoperkinsus tapetis* inhibují zymosanem stimulovanou produkci ROS. Bakterie produkují acidickou fosfatázu, pomocí které tvorbu ROS inhibují (Ordás a kol. 2000).

1.3.5 Fagocytóza

Fagocytóza je důležitá nejen coby první linie obrany vůči patogenům, ale i jako důležitý mechanismus pro udržování homeostáze (např. odstraňování starých a již nefunkčních vlastních buněk). Fagocytóza vyžaduje pro svůj správný průběh změnu tvaru hemocytů. Takto aktivované buňky mají sníženou cirkularitu, což je parametr popisující jejich tvar. Vysoká cirkularita znamená zakulacený tvar, zatímco nízká cirkularita odpovídá vysoce nepravidelnému tvaru (Mosca a kol. 2013).

Různé populace hemocytů jsou schopné fagocytovat různé částice různě ochotně. Malé hemocyty mají afinitu k jiným částicím než velké hemocyty. Závisí přitom spíš na typu částice než na její velikosti (Matricon-Gondran a Letocart 1999). Nedožralé (menší, zakulacenější) hemocyty juvenilních plžů mají nižší schopnost fagocytovat než hemocyty dospělých jedinců (Dikkeboom a kol. 1985). Podle jiné teorie však různá morfologie hemocytů není dána různým stupněm vyzrállosti buněk, ale jde o funkčně odlišné populace hemocytů (Carballal a kol. 1997a). Hemocyty obsahující četná granula (granulocyty) mají vyšší schopnost fagocytovat než hemocyty, která granula neobsahují (hyalinocyty) (Carballal a kol. 1997b). Také hemocyty různých druhů plžů mají různou schopnost fagocytovat. Fagocytóza hemocytů plžů *P. corneus*, *H. aspersa* i *B. glabrata* je nižší než fagocytóza hemocytů *L. stagnalis* (Dikkeboom a kol. 1988).

Během fagocytózy je zvýšená tvorba NO, např. během pohlcování kvasinek (Arumugam a kol. 2000) nebo latexových kuliček (Gourdon a kol. 2001). Oba procesy, produkce NO a fagocytóza, však probíhají v jinou dobu. Nejprve probíhá fagocytóza, až pak se spustí produkce NO (Franchini a kol. 1995). Oba mechanismy jsou signalizačně propojené, a tudíž zcela určitě neprobíhají nezávisle. Fagocytóza je stejně jako produkce NO (viz kap. 1.3.1) regulovaná pomocí MAPK kináz, a to konkrétně ERK 1/2 kinázou (Plows a kol. 2004). Vliv na fagocytózu má i aktivita fosfatidylinositol-3-kinázy, která jinak ovlivňuje takové důležité buněčné děje jako je apoptóza, diferenciace buněk a jejich dělení (Plows a kol. 2006a).

1.3.6 Vliv infekce motolicí na fagocytózu

Infekce kompatibilní motolicí může mít za následek snížení fagocytózy. Příkladem jsou hemocyty plže *B. glabrata*, které mají 1 den po infekci motolicí *E. paraensei* zvýšenou

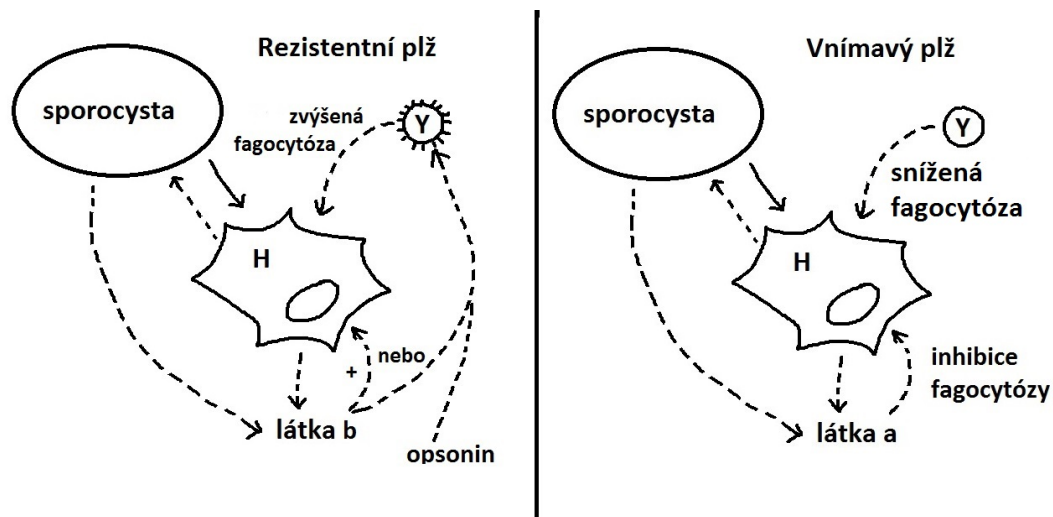
fagocytózu, která však poté klesá. I po 30 dnech po infekci zůstává schopnost fagocytovat oproti hemocytům ze zdravých plžů zhoršená, a to i přesto, že vlivem infekce dochází k pomnožení hemocytů (Noda a Loker 1989) (viz kapitola 1.3.9). Hemocyty *L. stagnalis* nakažené ptačí schistosomou *T. szidati* mají také nižší fagocytózu než hemocyty zdravých plžů (Dikkeboom a kol. 1988). Také nejdříve dochází k přechodnému zvýšení aktivity, a to už asi 1,5 h po nákaze *T. szidati*. Ta však 24 h po infekci opět klesá pod úroveň aktivity hemocytů z nenakažených plžů. Za inhibičními/stimulačními účinky parazita stojí pravděpodobně faktory v plazmě, protože preinkubace hemocytů s plazmou plžů odebranou 1,5 h po nákaze má stimulační efekt, zatímco s plazmou plžů odebranou po 24 h má už efekt inhibiční. (Núněz a kol. 1994).

Na druhou stranu bylo u stejné kombinace *L. stagnalis*–*T. szidati* pozorováno i zvýšení fagocytózy po nákaze. Během prvních šesti hodin po nákaze dochází ke zvýšení aktivity, která je pak přechodně snížena až do 3 dnů po infekci, po 8–10 týdnech však dochází opět k nárůstu aktivity. Ihned po nákaze je zvýšená aktivita namířena zřejmě proti odhazovaným ciliárním destičkám, ne tedy přímo proti motolici (Amen a kol. 1992).

Rozdíly ve schopnosti fagocytovat v rámci jednoho druhu souvisí s rezistencí/vnímatostí kmenů k určitému patogenu. Schopnost fagocytovat je ovlivněna jak přítomností celých parazitů (larev), tak i jejich ESP. Hemocyty kmene plžů *B. glabrata* vnímavého k nákaze *S. mansoni* mají vyšší schopnost fagocytovat než hemocyty kmene rezistentního. Pokud jsou však hemocyty vystaveny ESP *S. mansoni*, je fagocytóza hemocytů plžů z kmene rezistentního už vyšší než u hemocytů kmene vnímavého (Connors a Yoshino 1990). Logičtější se zdají ale závěry práce, ve které měli plži *B. glabrata* rezistentního kmene naopak vyšší fagocytózu než plži z vnímavého kmene (Uchikawa a Loker 1992).

Fagocytóza hemocytů rezistentního kmene je stimulována přítomností sporocyst *S. mansoni*, zatímco u hemocytů vnímavého kmene je jejich přítomností inhibovaná. Motolice produkují ESP, které snižují fagocytózu jen u kompatibilních plžů nebo plžů jim fylogeneticky blízce příbuzným (Iakovleva a kol. 2006). Vliv mají jak ESP sporocyst (Connors a Yoshino 1990), tak i redií (Iakovleva a kol. 2006).

U plžů vnímavého kmene způsobí interakce hemocytů s larvou produkci látky (larvou a/nebo hemocytem), která inhibuje fagocytózu hemocytů. Tato látka působí přímo na hemocyty. U rezistentních plžů hemocyty nebo sporocysta produkují látku, která naopak zvýší fagocytózu hemocytů, a to interakcí buď přímo s hemocyty nebo zvýšením titrů



Obr. 1: Model možných způsobů, jak sporocysta *S. mansoni* může ovlivňovat fagocytózu hemocytů vnímavých a rezistentních plžů *B. glabrata*. U plžů vnímavých způsobí interakce hemocytů (H) s larvou produkci látky (larvou a/nebo hemocytem), která inhibuje fagocytózu hemocytů. Tato látka působí přímo na hemocyty. U rezistentních plžů hemocyty nebo sporocysta produkují látku, která naopak zvýší fagocytózu hemocytů, a to interakcí buď přímo s hemocyty nebo zvýšením titrů opsoninů. Plné čáry – původní stimul, čerchované čáry – možné odpovědi. Dle Fryer a Bayne (1990), upraveno.

opsoninů (Fryer a Bayne 1990). Možný způsob interakce je znázorněn na obr. 1.

1.3.7 Enkapsulace

Malé objekty velikosti buňky jsou fagocytovány, objekty velikosti larev motolic jsou pak hemocyty opouzdřeny, tzv. enkapsulovány. Příkladem může být interakce hemocytů plže *B. glabrata* z rezistentního kmene se sporocystou *S. mansoni*. Hemocyty se akumulují kolem sporocysty, zplošťují se, panožky se postupem času zužují a přiklánějí k larvě, až jsou paralelně s jejím povrchem (Harris 1970). Hemocyty takto vytvoří okolo objektu až 15 vrstev o celkové tloušťce 10–40 μm . Vnitřní vrstva hemocytů je v bezprostředním kontaktu s povrchem objektu (Loker a kol. 1982).

Enkapsulace souvisí se dvěma schopnostmi buněk, adhezí (pevně se chytit povrchu) a schopností přilnout k povrchu v co největší ploše (tzv. „spreading“). Za těmito dvěma vlastnostmi stojí integriny, což jsou membránové receptory, které umožňují právě přilnutí buněk k povrchu, jejich migraci, tvorbu pseudopodií a buněčnou interakci (Berrier a Yamada 2007). Integrinům podobné proteiny byly objeveny i u plžů, konkrétně u plovatky *L. stagnalis* (Plows a kol. 2006b). Vazebná místa pro integriny obsahují typicky aminoky-

selinovou sekvenci Arg-Gly-Asp. Zablokováním těchto vazebných míst vhodným peptidem je možné inhibovat spreading i adhezi buněk mezi sebou. Zablokováním vazebných míst jsou inhibovány hemocyty jak vnímavého, tak i rezistentního kmene *B. glabrata*. Množství peptidu potřebného pro efektivní inhibici spreadingu (zakulacení hemocytů) je však daleko nižší u vnímavých hemocytů než u rezistentních. Hemocyty rezistentních plžů tedy musí obsahovat větší množství vazebných míst nebo je u nich afinita vazby ligand-receptor mnohem větší (Davids a Yoshino 1998).

Aktivace hemocytů má za následek změnu jejich morfologie. Dochází k expanzi filopodií (Lacchini a kol. 2006) a shlukování integrinů, které tak tvoří tzv. fokální adhezní místa. Tato aktivace je závislá na aktivitě PKC (Walker a kol. 2010). Inhibicí PKC dochází ke změně morfologie buněk, hemocyty vytváří méně filopodií a jsou zakulacenější (Lacchini a kol. 2006).

1.3.8 Vliv infekce na enkapsulaci a spreading

To, jestli bude larva v plži enkapsulovaná nebo se bude dál vyvíjet, závisí na kompatibilitě/nekompatibilitě příslušné motolice a měkkýše. Stejně jako u fagocytózy má na hemocyty vliv jak samotná larva, tak i její ESP.

Sporocysty a redie *E. paraensei* nemají žádný efekt na morfologii hemocytů plže *H. aspersa*, který je evolučně velmi vzdálený od kompatibilního hostitele *B. glabrata* (Adema a kol. 1994a). Na druhou stranu larvy jsou schopné způsobit zakulacení hemocytů nejen u svého kompatibilního hostitele, ale i u lymnaeidních plžů (*L. stagnalis* a *Stagnicola elodes*), které nejsou pro *E. paraensei* vhodným hostitelem. Vzhledem k tomu, že larvy zakulacují jejich hemocyty, mají lymnaeidní plži zřejmě určité předpoklady stát se meziphostitelem (Sapp a Loker 2000a).

V případě kompatibilního plže jsou sporocysty i redie *E. paraensei* během chvilky obklopené hemocyty. Ty však larvu nekontaktují, ale naopak se časem zakulacují, odtahují se od larvy a stávají se neaktivními (Adema a kol. 1994a). Sporocysty *E. paraensei* produkují ESP, které inhibují aktivitu hemocytů kompatibilního plže. Zdraví plži mají mnohem méně zakulacených hemocytů než plži nakažení. Juvenilní plži jsou k vlivu ESP náchylnější, což je dáno asi tím, že mají méně hemocytů, a na jeden hemocyt tak připadá větší množství účinné látky (DeGaffé a Loker 1998).

Složení ESP se mění v průběhu transformace miracidí na sporocysty. Produkty se-

kretované do 24 h po začátku transformace inhibují fagocytózu hemocytů, ale nemají vliv na adherenci. Pozdější sekrece (24 – 48 h po transformaci) má už vliv jak na fagocytózu, tak na adherenci a spreading hemocytů. Tyto změny jsou sice nevratné, ale nesnižují životaschopnost hemocytů. Aktivní komponenta ESP je menší než 100 kDa a má takový účinek, že hemocytům vnímavého kmene *B. glabrata* znemožní enkapsulovat larvu *S. mansoni* (Loker a kol. 1992). Naopak plži rezistentní k nákaze jsou méně vnímaví právě k vlivu ESP této motolice. Jejich efektem sice také dochází k zakulacení určitého počtu hemocytů, těch je ale mnohem méně než u plže vnímavého. Opět to může být dáno počtem hemocytů, protože rezistentní kmen má více hemocytů než kmen vnímavý, a na jeden hemocyt tak připadá méně účinné látky (DeGaffé a Loker 1998). Větší plži jsou rezistentnější vůči nákaze než menší plži. Při nákaze obsahují větší plži větší množství enkapsulovaných (zabitých) larev (Loker a kol. 1987).

1.3.9 Změna počtu hemocytů vlivem nákazy

Počet hemocytů u zdravých plžů

Počet cirkulujících hemocytů zdravého plže není konstantní, ale mění se během času. Za velkým rozptylem hodnot stojí jednak vnitrodruhová variabilita, ale i dlouhodobější cykly vlivem sezóny. U plže *L. littorea* kolísá počet hemocytů i v průběhu poměrně krátkého vegetačního období (od června do srpna). Množství hemocytů se u těchto jedinců pohybuje od 700 do 4000/ml. K prvnímu maximu dochází na začátku června, kdy se obnovuje populace buněk. Počet klesá během kladení vajíček na začátku července, pak opět roste a znovu klesá ve chvíli, kdy dochází k lyzi tkáně gonád. Další maximum přichází po „návratu“ hemocytů ze tkání zpět do cirkulace. Během léta narůstá podíl zralých granulárních buněk (Gorbushin a Iakovleva 2006).

Dalším vlivem na množství kolujících hemocytů je velikost (resp. stáří) plžů. Mladí jedinci *B. glabrata* mají asi $1,8\times$ vyšší hustotu hemocytů než jedinci dospělí, a to průměrně 170 buněk/ml u juvenilních jedinců a 95 buněk/ml u dospělců. Neznamená to ale, že by dospělí jedinci měli menší množství hemocytů, protože ti mají zase větší množství celkové hemolymfy (Loker a kol. 1987). Podle jiné práce by měl být různý počet hemocytů *B. glabrata* přisuzován spíše různému objemu hemolymfy, protože hustota buněk je u juvenilních i dospělých plžů stejná. Ze srdce juvenilních plžů *B. glabrata* se dá získat průměrně

15 µl hemolymfy, ze srdce dospělých jedinců pak 75 µl hemolymfy (DeGaffé a Loker 1998). Mírný stres v podobě např. expozici nízké koncentraci toxických látek má za následek nárůst počtu hemocytů (Fournier a kol. 2002). Průměrné hodnoty počtu kolujících hemocytů se liší v závislosti na okolních podmínkách, roční době získávání hodnot a na velikosti použitých plžů.

Vliv parazita na počet hemocytů

Nákaza kompatibilním parazitem způsobí často imunosupresi, která by se logicky mohla projevit snížením množství kolujících hemocytů. Tak je tomu např. u nákazy plže *B. glabrata* motolicí *S. mansoni* (Mounkassa a Jourdane 1990). V jiných případech však, ač je hostitel imunosuprimován, dochází naopak k nárůstu počtu kolujících hemocytů. Příkladem může být *L. littorea* nakažená motolicí *H. elongata* (Gorbushin a Iakovleva 2008) nebo opět plž *B. glabrata*, tentokrát však nakažený motolicí *Echinostoma liei* (Mounkassa a Jourdane 1990) nebo *E. paraensei*, kdy dochází až k 10-ti násobnému nárůstu počtu hemocytů (Loker a kol. 1987). Jindy nebyly žádné změny v počtu kolujících hemocytů zaznamenány (*L. stagnalis* nakažená motolicí *T. szidati* (Núněz a kol. 1994) nebo ústřice *O. edulis* nakažená prvokem *Bonamia ostreae* (Cochennec-Laureau a kol. 2003)). Nákaza však může kromě počtu hemocytů změnit i jejich kvalitativní vlastnosti, např. při nákaze *B. ostreae* cirkuluje v hemolymfě daleko větší množství nedozrálých agranulárních buněk (Cochennec-Laureau a kol. 2003).

Během prvních pár hodin po infekci *S. mansoni* dochází k poklesu počtu hemocytů, poté po 12 h u albinotických a 24 h u pigmentovaných plžů *B. glabrata* dochází opět k nárůstu. Hemocyty putují okamžitě po nákaze do tkáně, aby zničily patogena (Allegretti a kol. 2009). Maximální množství hemocytů bylo u dvojice *B. glabrata*–*S. mansoni* pozorováno 8. den po infekci (700–800/ml). Zvýšený počet buněk zůstává až do 15. dne po infekci (Loker a kol. 1987). Po 15 dnech dochází k úbytku hemocytů kvůli zvýšené potřebě opravit tkáň po migraci larev (Mounkassa a Jourdane 1990). Zcela opačný trend pozorovali Santos a kol. (2011), kdy počet hemocytů během prvních 24 h po infekci nejprve rostl a následně poklesl. Nový nárůst začal až 15. den po infekci a 30. den byl na počátečních hodnotách. Jiný případ je nákaza *B. glabrata* motolicí *E. liei*, kdy docházelo postupně k nárůstu počtu hemocytů až do 20. dne. Toto období odpovídá masivní kolonizaci celé tkáně plže mateřskými a dceřinými rediemi, které jsou pro plže patogenní. Následuje

opouštění cercárií hostitele, přičemž dochází k destrukci tkáně, kterou je potřeba opravit, a dochází tedy k mobilizaci hemocytů a snížení počtu cirkulujících hemocytů. Je to jiné než u *S. mansoni*, protože sporocysty echinostom jsou velmi imunogenní a redie patogenní (Mounkassa a Jourdane 1990).

Hemocyty jsou u některých měkkýšů produkovány orgánem (amebocyty produkující orgán – APO), který se nachází mezi perikardem a epitelem plášťové dutiny. Ne u všech měkkýšů byl však identifikován (např. u plovatky *L. stagnalis*) (Sminia 1974). Působením nákazy motolicí může dojít k hypertrofii nebo hyperplazii APO. Infekce *B. glabrata* motolicí *S. mansoni* nezpůsobí zvětšení APO na rozdíl od infekce motolicí *E. paraensei* (Noda 1992). Po nákaze motolicí *H. elongata* byla také zaznamenána dvojnásobná koncentrace cyklinu D, který je znamením velmi aktivní mitózy (Gorbushin a Iakovleva 2008). Zároveň bylo pozorováno, že extrakty miracidíí i sporocyst *S. mansoni* stimulují dělení v APO (Lie a kol. 1976). Motolice jsou tedy schopné produkovat látku, která přímo nebo nepřímo způsobí zvýšenou produkci hemocytů v APO. Nově vzniklé kolující hemocyty jsou často nezralé, nediferenciované, a tedy i neschopné parazitovi ublížit (Gorbushin a Iakovleva 2008). Látka zodpovědná za indukci tvorby nových hemocytů je obsažena v miracidíích, ESP sporocyst i redií a má molekulovou hmotnost větší než je 100 kDa (Noda 1992). Mezi infekcí a odpovědí (dělením hemocytů) je 18-ti hodinová prodleva. Za předpokladu, že je účinná látka sekretována ihned, stojí zřejmě za prodlevou buňky APO, které jsou pravděpodobně v interfázi, a proto potřebují čas na dokončení buněčného cyklu. Druhou možností je, že produkt parazita nestimuluje tvorbu hemocytů přímo, ale přes nějaký další produkt např. z hemocytů. K nejvyšší mitotické aktivitě dochází 48 h po infekci (Sullivan a kol. 2004).

APO je také nositelem rezistence vůči parazitovi. Transplantace APO z plže *Biomphalaria tenagophila* rezistentního vůči nákaze *S. mansoni* na plže vnímavého vede k přenosu rezistence. Nedochozí přitom ke zvýšení počtu kolujících hemocytů, a rezistence je tedy dána kvalitativními změnami hemocytů případně jejich produktů (Barbosa a kol. 2006).

Popsána již byla řada případů, kdy vlivem nákazy motolicí došlo k inhibici aktivit hemocytů. Zdá se, že inhibici způsobují ESP motolic, které zřejmě ovlivňují signální dráhy hemocytů. Přesné mechanismy a míra intervence do vnitřního obranného systému plže však nejsou známy. Imunomodulační efekt motolice také nebyl dosud pozorován u řady významných dvojic motolice–plž, jako je např. dvojice *T. regenti*–*R. lagotis*.

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo charakterizovat aktivity hemocytů plovatkovitých plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis*, jako jsou produkce ROS a NO, schopnost fagocytovat a enkapsulovat. Protože plž *R. lagotis* slouží jako mezihostitel pro motolici *T. regenti* a plž *L. stagnalis* pro motolici *T. szidati*, pokusili jsme se zároveň zhodnotit vliv trichobilharzií na vnitřní obranný systém těchto plžů. V kompatibilní variantě bylo cílem zmapovat vliv parazita na imunitní funkce, v nekompatibilní pak, jakým způsobem je parazit v hostiteli zničen.

Byly vytyčeny tyto cíle:

- porovnání schopnosti hemocytů *R. lagotis* a *L. stagnalis* produkovat NO a H₂O₂ v reakci na přítomnost různých stimulantů, a porovnání bazální produkce NO hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*,
- porovnání fagocytózy u hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*,
- charakterizace změny počtu hemocytů u zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*,
- porovnání schopnosti adherovat a tvořit panožky u hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*,
- pozorování *in vitro* enkapsulace larev nekompatibilní motolice *T. regenti* hemocyty *L. stagnalis*.

3 Materiál a metodika

3.1 Modelové organismy

Jako modelové organismy byli studováni plži *L. stagnalis* a *R. lagotis* chovaní v laboratorních chovech, a to jak zdraví, tak nakažení kompatibilní motolicí (*R. lagotis* + *T. regenti*, *L. stagnalis* + *T. szidati*). Motolice rodu *Trichobilharzia* jsou udržovány v laboratorním cyklu. Jejich mezihostitelem jsou právě plovatkovití plži a definitivním hostitelem kachna domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) (Horák a kol. 2002).

3.2 Příprava homogenátu cercárií *T. regenti* a *T. szidati*

Chemikálie

- Sterile snail saline, SSS (Adema a kol. 1991b)
 - 5mM HEPES
 - 3,7mM NaOH
 - 36mM NaCl
 - 2mM KCl
 - 2mM MgCl₂·2H₂O
 - 4mM CaCl₂·2H₂O
 - destilovaná voda
 - pH = 7,8
- inhibitor serinových proteáz TLCK (Sigma)
Zásobní 10mM roztok byl připraven v destilované vodě, ten byl dále ředěn v SSS na používanou 100μM koncentraci.
- inhibitor cysteinových proteáz E64 (Sigma) Zásobní 1mM roztok byl připraven v destilované vodě, ten byl dále ředěn v SSS na používanou 10μM koncentraci.
- Quant-iT Protein Assay Kit (Molecular Probes)

Infikovaní plži vylučují cercárie v patentní periodě (5–6 týdnů po infekci). Cercárie jsou pozitivně fototaktické, a v reakci na světlo tak plže opouštějí. Proto se maximální množství cercárií získává stimulací světlem.

Plži, na které se svítilo lampičkou, byli necháni ve sklenicích v odstáté vodě po dobu asi 2 h. Vyloučené cercárie byly zakoncentrovány pomocí světla v Erlenmayerově baňce. Baňka byla až na hrdlo, kam z boku svítilo intenzivní světlo, obalená alobalem. V místě s největší intenzitou světla se hromadily cercárie. Cercárie byly odebírány Pasteurovou pipetou do falkony umístěné na ledu. Díky nízké teplotě zpomalí cercárie svůj pohyb na minimum a klesnou ke dnu. Aby byl získán co nejčistší materiál, byly cercárie promývány v SSS. Cercárie byly 3× stočeny při 1500 g, vždy 10 min při teplotě 4 °C, supernatant byl vždy odebrán a byl doplněn studený pufr. Po posledním stáčení už nebyl pufr doplněn. K zakoncentrovaným cercáriím byly přidány inhibitory serinových a cysteinových proteáz (100 μM TLCK a 10 μM E64). Poté byly cercárie homogenizovány sonikací (Vibra Cell (Bioblock Scientific)(4×10 s, 10 W)) 3× po dobu 30 s při amplitudě 60 jednotek. Vzniklý homogenát byl stočen 10 min při 16000 g při 4 °C. Supernatant byl odebrán a opakovaně stočen; nový supernatant byl uchováván při teplotě –80 °C. Homogenát byl používán ve výsledné koncentraci 20 μg/ml (dále ředěn SSS). Koncentrace proteinů v homogenátu byla změřena s využitím kitu Quant-iT Protein Assay Kit.

3.3 Odběr hemolymfy a tvorba monovrstvy hemocytů

Plži čeledi Lymnaeidae mají tzv. hemální pór, kterým při podráždění vypouští určité množství hemolymfy závislé na velikosti plže. Díky přítomnosti tohoto póru lze hemolymfu odebírat zcela neinvazivně. Plž byl před odběrem omyt destilovanou vodou a osušen filtračním papírem. Drážděním v oblasti nohy (např. špičkou) se plž zatáhne do ulity a současně vypustí do ústí ulity hemolymfu, která obsahuje hemocyty. Hemolymfa byla odebírána od zdravých i nakažených plžů *R. lagotis* o velikosti 1–1,6 cm (výška ulity). Výška ulity plže *L. stagnalis* nebyla měřena, jednalo se však vždy o dospělé jedince. Z jednoho jedince byla hemolymfa odebírána max. 1× týdně.

Pro měření byla vytvořena monovrstva buněk na dně jamky (96-ti jamková destička Nunclon-treated, ploché dno). Na každou jamku bylo odebráno 200 μl hemolymfy.

Aby hemocyty adherovaly na povrch co nejrovnoměrněji, byla hemolymfa plže *R. lagotis*

odebírána do 50 μ l SSS, a protože sběr hemolymfy trvá dlouho (jeden plž vypudí kolem 30 μ l), byla hemolymfa odebírána postupně po 10 μ l do každé jamky (výsledný vzorek byl tedy směsí hemolymfy z 20 plžů). Plovatky *L. stagnalis* mají díky větší velikosti těla i větší množství hemolymfy. Hemolymfa byla v tomto případě odebírána z více plžů do falkony umístěné na ledu, následně byla ředěna SSS v poměru 2:1 a pipetována do destičky po 250 μ l na jamku.

Buňky adherovaly na dno po dobu 30 min, následně byla jamka 3 \times promyta 250 μ l SSS. Aby došlo k ustálení podmínek, byly poté hemocyty inkubovány 30 min v 200 μ l SSS.

3.4 Počet hemocytů v monovrstvě

Použité chemikálie

- SSS bez iontů vápníku a hořčíku, přidán 2% chelátor iontů EDTA (SSS⁻ s 2% EDTA, kyselina ethylendiaminotetraoctová), pH 7,8, molarita dorovnána NaCl (výsledná koncentrace NaCl je 45mM)

Zároveň s odběrem hemolymfy do destičky probíhal stejným způsobem i odběr vzorku pro určení počtu hemocytů v monovrstvě (za předpokladu, že se všechny buňky přichytí). V tomto případě byla ale hemolymfa odebírána na parafilm, a to do 200 μ l SSS⁻ s 2% EDTA. Tento pufr byl zvolen pro minimalizaci shlukování hemocytů nebo jejich adherence na povrch nádoby. Počet hemocytů byl určován pod mikroskopem (Olympus BX51) pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Do komůrky bylo napipetováno 20 μ l vzorku, z každého vzorku byly spočítány tři komůrky a v každé komůrce 10 čtverců. Výsledná hodnota je průměr všech hodnot přepočítaný na 1 ml.

3.5 Počet hemocytů u zdravých a nakažených plžů *R. lagotis*

Hemocyty byly nejprve počítány ve smíšeném vzorku hemolymfy ze tří plžů. Hemolymfa byla odebírána na parafilm do pufru SSS⁻ s 2% EDTA v poměru 1:3. Pufr a parafilm minimalizovaly shlukování a adherenci hemocytů. Kvůli velké variabilitě v datech byly následně počítány hemocyty od jednotlivých plžů. Hemolymfa byla ředěna puforem v poměru 1:1, 1:2 nebo 1:3 v závislosti na tom, kolik hemolymfy daný plž vypustil. Hod-

noceno bylo 23 zdravých plžů o velikosti $1,27 \pm 0,26$ cm a 23 nakažených plžů o velikosti $1,29 \pm 0,22$ cm. Odběry probíhaly v období duben–říjen. Počet hemocytů byl určován pomocí Bürkerovy komůrky tak, jak je popsáno v kap. 3.4.

3.6 Produkce radikálů

Produkce radikálů byla detekována sondou, která po reakci s daným radikálem vytvoří fluorescenční produkt. Intenzita fluorescence byla měřena na fluorometru (Infinite M200 Microplate Reader (Tecan Group, Switzerland)). Měření byla provedena v 96-ti jamkové černé destičce (Nunc). Na dně jamky byla vytvořena monovrstva hemocytů, viz kap. 3.3. Těsně před měřením byly k buňkám monovrstvy přidány různé stimulanty produkce radikálů, a pozorován byl efekt dané látky na jejich produkci. Produkce radikálů byla sledována u obou modelových druhů, u plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis*.

Použité chemikálie a organismy

- DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2,7-difluorescein diacetate (10×50 µg, Molecular Probes)
Zásobní látka (50 µg) byla rozpuštěna ve 20 µl DMSO na výslednou 5mM koncentraci. Roztok byl dále ředěn 1000× v SSS tak, aby byl k buňkám přidán jako 5µM.
- Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes)
Reakční směs byla připravena smícháním 1 µl křenové peroxidázy (0,1 U/ml), 100 µl SSS a 0,5 µl Amplex Red (50µM v DMSO). Zásobní látka Amplex Red byla rozpuštěna v 60 µl DMSO. Křenová peroxidáza byla rozpuštěna v 1 ml 5× zředěného reakčního pufru dle návodu výrobce.
- Zymosan A ze *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma)
Zymosan byl připraven jako 1% suspenze v 0,15 M NaCl. Směs byla 1 h vařena ve vodní lázni, centrifugována 30 min při 4000 r.p.m. a resuspendována v SSS.
- Laminarin *Laminaria digitata* (Sigma) ředěný SSS (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml)
- PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma)
Zásobní látka (1 mg) byla rozpuštěna v DMSO na výslednou 10mM koncentraci.

Roztok byl dále ředěn na požadovanou (2 μ M nebo 10 μ M) koncentraci v SSS tak, aby koncentrace DMSO u buněk nepřesáhla 0,1 % (vyšší koncentrace je pro hemocyty považována za toxickou).

- bakterie *Escherichia coli*

Bakterie byly resuspendovány v SSS a usmrceny vysokou teplotou (70 °C, 3 h). Ze sedimentu byl vytvořen koncentrát, který byl použit buď v blíže neurčované koncentraci nebo v koncentraci 10⁻² a 10⁻³.

- kvasinky *S. cerevisiae*

Kvasinky byly resuspendovány v SSS a usmrceny vysokou teplotou (65 °C, 30 min). Ze sedimentu byl vytvořen koncentrát, který byl použit buď v blíže neurčované koncentraci nebo v koncentraci 10⁻² a 10⁻³.

- LPS (L4516-1MG, Sigma)

Zásobní roztok byl připraven v mediu RPMI 1640 HEPES modification s NaHCO₃ (Sigma) v koncentraci 500 μ g/ml. Roztok byl dále ředěn v SSS na výslednou koncentraci 10 mg/ml.

3.6.1 Produkce peroxidu vodíku

Hemocyty zdravých plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis* byly stimulovány různými látkami a produkce H₂O₂ byla sledována během 30 min. Monovrstva hemocytů na dně jamky byla připravena tak, jak je popsáno v kap. 3.3. Buňky adheované na dně destičky byly ale ekvilibrovány ve 100 μ l SSS, a to po dobu 1 h při laboratorní teplotě a v temnu. Těsně před měřením bylo k buňkám přidáno 100 μ l reakční směsi Amplex Red, která případně obsahovala stimulant. Jako stimulant byl použit zymosan (25–100 μ g/ml), laminarin (1–10 mg/ml) a PMA (10 μ M). Intenzita fluorescence byla měřena po dobu 30 min každých 5 min při 530/590 nm. Oxidací sondy Amplex Red molekulou H₂O₂ vzniká fluorescenční produkt resorufin. Sonda neproniká do buněk, měřena proto byla extracelulární produkce H₂O₂.

3.6.2 Produkce oxidu dusnatého

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat efekt různých látek na produkci NO hemocyty zdravých plžů *L. stagnalis* a *R. lagotis*. Následně byla také porovnána bazální produkce NO u zdravých a nakažených plžů *R. lagotis*.

Monovrstva hemocytů plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis* byla připravena tak, jak je popsáno v kap. 3.3. Hemocyty byly počítány podle kap. 3.4. Adherované buňky byly bez ekvilibrace inkubovány 1 h s fluorescenční sondou DAF-FM diacetát (5 μ M). Po dobu inkubace byly buňky uchovávány v temnu. Sonda DAF-FM diacetát proniká cytoplazmatickou membránou, v buňce je sonda deesterifikována, čímž se pro ni membrána stává nepropustnou. Reakcí deesterifikované sondy DAF-FM s molekulou NO vzniká fluorescenční benzotriazol. Pomocí této sondy lze měřit pouze intracelulární produkci NO.

Hemocyty byly 3 \times promyty 250 μ l SSS, aby byla odstraněna sonda, která zůstala mimo buňky. Následně došlo během 30 min ekvibrace k ustálení podmínek experimentu. Těsně před měřením byl přidán stimulant. Jako stimulant byl použit zymosan (25–100 μ g/ml), laminarin (1–10 mg/ml), PMA (10 μ M), LPS (10 mg/ml), homogenát cercárií *T. regenti* a *T. szidati* (20 μ g/ml), teplem usmrcené kvasinky a bakterie. Intenzita fluorescence byla měřena při 495/515 nm po dobu 60 min každých 5 min.

Bazální (nestimulovaná) produkce NO hemocytů plže *R. lagotis* byla hodnocena jednak na objem hemolymfy (200 μ l), a pak i na počet hemocytů (100 000).

Měření produkce H₂O₂ hemocyty *R. lagotis*/*L. stagnalis* bylo 4 \times /6 \times opakováno.

Produkce NO hemocyty plovatek *L. stagnalis* chovaných v čistém prostředí

Vliv čistoty prostředí na schopnost hemocytů produkovat NO byl testován proto, že v jiné laboratoři byl zjištěn u stejného modelového organismu (*L. stagnalis*) rozdílný stimulační efekt řady látek (Wright a kol. 2006). Akvária našich plovatek byla čistěna nepravidelně, min. však 1 \times měsíčně. V tomto pokusu byly proto plovatky *L. stagnalis* drženy v akváriích čistěných častěji, jedenkrát týdně. Pokus byl proveden tak, jak bylo popsáno výše (kap. 3.6.2). Produkce NO stimulovaná 10 μ M PMA byla měřena po týdnu v „čistém prostředí“ a pokus byl vždy po týdnu (celkem tedy 3 \times) zopakován. Pro kontrolu byla zároveň měřena i bazální a stimulovaná produkce NO hemocytů plžů *L. stagnalis* držných v měsíčně čistěných akváriích.

Produkce NO hemocyty plžů *R. lagotis* chovaných v čistém prostředí

Protože efektivní stimulant produkce NO u hemocytů plžů *R. lagotis* chovaných v 1× měsíčně čištěných akváriích nebyl nalezen, byla odpověď hemocytů sledována i vzhledem k čistotě prostředí. Plži byli chováni v akváriích, která byla čištěna 1× týdně. Pokus byl proveden tak, jak bylo popsáno výše (kap. 3.6.2). Hemocyty byly stimulovány 10μM PMA. Pokus byl opakován po 14 dnech. Zároveň byla produkce NO měřena pro porovnání i u hemocytů plžů chovaných v akváriích, která nebyla po dobu pokusu vůbec čištěna.

3.7 Inhibice produkce NO u hemocytů *R. lagotis*

Použité chemikálie

- PKC inhibitor GF109203X hydrochlorid (Life Sciences)
Zásobní látka byla ředěna v DMSO na koncentraci 10 mg/ml. Roztok byl dále ředěn v SSS a přidáván k buňkám ve výsledné 10μM koncentraci.
- MEK 1/2 inhibitor U0126 (Biotech)
Zásobní látka byla ředěna v DMSO na 10mM koncentraci. Roztok byl dále ředěn v SSS a přidáván k buňkám ve výsledné 10μM koncentraci.

Inhibice bazální produkce NO

Cílem tohoto pokusu bylo sledovat vliv inhibitoru PKC GF109203X na bazální produkci NO u hemocytů zdravých plžů *R. lagotis*. K monovrstvě hemocytů (viz kap. 3.3) byl 10μM inhibitor PKC (GF109203X) přidán na dobu 30 min. Ihned poté začalo 1 h dlouhé měření produkce NO. Bazální produkce NO (bez inhibitoru) byla měřena pro kontrolu.

Pro ověření specifity inhibitoru byly hemocyty plže *L. stagnalis* inkubovány 30 min s 10μM inhibitorem PKC (GF109203X) a následně stimulovány aktivátorem PKC (10μM PMA). Pokud je inhibitor specifický, nedojde po současné inhibici a stimulaci PKC k nárůstu produkce NO, zatímco při samotné stimulaci ano.

Inhibice produkce NO stimulované LPS

Po dobu 1 h jsme sledovali vliv MEK 1/2 inhibitoru (U0126) na produkci NO hemocyty *R. lagotis* stimulované LPS. Hemocyty monovrstvy (viz kap. 3.3) byly inkubovány po dobu

30 min s 10 μ M U0126. Poté byl k buňkám přidán stimulant (LPS 10 mg/ml) a začalo 1 h dlouhé měření produkce NO. Jako kontrola byla zároveň měřena samotná stimulace buněk LPS bez inhibitoru.

3.8 Fagocytóza

Fagocytická aktivita hemocytů plže *R. lagotis* byla určována pomocí fluorescenčně značených částic a vyhodnocována byla fluorescenčním mikroskopem nebo fluorometrem. Vyzkoušeny byly různé typy FITC-značených částic, a to králičí erytrocyty, myší erytrocyty, kvasinky *S. cerevisiae* a bakterie *Escherichia coli*. Dále byly vyzkoušeny bakterie *E. coli* značené pH-senzitivní barvičkou pHrodo (viz dále). Fagocytóza eukaryotických buněk byla odečítána mikroskopicky, fagocytóza bakterií pomocí fluorometru.

3.8.1 Příprava FITC-značených částic

Připraveny byly fluorescenčně značené myší a králičí erytrocyty (Horák a Deme 1998) a fluorescenčně značené kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Pearce a kol. 2001).

Použité chemikálie

- Alsieverův roztok (citrátový pufr)
 - 20,5 g glukózy
 - 4,2 g NaCl
 - 0,55 g monohydrátu kyseliny citrónové
 - 8 g monohydrátu citrátu sodného
 - 1000 ml destilované vody

- trisový pufr
 - 150mM NaCl
 - 20mM Tris (Sigma)
 - destilovaná voda
 - pH = 7,8

- 0,1M glycin (Sigma) v trisovém pufru
- 1% glutaraldehyd (Sigma) v trisovém pufru
- SSS, složení viz kap. 3.2
- uhličitanový pufr
 - 0,2M Na₂CO₃
 - 0,2M NaHCO₃
 - destilovaná voda
 - pH = 9,4, titrace 0,2M roztoku Na₂CO₃ 0,2M roztokem NaHCO₃
- 0,01% (w/v) fluorescein-isothiokyanát (FITC, Sigma) v uhličitanovém pufru (pro značení erytrocytů)
- 0,1 mg/ml fluorescein-isothiokyanát (FITC, Sigma) v SSS (pro značení kvasinek)
- SSS⁻ s 0,1% EDTA (viz kap. 3.4)

Erytrocyty značené FITC

Myší (kmen Balb)/králíčí (outbrední kmen) krev byla pro zabránění srážení odebrána do několikanásobného objemu citrátového pufru. Následně byla centrifugována po dobu 5 min při 550 g (každá následující centrifugace probíhala při 550 g). Poté byly erytrocyty promývány 4×5 min v trisovém pufru, fixovány v 1% glutaraldehydu v trisovém pufru po dobu 1 h a promývány 2×5 min v SSS. Pro blokaci aldehydových skupin byly erytrocyty následně promývány 4×5 min v 0,1 M glycinu v trisovém pufru. Pak byly promývány 4×5 min v SSS a rozředěny v SSS na 1% suspenzi. Ta byla promývána 3×5 min v uhličitanovém pufru a pak byly erytrocyty inkubovány v 0,01% fluorescein-isothiokyanátu v uhličitanovém pufru po dobu 1 h. Poté byly erytrocyty promyty 4×5 min v SSS a uskladněny v SSS⁻ s 0,1% EDTA při teplotě 4 °C. Před dalším použitím byly erytrocyty vždy promývány 3×5 min v SSS.

Kvasinky značené FITC

Kvasinky *S. cerevisiae* byly tepelně usmrceny (30 min při 65 °C). Následně byly inkubovány s fluorescein-isothiokyanátem v SSS (0,1 mg/ml) po dobu 30 min a poté promyty 5×5 min v SSS.

3.8.2 Fagocytóza eukaryotických buněk

Použité chemikálie

- 4% formaldehyd v destilované vodě
- trypanová modř (Sigma)

Rozpustnost trypanové modři v destilované vodě je 10 mg/ml (2% roztok). Roztok byl připraven v koncentracích 2 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml a před použitím přefiltrován.

Schopnost hemocytů pohlcovat eukaryotické buňky byla hodnocena pomocí mikroskopie. Aby bylo možné rozeznat, která buňka je hemocytem pohlcená a která je jen adheovaná na jeho povrchu, bylo nutné nepohlcené buňky buď odmyt, nebo zhasnout jejich fluorescencí. Hemocyty, které fagocytují, ztrácí schopnost adherovat. Kompletní odmytí nepohlcených buněk způsobovalo odmytí i velké části fagocytujících hemocytů, což zkreslovalo výsledky. Proto byla zvolena cesta zhasínání nepohlcených buněk.

Na podložní sklíčko Superfrost bylo do 10 µl SSS odebráno 30 µl hemolymfy (po 10 µl ze 3 plžů). Hemocyty adherovaly během 30 min inkubace ve vlhké komůrce na povrch sklíčka. Následně byly 3× opláchnuty SSS a inkubovány ve tmě s fluorescenčně značenými buňkami po dobu 30 min. Nepohlcené fluorescenčně značené buňky byly opatrně odmyty (2× opláchnutí SSS), zbylé neodmyté buňky byly zhasnuty trypanovou modří (2% v SSS) a hemocyty fixovány pomocí 4% formaldehydu. Poměr hemocytů, které fagocytovaly a které nefagocytovaly, byl určován pomocí fluorescenční mikroskopie.

3.8.3 Fagocytóza bakterií

Použité chemikálie a organismy

- *Escherichia coli* (K-12 strain) BioParticles®, Fluorescein Conjugate (Molecular Probes)

Bakterie (zásobní bakterie 10 mg) byly uchovávány v SSS (20 mg/ml).

- pHrodo Red *E. coli* BioParticles Conjugate for Phagocytosis (Molecular Probes)
Bakterie byly resuspendovány ve 2 ml SSS.

- MEK 1/2 inhibitor U0126 (Biotech)

Zásobní látka byla rozpuštěna v DMSO na 10mM koncentraci. Roztok byl dále ředěn v SSS na výslednou 1 nebo 10 μ M koncentraci.

Schopnost fagocytovat bakterie byla určována pomocí fluorometru. Pro pokus byly použity komerčně dodávané bakterie *E. coli* značené FITC a *E. coli* značené pH-senzitivní barvičkou pHrodo, která se stává fluorescenční až v kyselém pH (tedy v lysosomu).

Měření probíhalo v průhledné 96-ti jamkové destičce (Nunc). Monovrstva hemocytů ze zdravých i nakažených plžů byla připravena tak, jak je popsáno v kap. 3.3. Stejně byl odebírána vzorek na určení počtu hemocytů v pokusu, viz kap. 3.4. Monovrstva buněk byla následně inkubována v temnu buď s 6x10⁵ buňkami *E. coli* značenými FITC po dobu 30 min nebo s 10⁵ buňkami *E. coli* značenými pHrodo po dobu 2 h. Nefagocytované bakterie značené FITC byly odmyty (2 \times opláchnutí SSS). Fluorescence zbylých neodmytých bakterií byla následně zhasnuta trypanovou modří. V případě bakterií značených pHrodo se po 2 h inkubace okamžitě měřilo. Měřen byl i signál samotných bakterií značených pHrodo bez přítomnosti hemocytů a naměřené hodnoty byly odečteny jako pozadí. Intenzita fluorescence byla měřena na fluorometru při 494/518 nm v případě použití FITC-značených částic a při 545/600 nm v případě použití částic značených pHrodo. Fagocytóza buněk byla hodnocena jednak na stejný objem hemolymfy (200 μ l), a poté i na stejný počet hemocytů (100 000). Měření probíhala při stejné citlivosti přístroje.

Inhibice fagocytózy

Vliv inhibice kinázy MEK 1/2 na hemocytární fagocytózu byl testován pomocí inhibitoru U0126. Monovrstva hemocytů (kap. 3.3) byla ekvilibrována 30 min v 200 μ l SSS. Inhibitor U0126 byl poté k buňkám přidán na 30 min v 1 a 10 μ M koncentraci. Následně byly k hemocytům přidány bakterie značené pHrodo a po 2 h byla měřena fluorescence. Zároveň byla coby kontrola měřena fagocytóza buněk bez přítomnosti inhibitoru. Hodnoty fluorescence samotných bakterií bez buněk byly opět odečteny od získaných hodnot s buňkami. Buňky

jsou při použití 10 μ M U0126 zároveň vystaveny 0,1% DMSO. Proto byl ověřen i vliv 0,1% DMSO na fagocytózu hemocytů.

3.9 Adherence hemocytů a tvorba panožek

Schopnost hemocytů adherovat k povrchu a tvořit panožky (spreading) byla hodnocena měřením plochy, obvodu a cirkularity buněk. Parametry byly porovnávány mezi hemocyty zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených motolicí *T. regenti*. Pro určení požadovaných parametrů buněk byla fluorescenčně obarvena membrána buněk. Zároveň byla značena i jádra buněk, aby bylo zaručeno vyhodnocení pouze jedné buňky.

Použité chemikálie

- DiI C-12 (1,1'-didodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Invitrogen)
Alikvoty zásobního roztoku byly rozředěny v 96% etanolu (1–2,5 mg/ml) a uchovány při teplotě -80°C . Před použitím byl roztok ředěn v SSS na koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Montovací medium Vectashield s DAPI (Vector Laboratories)
- 4% formaldehyd v destilované vodě
- SSS (viz kap. 3.2)

Hemolymfa byla odebrána od 10 zdravých a 10 nakažených plžů. Pro rovnoměrnou adherenci buněk byla hemolymfa zdravých plžů ředěna 1:1 v SSS na parafilmu, zatímco hemolymfa nakažených plžů 1:2 v SSS na parafilmu (nakažení plži mají téměř 2 \times více hemocytů než zdraví plži). Na Superfrost podložní sklíčko bylo pipetováno 40 μl ředěné hemolymfy od zdravých a od nakažených plžů. Hemocyty byly ponechány 30 min ve vlhké komůrce, aby adherovaly k povrchu sklíčka. Následně byly hemocyty opláchnuty 3 \times SSS a fixovány 10 min ve 4% formaldehydu. Poté byly hemocyty 4 \times opláchnuty SSS a přidána byla fluorescenční barvička DiI C-12 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tato barvička je lipofilní, proto se dobře váže na membránu. Buňky byly inkubovány 20 min v temnu, opláchnuty 4 \times SSS, inkubovány 10 min v SSS a poté znovu 3 \times promyty SSS, aby se odmyla přebytečná barva. Potom byl vzorek zamontován pomocí media Vectashield s DAPI. Preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus Cell-R. Buňky byly foceny v 60-ti násobném

zvětšení jako 16-ti bitové obrázky. Měření parametrů buněk bylo prováděno v programu ImageJ.

Kromě obvodu a obsahu byla měřena i cirkularita buněk. Tento parametr je závislý na obvodu a obsahu buňky (dáno vztahem 1) a charakterizuje schopnost buněk tvořit panožky.

$$cirkularita = 4\pi \frac{obsah}{obvod^2} \quad (1)$$

3.10 *In vitro* enkapsulace larev *T. regenti* hemocyty *L. stagnalis*

Použité chemikálie

- Transformační medium (Minimal Salt Medium) ([Schallig a kol. 1990](#))

Složení na 1 l destilované vody:

- 3,5 g NaCl
- 0,16 g KCl
- 0,09 g Na₂HPO₄·2H₂O
- 0,45 g MgSO₄·7H₂O
- 0,53 g CaCl₂·2H₂O
- 0,05 g NaHCO₃
- 1,5 g D-glukóza
- 1,5 g trehalóza
- pH = 7,8

Roztok CaCl₂·2H₂O byl připraven zvlášť, a poté přidán ke zbylému roztoku. Výsledné pH roztoku bylo nižší (pH = 7,6), protože při pH 7,8 se v mediu vysrážely vápenaté ionty.

- 1% agar v destilované vodě

Agarové plotny v Petriho miskách měly tloušťku asi 0,5 cm.

Transformace miracidí *T. regenti*

Miracidia se po 24 h inkubace v transformačním mediu při teplotě 37 °C přemění na mateřské sporocysty. V pokuse byly použity jen plně transformované sporocysty.

Inkubace hemocytů s miracidii/sporocystami

Hemocyty *L. stagnalis* byly inkubovány s larvami nekompatibilní motolice *T. regenti*, a to jak s miracidii, tak s mateřskými sporocystami. Inkubace probíhala v 300 µl hemolymfy na parafilmu nebo v Petriho misce na 1% agaru ve vlhké komůrce, a to za mírného kývání po dobu 18 h. Mírné kývání zajistilo pravděpodobnější kontakt larvy s hemocyty. Parafilm a agar minimalizovaly adheenci hemocytů na povrch. Interakce hemocytů s larvami motolice byla pozorována pod inverzním mikroskopem Olympus TH4-200 v různých časech během inkubace.

3.11 Toxicita plazmy plže *L. stagnalis*

Cílem tohoto pokusu bylo sledovat míru toxicity samotné plazmy plže *L. stagnalis* pro miracidia nekompatibilní motolice *T. regenti*. Miracidia byla inkubována ve 100%, 75% a 50% plazmě ředěné v SSS. Kontrolní skupina byla inkubována pouze v SSS. Životaschopnost miracidí byla průběžně (po 2, 5,5 a 10,5 h od počátku inkubace) pozorována inverzním mikroskopem Olympus TH4-200.

Plazma byla připravena z čerstvě odebrané hemolymfy. Hemocyty byly z hemolymfy odstraněny centrifugací, a to nejprve 5 min při 500 g, poté 5 min při 5000 g. Supernatant (plazma) byl přidán k larvám na počátku inkubace.

3.12 Experimentální nákazy plžů nekompatibilními motolicemi

Pro určení efektivity penetrace miracidí do nekompatibilních hostitelů byli experimentálně nakaženi 4 plži *L. stagnalis* miracidii motolice *T. regenti* a 9 plžů *R. lagotis* miracidii motolice *T. szidati*. Každý plž byl inkubován 2 h s 10 miracidii v odstáté vodě v šestijamkové destičce. Následně byla pod lupou spočítána volně plovoucí a mrtvá miracidia.

3.13 Hodnocení experimentální nákazy pomocí histologie

Použité chemikálie

- Bouinova fixáž (Sigma)
- JB-4 Embedding Kit (infiltrační a polymerační roztok) (Sigma)
infiltrační roztok: roztok A (50 ml) + benzoyl peroxid (0,625 g)

polymerační roztok: infiltrační roztok (50 ml) + roztok B (akcelerátor polymerace, 2 ml)

- etanol (70%, 96%, 100%)
- DPX Mounting Medium (Sigma)
- toluidinová modř (Sigma)

Barvicí roztok byl připraven smícháním 1% toluidinové modři a 1% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ v destilované vodě. Před použitím byl roztok přefiltrován.

Plži *R. lagotis* byli experimentálně nakaženi miracidii nekompatibilní motolice *T. szidati*. Každý plž byl nejprve inkubován po dobu 2 h s cca 40 miracidii, následně ještě 2 h v odstáté vodě bez miracidii. Tato infekční dávka byla zvolena kvůli pravděpodobnějšímu nálezů penetrované larvy na histologických řezech. Ulita a hepatopankreas byly odpreparovány a zbylá tkáň plže byla přenesena na 24 h do Bouinovy fixáže (5× objem vzorku). Následně byla fixáž vymyta 70% etanolem. Poté byl vzorek odvodněn pomocí vzestupné alkoholové řady (70%, 96%, 100%). Každý vzorek byl promýván 20 min v 70% a 96% etanolu, následně 3× 10 min v 100% etanolu. Následovala 24 h infiltrace. Infiltrační roztok byl po 30 a 60 min vyměněn. Pak byl vzorek zalit do polymeračního roztoku. Polymerace probíhala v želatinové kapsli 24 h v temnu a bez přístupu vzduchu. Zalitý vzorek byl nařezán na mikrotomu na 3 μm silné řezy. Řezy byly přeneseny do kapky destilované vody na podložní sklo a po zaschnutí byly barveny 1 min 1% toluidinovou modří. Nakonec byly řezy montovány do DPX Mounting Media a pozorovány světelným mikroskopem (Olympus BX51).

3.14 Statistika

Pro statistické vyhodnocení byl použit dvouvýběrový t-test, párový test, analýza rozptylu (ANOVA) a regresní a korelační testy. Analýza byla provedena ve statistickém programu R verze 2.12.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; www.R-project.org).

Dvouvýběrový test byl použit v případě, kdy byly porovnávány dva nezávislé soubory dat. To bylo v případě pokusů v kap. 4.1: porovnání velikosti ulity a počtu hemocytů mezi

zdravými plži *R. lagotis* a plži nakaženými *T. regenti*, kap. 4.2.3: porovnání bazální produkce NO hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*, kap. 4.2.4: porovnání bazální a stimulované produkce NO hemocytů *L. stagnalis* a *R. lagotis* držených v 1× týdně čištěném akváriu a počet hemocytů plžů *R. lagotis* chovaných v akváriích čištěných 1× týdně a akváriích čištěných měsíčně, kap. 4.3.2: porovnání fagocytózy hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*, kap. 4.4: porovnání obvodu, obsahu a cirkularity hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*.

Párové testy byly použity v případě, kdy se v náhodném výběru vyskytovaly dvojice veličin (pár se liší jen ve faktoru, který je testován). To bylo v případě pokusů v kap. 4.2.1: stimulovaná produkce H_2O_2 hemocyty *R. lagotis*, kap. 4.2.2: stimulovaná produkce NO hemocyty *L. stagnalis*, kap. 4.2.4: stimulovaná produkce NO hemocyty *L. stagnalis* a *R. lagotis* držených v 1× týdně čištěných akváriích, kap. 4.3.2: inhibice fagocytózy MEK 1/2 inhibitorem.

Analýza rozptylu (ANOVA) byla použita při porovnávání více náhodných výběrů, což byl případ kap. 4.2.1: produkce H_2O_2 hemocyty *L. stagnalis* stimulované třemi různými koncentracemi zymosanu a kap. 4.6: porovnání vlivu jednotlivých koncentrací plazmy *L. stagnalis* na životaschopnost miracidí *T. regenti*.

Korelační analýza byla použita pro testování vztahu mezi dvěma spojitými veličinami. Spearmanův korelační test byl použit v kap. 4.1 při hledání závislosti počtu hemocytů na výšce ulity. Pro analýzu závislosti počtu přeživších larev na koncentraci plazmy (kap. 4.6) byla použita Poissonova regrese. Tento typ regrese je vhodný pro případ, kdy závislá proměnná popisuje počty událostí za nějaký časový úsek.

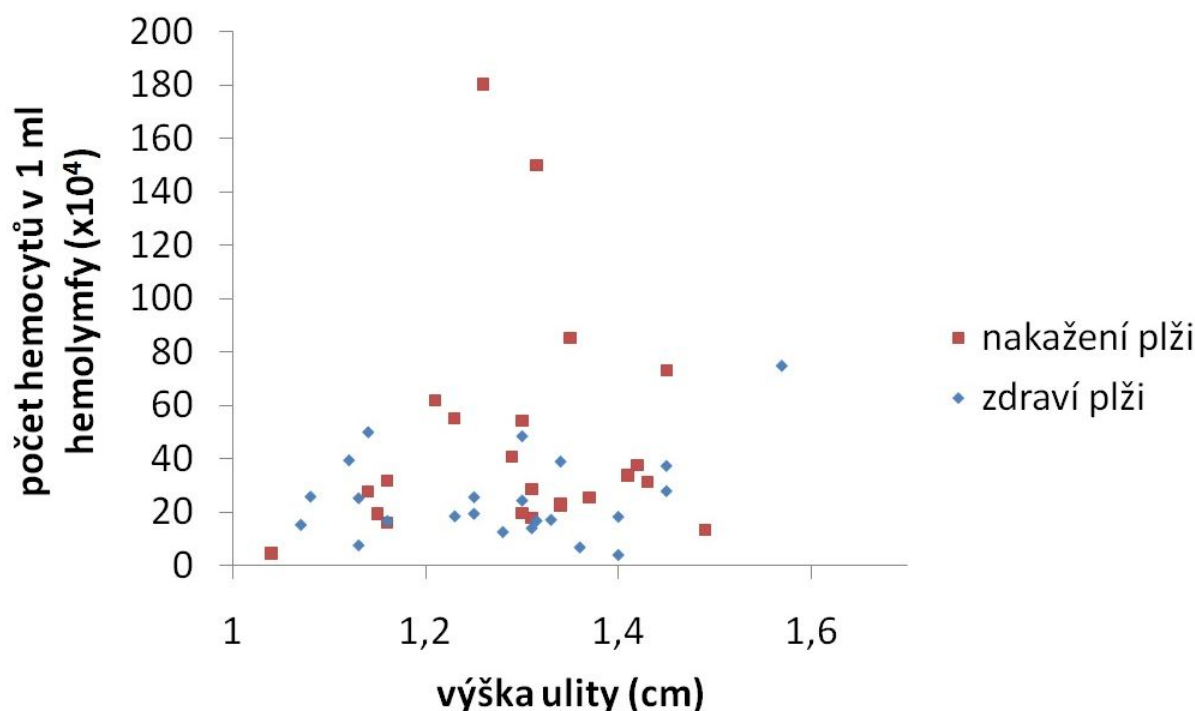
Parametrické testy byly použity pro data s normálním rozdělením. Pro data, která nemají normální rozdělení, byly použity neparametrické testy.

V případě, že byly testy uspořádané v čase (např. produkce radikálu po 20, 40, 60 min), bylo nutné kvůli závislosti po sobě jdoucích událostí upravit jednotlivé p-hodnoty a porovnat je s novými kritickými hodnotami. Tato korekce byla provedena Fisherovým kombinačním testem (inverzní normální metoda s Pocockovými kritickými hodnotami) (Lehmacher a Wassmer 1999).

4 Výsledky

4.1 Počet hemocytů plže *R. lagotis*

Nakažení plži měli v průměru 459 000 hemocytů/ml, zdraví pak 256 000/ml. Nakažení plži měli tedy $1,79 \times$ více hemocytů než zdraví plži. Počet hemocytů plže nezávisí na jeho velikosti ($p < 0,05$), viz obr. 2. Průměrná velikost zdravých a nakažených plžů je stejná ($p < 0,05$).



Obr. 2: Počet hemocytů u zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*.

4.2 Produkce radikálů

Hemocyty různých druhů plžů jsou různě citlivé na jednotlivé stimulanty produkce NO a H₂O₂. Stimulační efekt vybraných látek a organismů (PMA, zymosan, laminarin, LPS, tepelně usmrcené bakterie, kvasinky a homogenát cercárií *T. regenti* a *T. szidati*) na hemocytární produkci těchto radikálů byl testován u plžů *L. stagnalis* a *R. lagotis*. Jako jediný efektivní stimulant produkce NO u hemocytů *L. stagnalis* se osvědčil PMA. U hemocytů plžů *R. lagotis* chovaných v 1 × měsíčně čistěných akváriích se pro produkci NO neosvědčil žádný z použitých stimulantů (kap. 4.2.2). Hemocyty plžů *R. lagotis* chovaných v 1 × týdně

čištěných akváriích se podařilo stimulovat k produkci NO pomocí PMA (kap. 4.2.4). Pro stimulaci produkce H₂O₂ se osvědčil zymosan u *L. stagnalis*, u plže *R. lagotis* naopak PMA (kap. 4.2.1). Laminarin se pro stimulaci produkce NO nedal použít, protože interagoval se sondou a i bez přítomnosti NO vznikl fluorescenční produkt. Z parazitárních faktorů byl vyzkoušen homogenát cercárií *T. regenti* a *T. szidati*. Inhibitory proteáz interagovaly se sondou DAF-FM diacetát za tvorby fluorescenčního produktu. Proto byl vyzkoušen i efekt homogenátu bez inhibitorů proteáz. Takové homogenáty měly inhibiční efekt (i když ne signifikantní). Stimulační efekt různých látek na produkci NO a H₂O₂ shrnuje Tab. 1.

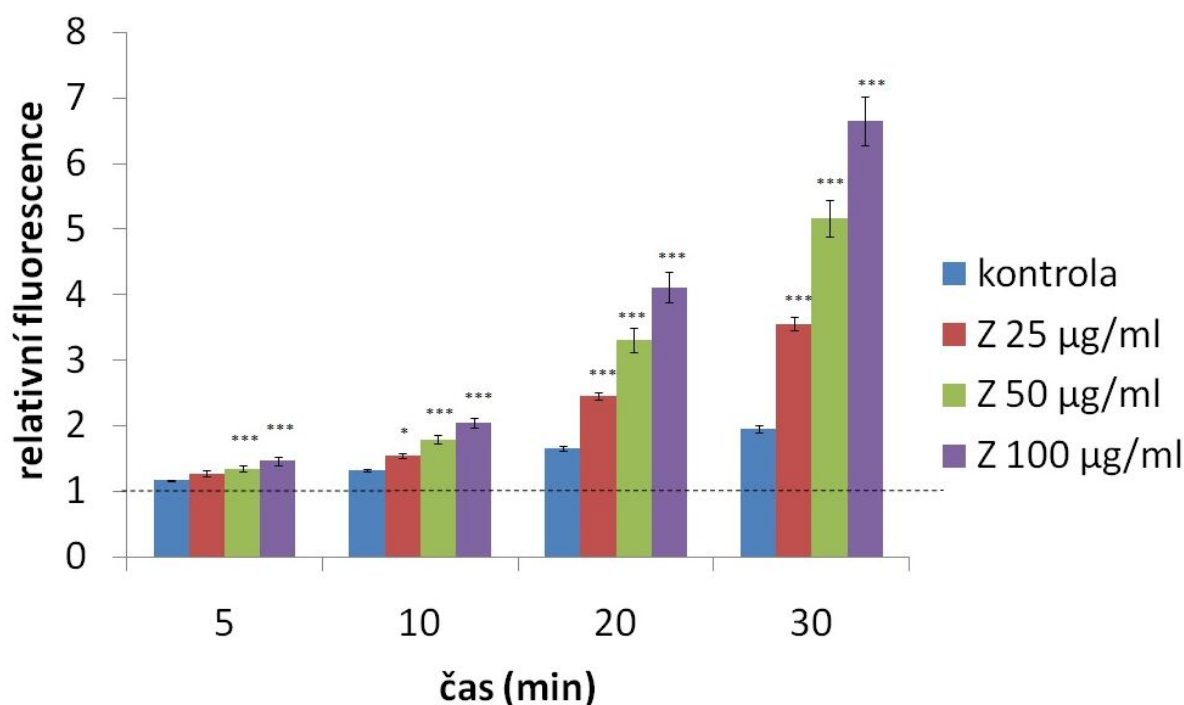
Tab. 1: Stimulační vliv různých látek na produkci NO a H₂O₂ hemocyty *L. stagnalis* a *R. lagotis*. HC – homogenát cercárií, ANO – po expozici dané látky pozorován v měřeném intervalu statisticky významný nárůst produkce daného radikálu, NE – po expozici dané látky nebyl pozorován v měřeném intervalu statisticky významný nárůst produkce daného radikálu, – nebylo testováno

Stimulant	OXID DUSNATÝ		PEROXID VODÍKU	
	<i>L. stagnalis</i>	<i>R. lagotis</i>	<i>L. stagnalis</i>	<i>R. lagotis</i>
PMA	ANO	ANO	NE	ANO
Zymosan	NE	NE	ANO	NE
Laminarin	nelze	nelze	NE	NE
Usmrcené bakterie	–	NE	–	–
Usmrcené kvasinky	–	NE	–	–
LPS	–	NE	–	–
HC <i>T. regenti</i>	NE	NE	–	–
HC <i>T. szidati</i>	NE	–	–	–

4.2.1 Stimulovaná produkce peroxidu vodíku

Hemocyty plže *L. stagnalis*

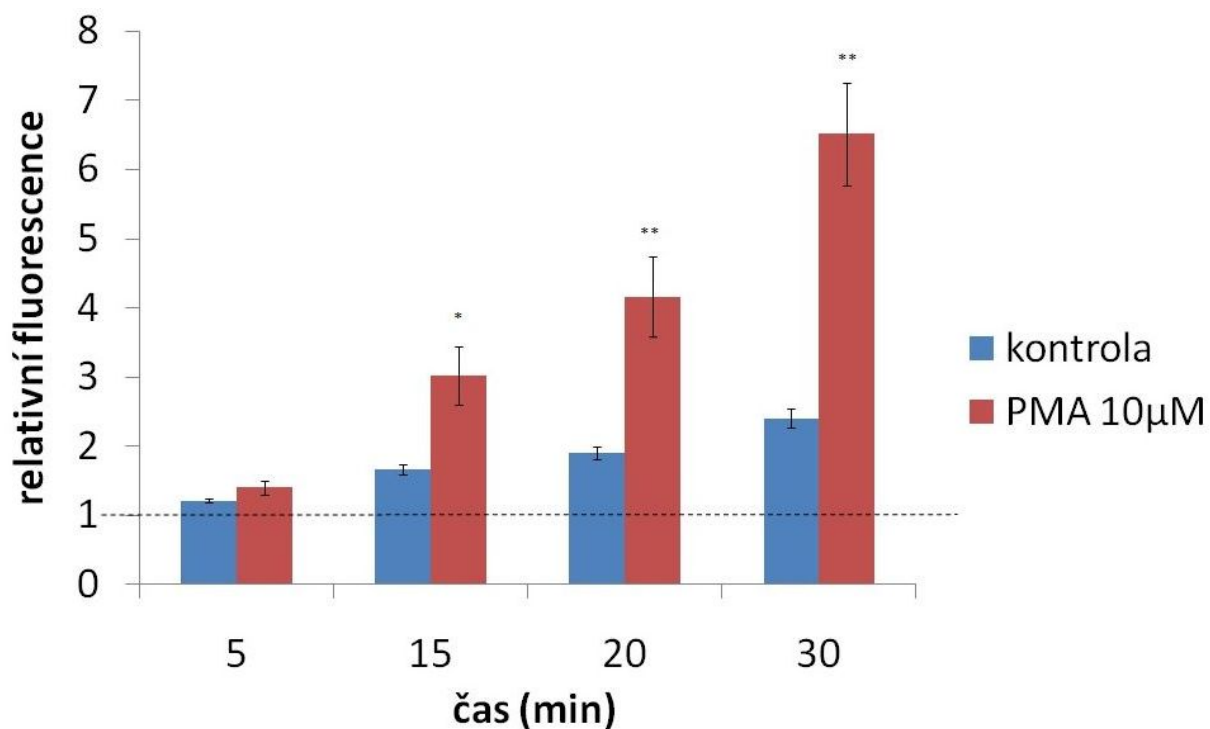
Zymosan stimuloval produkci H₂O₂ ve všech použitých koncentracích (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml). Míra stimulace byla závislá na koncentraci. Nejnižší koncentrace (25 µg/ml) zvýšila po 30 min produkci 2,1 × (p<0,001), maximální koncentrace (100 µg/ml) v průměru 3,5 × (p<0,001) oproti bazální produkci (viz obr. 3). Měření produkce H₂O₂ hemocyty *L. stagnalis* stimulované zymosanem bylo 6 × opakováno.



Obr. 3: Produkce H_2O_2 hemocyty *L. stagnalis* stimulovaná zymosanem (25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná čára). Statistické vyhodnocení pomocí parametrického ($t = 10$ min) i neparametrického ($t = 5, 20, 30$ min) testu ANOVA. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Hemocyty plže *R. lagotis*

Zymosan produkci H_2O_2 u hemocytů *R. lagotis* nestimuluje, PMA naopak vliv má. Stimulace 10 μM PMA způsobila po 30 min v průměru 2,7násobný ($p < 0,001$) nárůst produkce H_2O_2 oproti kontrole (viz obr. 4). Měření produkce H_2O_2 hemocyty *R. lagotis* stimulované PMA bylo 4 \times opakováno.



Obr. 4: Produkce H_2O_2 hemocyty *R. lagotis* stimulovaná $10\mu M$ PMA. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná čára). Statistické vyhodnocení párovým t-testem. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

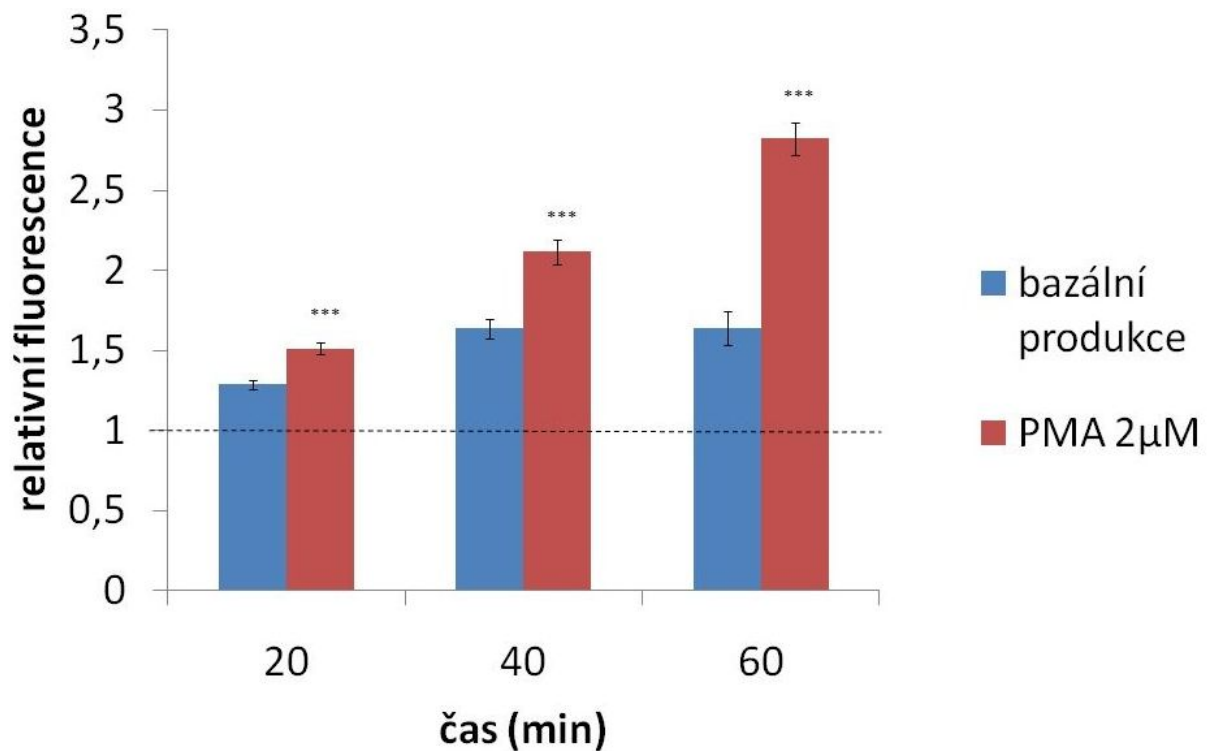
4.2.2 Stimulovaná produkce oxidu dusnatého

Hemocyty plže *R. lagotis*

Nepodařilo se nalézt stimulant produkce NO u hemocytů plže *R. lagotis*.

Hemocyty plže *L. stagnalis*

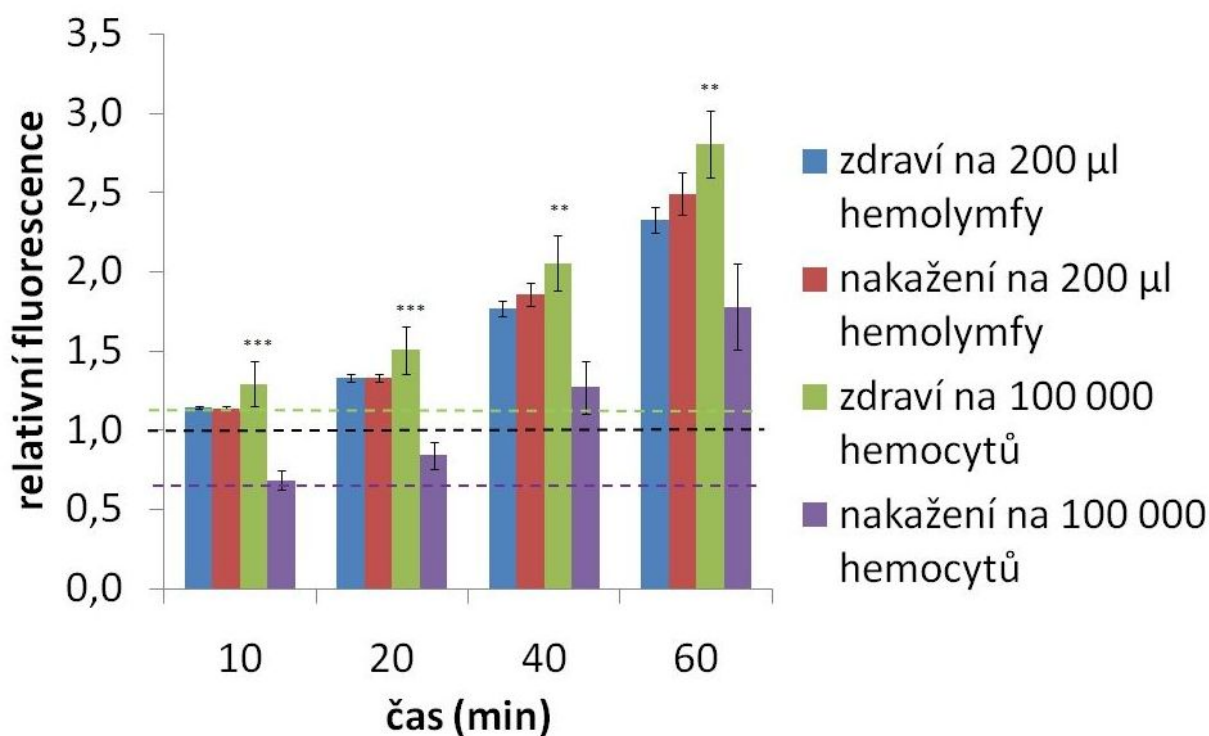
Z použitých stimulantů měl pouze PMA efekt na produkci NO. Měření probíhalo po dobu 60 min. Stimulací $2\mu M$ PMA narostla produkce NO po 60 min $1,72\times$ ($p < 0,001$) oproti bazální produkci (viz obr. 5). Měření produkce NO hemocyty *L. stagnalis* stimulované PMA bylo $3\times$ opakováno.



Obr. 5: Produkce NO stimulovaná 2µM PMA u hemocytů *L. stagnalis*. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná čára). Statistické vyhodnocení párovým t-testem. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

4.2.3 Bazální produkce NO nakažených a zdravých plžů *R. lagotis*

Bazální produkce NO byla hodnocena jednak vzhledem ke stejnému objemu hemolymfy (200 µl), ale také vzhledem ke stejnému počtu hemocytů (100 000). Pokud data byla vztažena na stejný objem hemolymfy, produkovaly hemocyty nakažených plžů 1,07× více NO než hemocyty zdravých plžů. Výsledek nebyl signifikantní. Byla-li data vztažena na stejný počet hemocytů, produkovaly naopak hemocyty zdravých plžů signifikantně více NO než hemocyty nakažených plžů. Po 60 min narostla produkce NO u nakažených plžů 1,74×, zatímco u zdravých plžů 2,74× oproti počátku měření (viz obr. 6). Po 10, 20, 40 a 60 min produkovali zdraví plži 1,89× ($p < 0,001$), 1,79× ($p < 0,001$), 1,62× ($p < 0,05$) a 1,58× ($p < 0,05$) více NO než nakažení plži. Měření bazální produkce NO hemocytů *R. lagotis* bylo 3× opakováno.

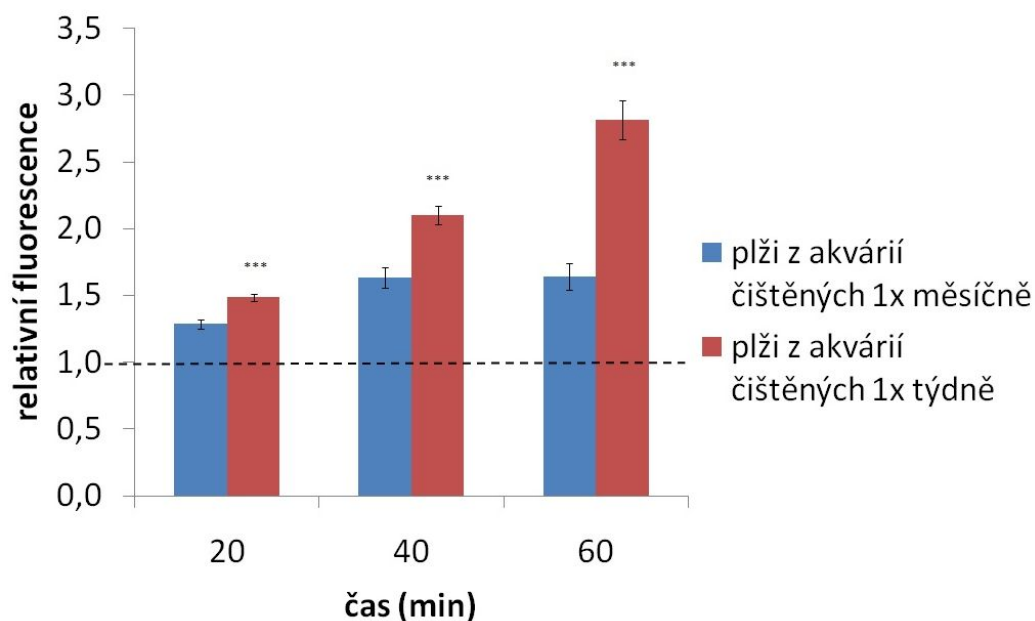


Obr. 6: Bazální produkce NO hemocyty zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti* během 60 min. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná černá čára pro signál dat hodnocených na objem hemolymfy, fialová pro signál hemocytů nakažených plžů vztážených na počet hemocytů a zelená pro signál hemocytů zdravých plžů hodnocený na počet hemocytů). Statistické vyhodnocení dvouvýběrovým t-testem. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

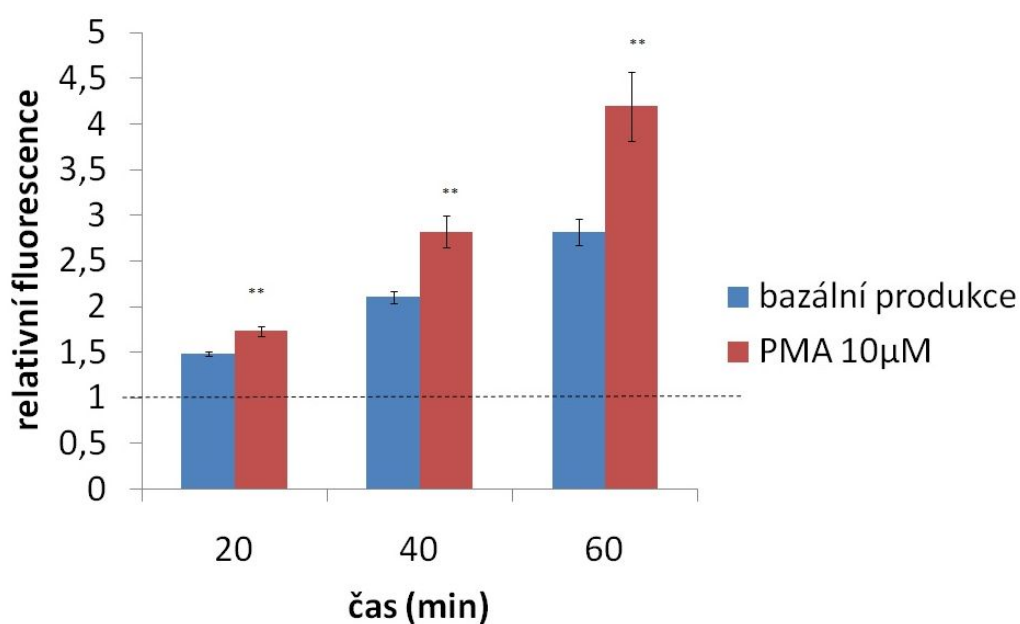
4.2.4 Vliv čistoty prostředí na produkci NO

Hemocyty plže *L. stagnalis*

Bazální produkce plžů chovaných v čistém prostředí narostla od počátku měření $2,8\times$, zatímco u plžů chovaných v akváriích čistěných $1\times$ měsíčně narostla $1,6\times$ (experiment byl $3\times$ opakován). Plži chovaní v čistém prostředí měli $1,75\times$ ($p < 0,001$) vyšší bazální produkci NO než plži chovaní v akváriích čistěných $1\times$ měsíčně, viz obr. 7. Produkce NO plžů z čistého prostředí stimulovaná $10\mu\text{M}$ PMA narostla $1,5\times$ více než bazální produkce (experiment byl $3\times$ opakován), viz obr. 8.



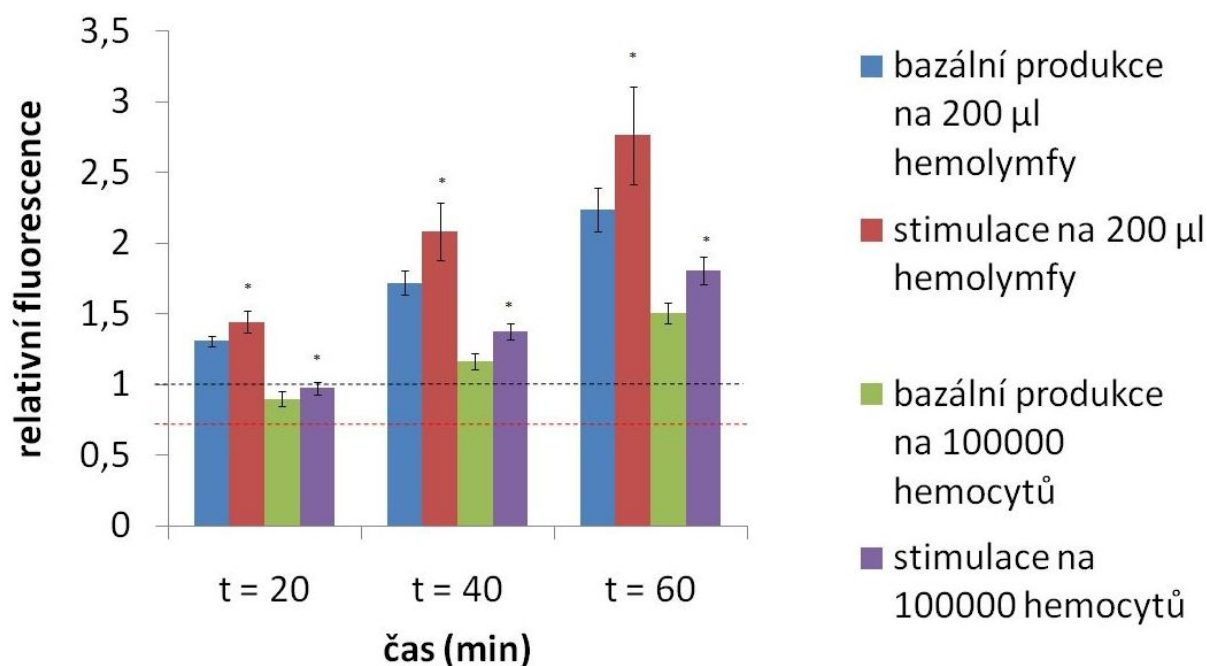
Obr. 7: Bazální produkce NO hemocyty plžů *L. stagnalis* chovaných v akváriích čištěných 1× týdně a 1× měsíčně. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná čára). Statistické vyhodnocení dvouvýběrovým t-testem. ***: $p < 0,001$.



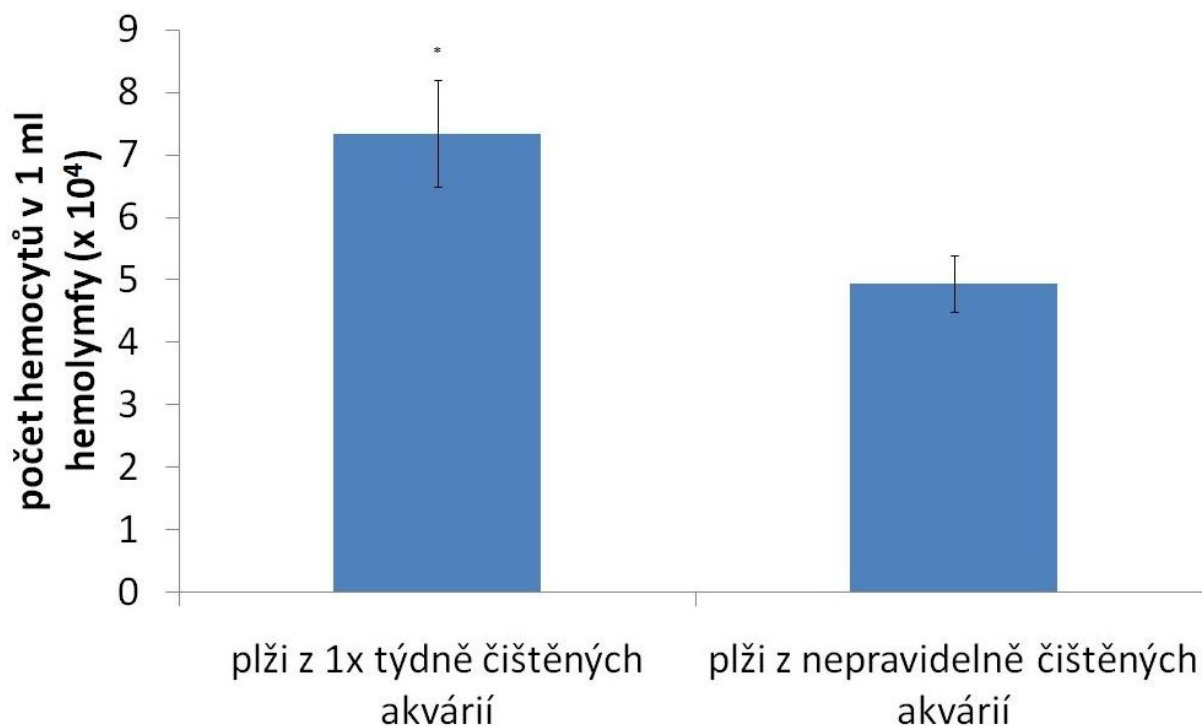
Obr. 8: Produkce NO stimulovaná 10µM PMA u hemocytů *L. stagnalis* držných v akváriích čištěných 1× týdně. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (přerušovaná čára). Statistické vyhodnocení párovým t-testem. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Hemocyty plže *R. lagotis*

Protože nebyl nalezen žádný efektivní stimulant produkce NO u plžů *R. lagotis* chovaných v 1× měsíčně čištěných akváriích, testován byl vliv čistoty prostředí na stimulovanou i bazální produkci NO. Plži chovaní v 1× týdně čištěných akváriích už byli schopní produkovat NO v reakci na přítomnost 10 μ M PMA. Produkce NO hodnocená na stejný objem hemolymfy (200 μ l) byla po 60 min 1,29× vyšší ($p < 0,05$) u stimulovaných hemocytů než u hemocytů nestimulovaných. Po přepočtu na 100 000 buněk byla stimulovaná produkce NO po 60 min 1,18× vyšší ($p < 0,05$) než bazální nestimulovaná produkce NO, viz obr. 9. Experiment byl 4× opakován. Bazální produkce NO hemocytů plžů z nečištěných akvárií byla nesignifikantně vyšší než u plžů z čištěných akvárií. Dále bylo zjištěno, že plži z čistého prostředí měli větší množství hemocytů, a to 1,5× vzhledem k plžům drženým v nečištěných akváriích ($p < 0,05$), viz obr. 10.



Obr. 9: Produkce NO stimulovaná 10 μ M PMA u hemocytů *R. lagotis* držených v akváriích čištěných 1× týdně. Relativní fluorescence (průměr, \pm SEM) je ukázána jako podíl signálu v daném čase a signálu v čase 0 min (černá přerušovaná čára pro data hodnocená na stejný objem, červená pro data hodnocená na stejný počet hemocytů). Statistické vyhodnocení párovým t-testem. *: $p < 0,05$.



Obr. 10: Rozdíl v počtu hemocytů (průměr, \pm SEM) plžů *R. lagotis* chovaných v akváriích čištěných 1 \times týdně a v nečištěných akváriích. Statistické vyhodnocení neparametrickým dvouvýběrovým t-testem. *: $p < 0,05$.

4.2.5 Inhibice produkce NO u hemocytů *R. lagotis*

Inhibice bazální produkce NO inhibitorem PKC (GF109203X)

Vliv inhibitoru PKC (GF109203X) na bazální produkci NO byl testován u hemocytů plže *R. lagotis*. Hemocyty plže *R. lagotis* inkubované s inhibitorem PKC neprodukovaly méně NO než kontrolní hemocyty (bazální produkce). Specifita inhibitoru byla testována na hemocytech *L. stagnalis*. Hemocyty stimulované PMA (aktivátorem PKC) produkovaly signifikantně více NO než hemocyty stimulované PMA a zároveň inhibované GF109203X. Vzhledem k tomu, že hemocyty *R. lagotis* nelze pomocí PMA k produkci NO stimulovat, nemohla být specifita inhibitoru testována přímo u nich.

Inhibice LPS stimulované produkce NO u hemocytů *R. lagotis*

Hemocyty *R. lagotis* exponované LPS (10 mg/ml) produkovaly nesignifikantně více NO než hemocyty bez LPS (v Tab. 1 není považováno za stimulaci, protože se nejedná o statisticky významný nárůst). Použití stimulantu (LPS) a inhibitoru MEK 1/2 kinázy (U0126)

zároveň způsobilo snížení produkce NO, avšak ne až na úroveň bazální produkce. Výsledek také nebyl signifikantní.

4.3 Fagocytóza hemocytů *R. lagotis*

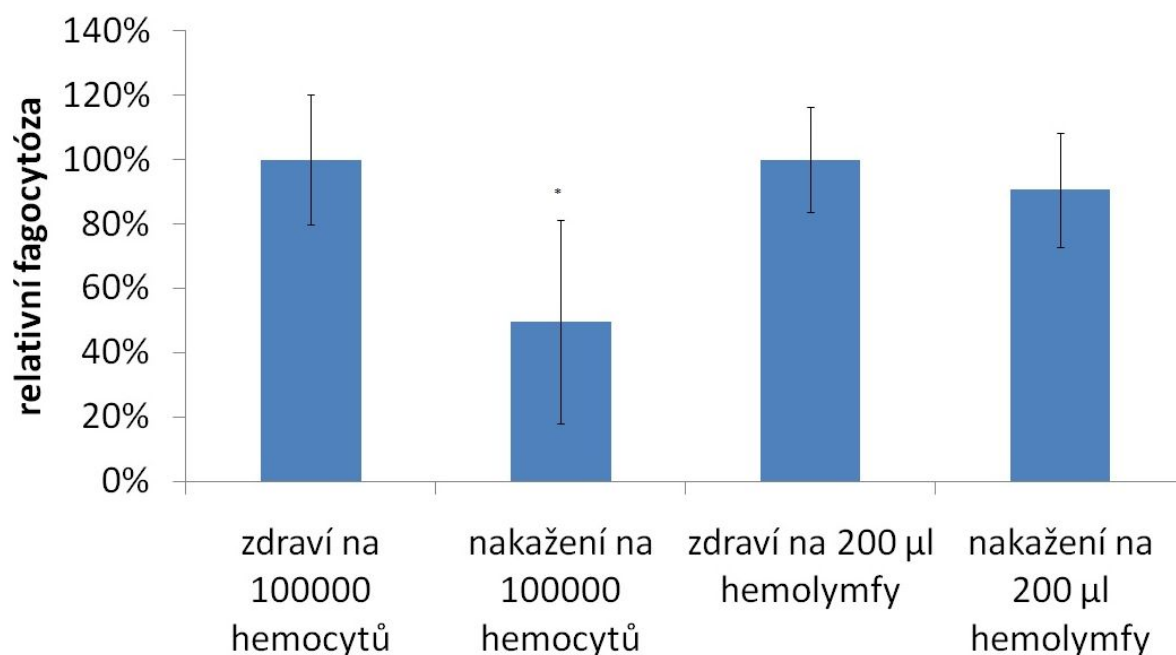
Schopnost hemocytů fagocytovat byla porovnána mezi hemocyty zdravých plžů a plžů nakažených *T. regenti*. Fagocytovány byly různé částice značené FITC a pHrodo sondami.

4.3.1 Fagocytóza FITC-značených částic

Hemocyty ochotně pohlcovaly erytrocyty značené FITC, avšak zhasínání fluorescence nepohlcených erytrocytů trypanovou modří bylo velmi problematické. Žádná kombinace koncentrace trypanové modři (0,5% – 2%) a doby inkubace (1 min – 20 min) nevedla k efektivnímu zhasnutí nepohlcených myších erytrocytů. Vyzkoušeny proto byly jiné buňky značené FITC, a to králičí erytrocyty, kvasinky *S. cerevisiae* a bakterie *E. coli*. Žádné z nich se však nepodařilo trypanovou modří efektivně zhasnout. Hodnocení pohlcených a nepohlcených buněk se tím stalo téměř nemožné, a od této metodiky pokusu bylo ustoupeno.

4.3.2 Fagocytóza hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti* s využitím pHrodo

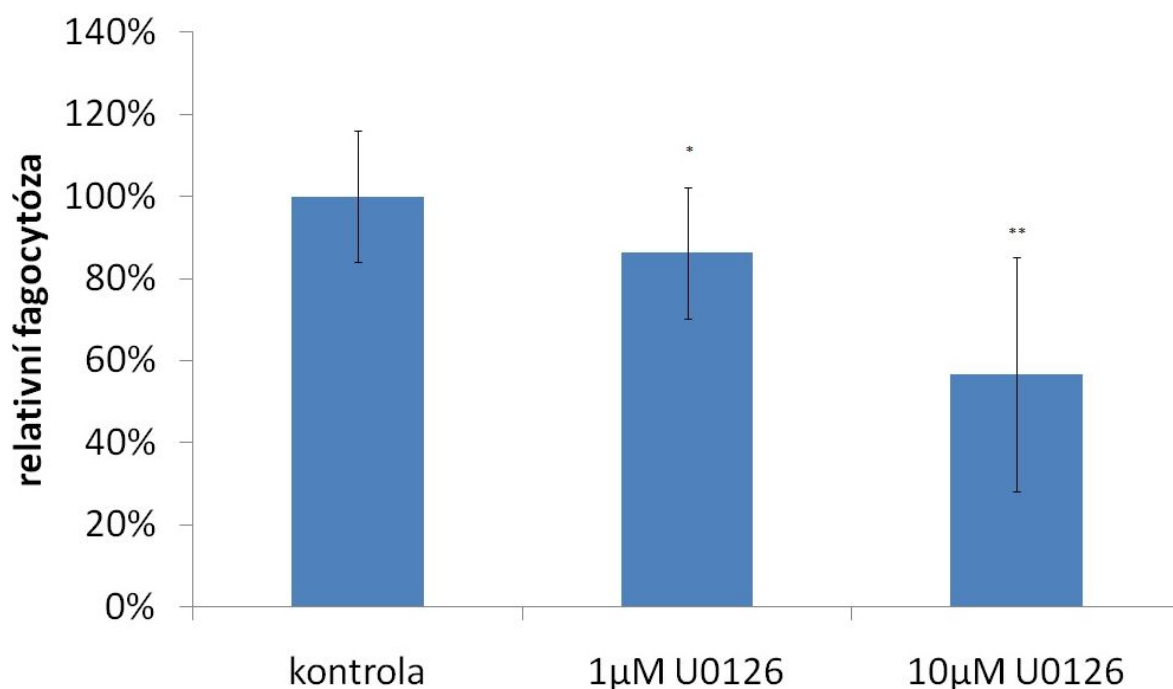
Efektivita fagocytózy pHrodo značených bakterií byla porovnána mezi zdravými plži a plži nakaženými *T. regenti*. Měření bylo hodnoceno jednak vzhledem ke stejnému objemu hemolymfy (200 μ l), a pak i vzhledem ke stejnému počtu hemocytů (100 000). Fagocytóza hodnocená na stejný objem hemolymfy dosahovala u hemocytů nakažených plžů 90 % fagocytózy hemocytů zdravých plžů. Výsledek nebyl signifikantní. Pokud byla fagocytóza hodnocená na stejný počet hemocytů, měli nakažení plži v průměru o 50 % nižší schopnost fagocytovat bakterie než plži zdraví ($p < 0,05$), viz obr. 11. Experiment byl 4 \times opakován.



Obr. 11: Porovnání fagocytózy hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*. Hodnota relativní fagocytózy hemocytů nakažených plžů je vztažena k hodnotě signálu hemocytů ze zdravých plžů. Statistické vyhodnocení neparametrickým dvouvýběrovým t-testem, *: $p < 0,05$.

Inhibice fagocytózy MEK 1/2 inhibitorem

Inhibitor MEK 1/2 kinázy (U0126) je schopný u hemocytů plže *R. lagotis* inhibovat fagocytózu. Inhibitor v $1\mu\text{M}$ koncentraci snížil fagocytózu o 16 % ($p < 0,05$), v $10\mu\text{M}$ koncentraci o 43 % ($p < 0,01$), viz obr. 12 (hodnoceno na 100 000 hemocytů). Experiment byl 3× opakován. Inhibitor byl rozpuštěn v max. 0,1% DMSO, a proto byl testován i efekt 0,1% DMSO na fagocytózu hemocytů, který byl však zanedbatelný.

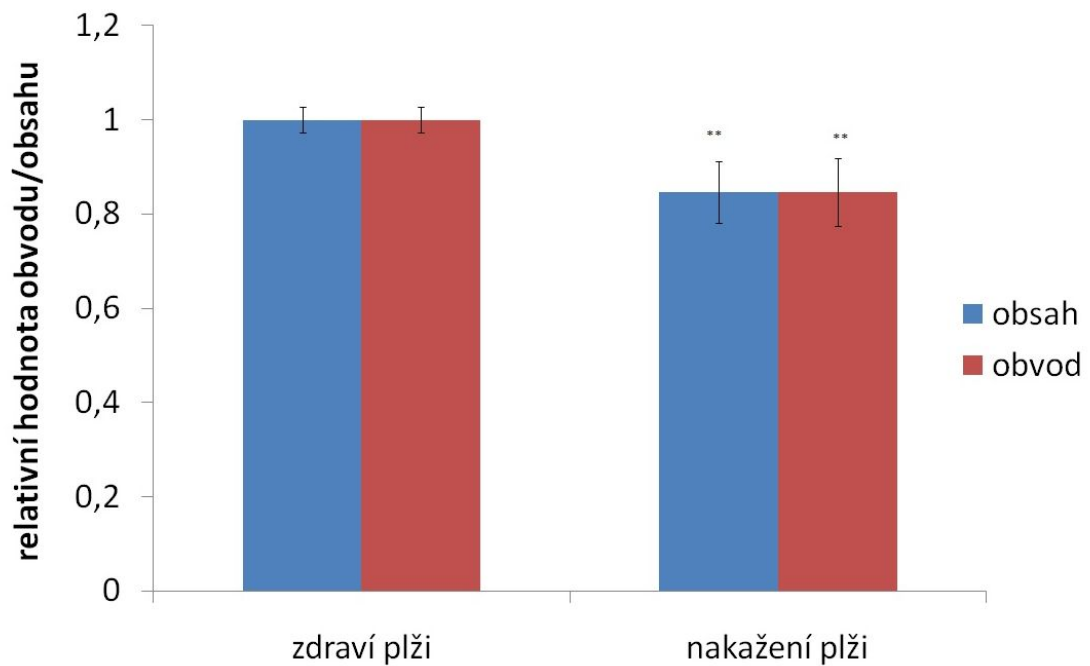


Obr. 12: Vliv inhibice MEK 1/2 kinázy na schopnost hemocytů *R. lagotis* fagocytovat. Hodnota relativní fagocytózy hemocytů s inhibitorem je vztažena k hodnotě signálu hemocytů bez inhibitoru. Hodnoceno bylo na 100 000 hemocytů. Ke statistickému zhodnocení byl použit párový t-test, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

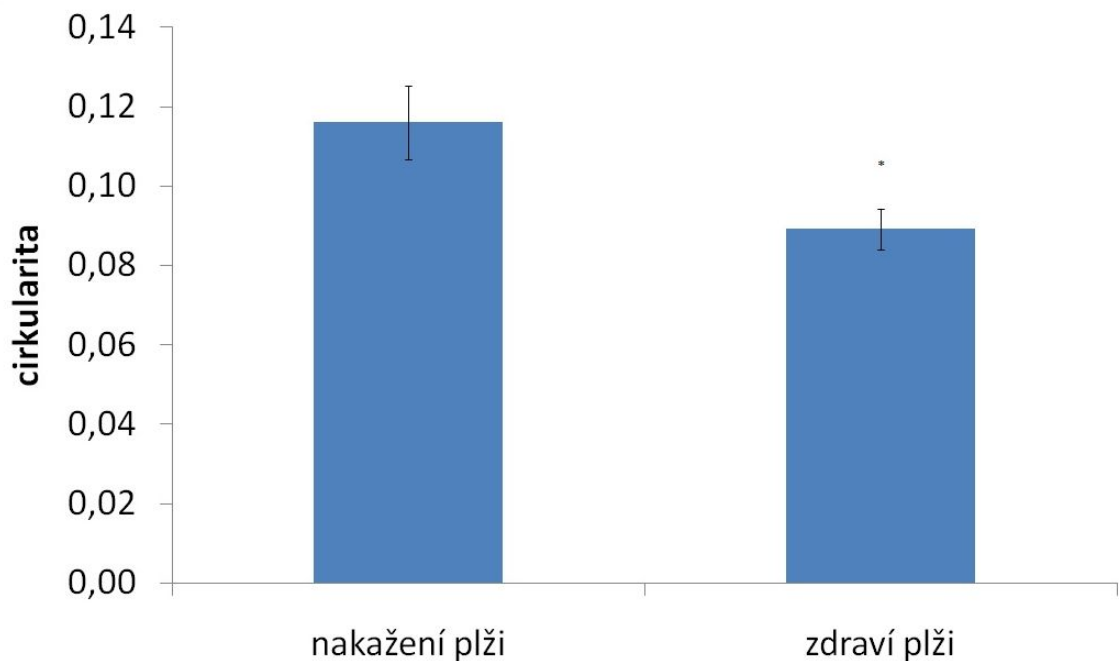
4.4 Schopnost hemocytů adherovat na povrch a tvořit panožky

Schopnost hemocytů adherovat k povrchu a tvořit panožky byla hodnocena měřením jejich morfologických parametrů, a to obvodu, obsahu a cirkularity. Parametry více než 80 buněk pocházejících ze zdravých plžů *R. lagotis* a plžů infikovaných *T. regenti* byly získány ze 4 nezávislých pokusů. V každém pokusu byl použit směsný vzorek hemolymfy z 10 plžů. Hemocyty pocházející z nakažených plžů měly menší obvod i obsah buněk, a to v průměru o 15,3 %, viz obr. 13.

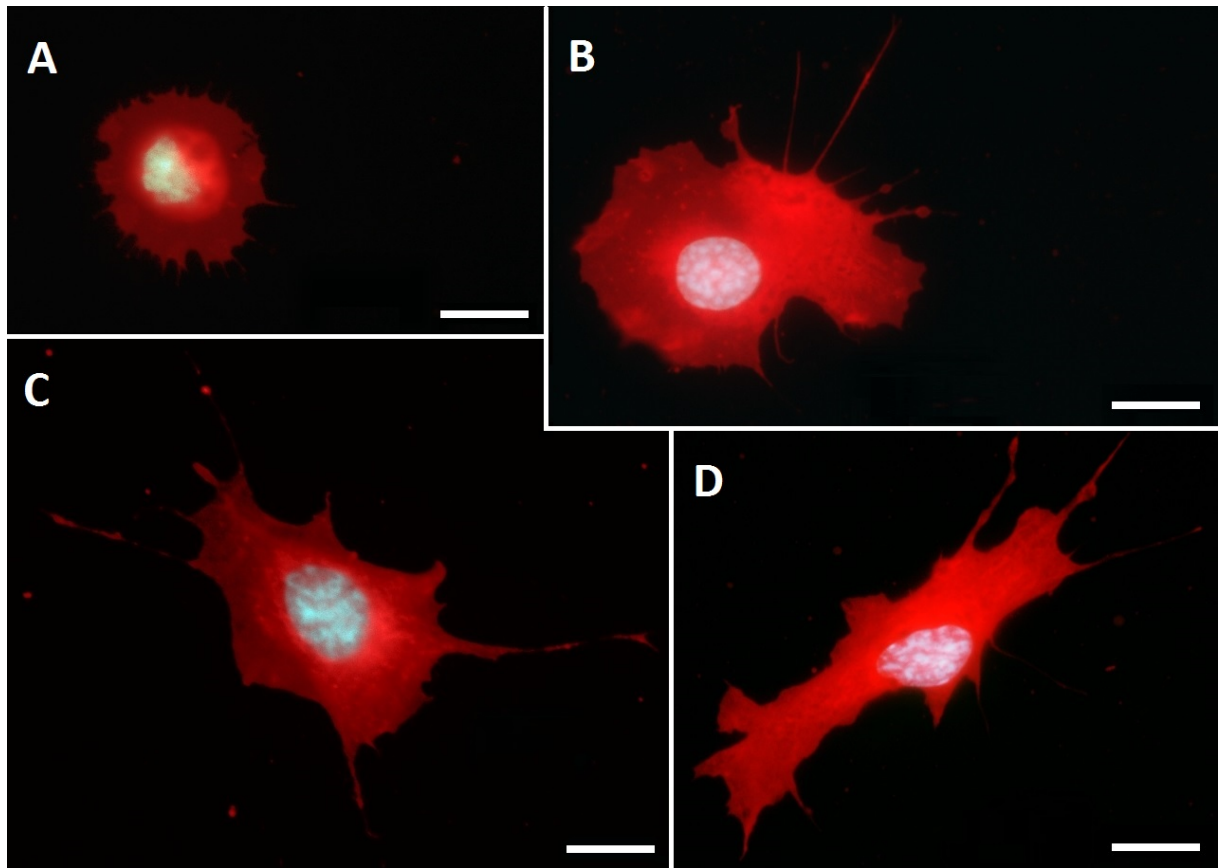
Cirkularita hemocytů nakažených plžů byla o 23,2 % vyšší než u hemocytů zdravých plžů, viz obr. 14 (cirkularita = 1 \Rightarrow hemocyty mají kruhový tvar). Obrázek 15 ukazuje typové tvary hemocytů zdravých a nakažených plžů.



Obr. 13: Relativní hodnoty obvodu a obsahu (průměr, \pm SEM) hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvouvýběrový t-test, **: $p < 0,01$.



Obr. 14: Porovnání cirkularity (průměr, \pm SEM) hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*. Cirkularita = 1 \Rightarrow hemocyty mají kruhový tvar. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvouvýběrový t-test, *: $p < 0,05$.



Obr. 15: Typové tvary hemocytů u plžů nakažených *T. regenti* (A) a zdravých plžů (C, D). U nakažených plžů se vyskytují i hemocyty s panožkami (B), jde ale o minoritní část populace. Měřítka ukazují 10 μm .

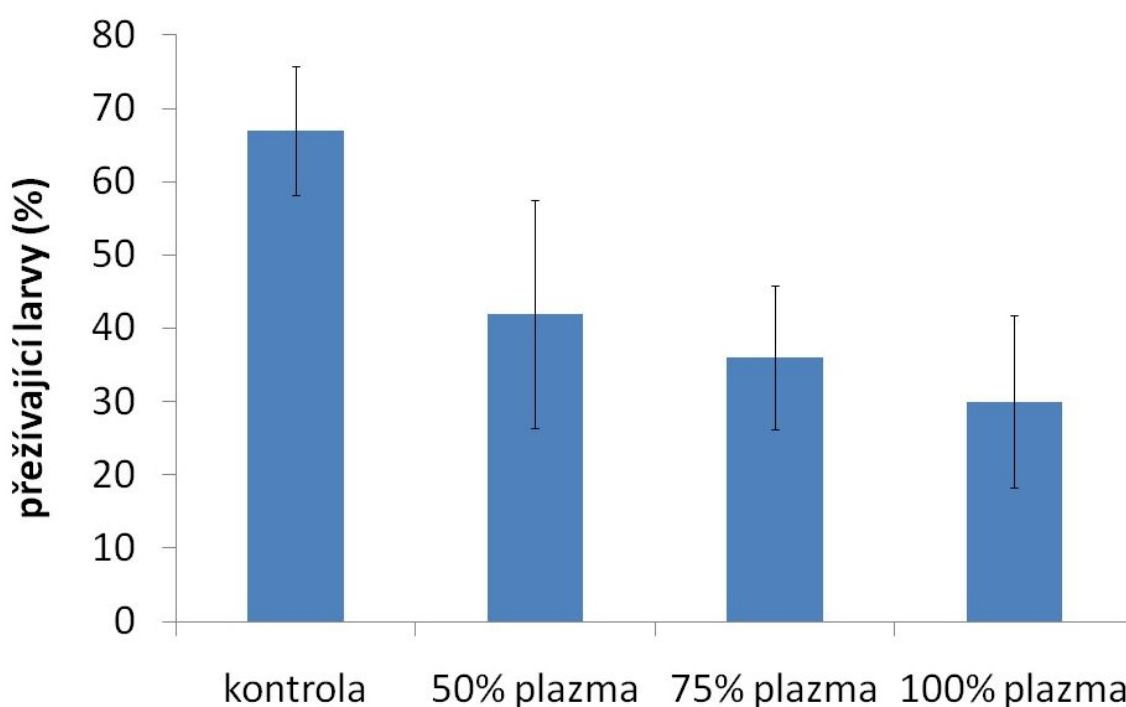
4.5 Enkapsulace larev *T. regenti* hemocyty *L. stagnalis* *in vitro*

Agar (1%) se ukázal jako nejvhodnější substrát pro inkubaci hemocytů s larvami motolice. Oproti parafilmu se na něm hemocyty méně shlukovaly.

Interakce hemocytů *L. stagnalis* s miracidii a sporocystami *T. regenti* (jak adherence jednotlivých hemocytů na povrch larvy, tak i její úplná enkapsulace) byla pozorována během max. 7 h, protože po této době životaschopnost hemocytů rychle klesá. Od začátku inkubace larev v hemolymfě se postupně začaly objevovat shluky hemocytů, ve kterých byly někdy pozorovány i larvy motolice. Larvy nejevily známky poškození (např. destrukce povrchu). Během času snižovaly svoji pohybovou aktivitu. Během tří nezávislých pokusů nebyla enkapsulace larev *T. regenti* hemocyty *L. stagnalis* pozorována.

4.6 Toxický efekt plazmy

Testován byl vliv humorální složky vnitřního obranného systému *L. stagnalis* (plazmy) na životaschopnost miracidí *T. regenti*. Během 10,5 h inkubace miracidia postupně snižovala svoji pohybovou aktivitu a hynula. U některých bylo pozorováno poškození povrchového epitelu. Schopnost larev přežít v plazmě plže po 10,5 h je závislá na koncentraci plazmy ($p = 0,0173$). Data získaná v kratších časových intervalech než 10,5 h po začátku inkubace neukazují statisticky významnou závislost životaschopnosti miracidí na koncentraci plazmy. Ve 100% plazmě uhynulo po 10,5 h 70 % miracidí, zatímco v pufru 33 %. Se snižující se koncentrací plazmy se snižuje i její toxicita. V 75% plazmě uhynulo 64 % miracidí a v 50% plazmě 58 % miracidí, viz obr. 16. Statisticky signifikantní je však jen trend závislosti životaschopnosti miracidí na koncentraci plazmy, a nikoliv absolutní rozdíly ve vlivu jednotlivých koncentrací plazmy na životaschopnost miracidí. Experiment byl 3× opakován.



Obr. 16: Toxicita plazmy *L. stagnalis* pro sporocysty *T. regenti* po 10,5 h inkubace. Množství přežívajících larev (průměr, \pm SEM) záviselo na koncentraci plazmy ($p = 0,0173$), pro statistické vyhodnocení byla použita Poissonova regrese.

4.7 Hodnocení infekce plže pomocí histologie

4.7.1 Efektivita penetrace miracidíí do nekompatibilních hostitelů

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit schopnost miracidíí penetrovat do nekompatibilního plže. Pokud jsou miracidia schopna úspěšně penetrovat, je možné dále sledovat průběh infekce pomocí histologie.

Každý plž byl inkubován 2 h s 10 nekompatibilními miracidii. V případě dvojice *R. lagotis*–*T. szidati* bylo po 2 h nalezeno 64 % miracidíí mimo plže. V případě dvojice *L. stagnalis*–*T. regenti* bylo mimo plže nalezeno 20 % miracidíí. Množství miracidíí (živých i mrtvých), která nepenetrovala do hostitele, shrnuje Tab. 2. Mrtvá miracidia nebyla pozorována v případě dvojice *L. stagnalis*–*T. regenti*. Pokus s dvojicí *R. lagotis*–*T. szidati* byl 2× opakován, s dvojicí *L. stagnalis*–*T. regenti* byl proveden 1×.

Tab. 2: Efektivita penetrace miracidíí *T. regenti* a *T. szidati* do nekompatibilního mezihostitele. Tabulka ukazuje počty živých i mrtvých miracidíí (z 10), která nepenetrovala do nekompatibilního hostitele po 2 h.

číslo plže	<i>R. lagotis</i> – <i>T. szidati</i>		<i>L. stagnalis</i> – <i>T. regenti</i>
	živá miracidia	mrtvá miracidia	živá miracidia
1	6	1	1
2	6	1	2
3	7	0	4
4	5	1	1
5	6	3	
6	4	4	
7	5	2	
8	5	0	
9	3	0	

průměrný počet miracidíí z 10, která nepenetrovala

<i>R. lagotis</i> – <i>T. szidati</i>	<i>L. stagnalis</i> – <i>T. regenti</i>
6,5 z 10 = 65 %	2 z 10 = 20 %

4.7.2 Mikroskopie histologických vzorků

Protože efektivita penetrace miracidí *T. szidati* do nekompatibilního plže *R. lagotis* byla 35 %, byli plži určeni pro histologické zpracování pro zvýšení úspěšnosti infekce inkubováním s vysokým počtem miracidí (asi 40). V čase 2 h po nákaze byli plži usmrceni a postoupeni histologickému zpracování, viz kap. 3.12. Preparáty byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX51. Infekce však nebyla na histologických preparátech prokázána.

5 Diskuse

Plži se spoléhají při nákaze patogenem na svůj vnitřní obranný systém. Tento systém je založen pouze na neadaptivních mechanismech a nesetkáme se zde tedy s imunoglobuliny nebo pamětí tak, jak je známe u obratlovců. Nejdůležitější efektorové buňky vnitřního obranného systému plžů jsou hemocyty, které mají podobné vlastnosti jako lidské makrofágy (McKerrow a kol. 1985). Invadující organismy jsou zničeny fagocytózou a zároveň jsou produkovány toxické ROS a NO, které jsou klíčové v usmrcení parazita (Hahn a kol. 2001a,b). Na míře rezistence se podílejí také humorální faktory hemolymfy, z nichž nejdůležitější jsou zřejmě lektiny, které zprostředkovávají rozpoznání a propojení cizí částice s hemocytem (Horák a van der Knaap 1997).

Plži slouží jako mezipřistatele řady medicínsky nebo veterinárně důležitých motolic. Ve chvíli, kdy plže napadne miracidium nekompatibilní motolice, je vnitřním obranným systémem rozpoznáno a velmi brzy zničeno, ale při nákaze miracidium kompatibilní motolice se parazit zdárně vyvíjí. Přesný mechanismus interakce kompatibilní motolice s vnitřním obranným systémem plže není znám. Za kompatibilitu motolice mohou být zodpovědné muciny, které jsou sekretované miracidii a které se mezi jednotlivými kmeny motolice *S. mansoni* velmi lišily (Roger a kol. 2008). Obranný systém plže motolici z části zřejmě nepozná a z části je vlivem motolice utlumen, a nedokáže tak adekvátně reagovat (Bayne a Yoshino 1989). Motolice jsou schopné u hemocytů kompatibilních plžů snížit ve svůj prospěch produkci ROS (Gorbushin a Iakovleva 2008) nebo schopnost fagocytovat (Iakovleva a kol. 2006). Tlumení aktivit hemocytů probíhá pravděpodobně už na úrovni signalizace v buňce (Walker 2006).

5.1 Počet hemocytů

Počet hemocytů u dospělého plže *R. lagotis* se liší mezi jednotlivými jedinci, v průměru jich mají 256 000/ml hemolymfy. Blízce příbuzný, avšak několikanásobně větší druh *L. stagnalis* jich má skoro 5× tolik ($1,2 \times 10^6$ /ml) než *R. lagotis* (Adema a kol. 1991b). Na základě naší provedené korelační analýzy nezávisí počet hemocytů na 1 ml hemolymfy plže *R. lagotis* na jeho stáří (velikosti ulity). U dospělých a juvenilních plžů *B. glabrata* byl naměřen také stejný počet hemocytů na 1 ml hemolymfy. Větší celkový počet kolujících hemocytů je tak dán spíše větším objemem hemolymfy (DeGaffé a Loker 1998). Na druhou stranu

počet hemocytů mlže *R. decussatus* pozitivně koreloval s délkou lastury (Flye-Sainte-Marie a kol. 2009).

Počet hemocytů naměřený u jednotlivých plžů *R. lagotis* se lišil. Naměřená variabilita může být částečně způsobena sezónními vlivy. Kolísáním počtu hemocytů závisí na ročním období a aktivitě gonád (Gorbushin a Iakovleva 2006). Počet hemocytů plžů *R. lagotis* byl měřen v průběhu období duben–říjen. Vzhledem k tomu, že plži jsou chováni v akváriích ve stálých podmínkách, je vliv ročního období zřejmě omezen oproti plžům žijícím ve volné přírodě. I tak však během léta dochází k častějšímu kladení vajíček než v zimním období (V. Skála, PřFUK, ústní sdělení), a takové fyziologické změny mohou mít za následek změnu množství kolujících hemocytů. Dalším možným vysvětlením variability v počtu hemocytů mezi jedinci je nepřesnost použité metody počítání hemocytů. Hemolymfa odebraná z plže musela být ředěna v SSS⁻/EDTA, aby se minimalizovalo shlukování hemocytů. I tak ke shlukům občas docházelo. K shlukování hemocytů totiž dochází i procesem nezávislým na vápenatých a hořečnatých iontech (Chen a Bayne 1995).

Množství cirkulujících hemocytů závisí také na přítomnosti nákazy. Během nákazy motolicí *H. elongata*, *E. paraensei* a *E. liei* dochází dlouhodobě k nárůstu počtu kolujících hemocytů (Gorbushin a Iakovleva 2008; Mounkassa a Jourdane 1990; Loker a kol. 1987). Zajímavý je pokles v počtu hemocytů zaznamenaný hodiny po nákaze plže. Hemocyty zřejmě putují do tkáně zneškodnit patogena, a dochází tak k přechodnému poklesu v počtu kolujících hemocytů (Allegretti a kol. 2009). Pokles v počtu kolujících hemocytů byl zaznamenan i řádově týdny po infekci, a to po začátku vylučování cercárií. Důvodem tohoto poklesu byl asi přesun hemocytů do tkáně, aby opravily škody vzniklé únikem cercárií (Mounkassa a Jourdane 1990).

Počet hemocytů plžů *R. lagotis* nakažených *T. regenti* byl určován v patentní periodě (tj. asi 7 týdnů po infekci). Nakažení plži měli v průměru asi 1,8× více hemocytů než plži zdraví. Přestože plži během tohoto období vylučují cercárie, měli více kolujících hemocytů než zdraví jedinci. Buď tedy jen zanedbatelné množství hemocytů odchází opravovat poškozenou tkáň nebo je jejich odchod kompenzován dostatečnou tvorbou buněk *de novo*. Podobný nárůst v počtu hemocytů v patentní periodě (1,75×) byl pozorován také u plžů *L. littorea* nakažených motolicí *H. elongata* (Gorbushin a Iakovleva 2008).

Současně se změnou počtu kolujících hemocytů byla pozorována i kvalitativní změna

hemocytů, např. při nákaze prvokem *B. ostrae* (Cochennec-Laureau a kol. 2003) nebo motolicí *H. elongata* (Gorbushin a Iakovleva 2008) se v hemolymfě nacházelo daleko víc nezralých agranulárních buněk. Granularita hemocytů zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti* nebyla testována. Hemocyty z nakažených plžů měly však menší tendenci se shlukovat. Je možné, že se v hemolymfě nakažených plžů nevyskytuje nějaký humorální faktor za shlukování zodpovědný nebo hemocyty nemají na povrchu dostatečné množství receptorů nutných pro adhezi, což může naznačovat jistou míru nezralosti nebo suprese. Zdá se tedy, že nákaza kompatibilní motolicí způsobí dlouhodobě nárůst v počtu kolujících hemocytů hostitelského plže. Nově vzniklé hemocyty budou zřejmě nezralé nebo inhibované, a tudíž nebudou schopné motolici zničit.

5.2 Produkce kyslíkových radikálů

Různí autoři uvádějí, že různé látky jsou pro stimulaci produkce ROS nebo NO hemocytů jednoho druhu plže nebo mlže různě efektivní, některé nemají vůbec žádný účinek (Arumugam a kol. 2000; Wright a kol. 2006). Jeden a ten samý stimulant může u jednoho druhu stimulovat např. jen produkci ROS, ale už ne produkci NO (López a kol. 1994). K podobným závěrům (viz dále) jsme došli i u stimulantů produkce ROS a NO u plovatkovitých plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis*.

Produkce H_2O_2 hemocyty plovatek *L. stagnalis* byla sledována po inkubaci se zymosanem, PMA a laminarinem. Je známo, že PMA má vliv na produkci H_2O_2 u hemocytů plže *B. glabrata* (Humphries a Yoshino 2008) a laminarin a zymosan u hemocytů *L. stagnalis* (Lacchini a kol. 2006; Zelck a kol. 2005). Laminarin ani PMA však v našich pokusech s hemocyty *L. stagnalis* neměly efekt. Pouze zymosan byl schopný zvýšit produkci H_2O_2 , a to úměrně jeho koncentraci. Při nejvyšší použité koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vzrostlo po 30 min množství H_2O_2 3,5 \times oproti buňkám bez stimulace.

Hemocyty plovatky *R. lagotis* byly exponovány stejným chemickým stimulům jako hemocyty plovatky *L. stagnalis*, jejich efekt na produkci H_2O_2 se však lišil. Tentokrát byl bez efektu nejen laminarin, ale i zymosan. Naopak PMA produkci H_2O_2 významně zvýšil. Při použití 10 μM PMA narostla produkce H_2O_2 po 30 min 2,7 \times oproti bazální produkci.

U plže *B. glabrata* narostla produkce H_2O_2 stimulovaná 0,5 μM PMA po 2 h asi 2 \times (Humphries a Yoshino 2008). Protože PMA aktivuje přímo PKC a u plovatek *L. stagnalis*

je produkce H_2O_2 regulovaná pomocí PKC (Lacchini a kol. 2006), bude produkce H_2O_2 hemocyty *R. lagotis* také zřejmě alespoň částečně regulovaná přes PKC.

Podle našich výsledků existuje variabilita nejen ve schopnosti jednoho druhu plže reagovat na různé stimuly, ale i v odpovědi různých druhů plžů na jeden stimul.

5.3 Produkce oxidu dusnatého

Jako jediný efektivní stimulant pro produkci NO se u hemocytů *L. stagnalis* osvědčil PMA ($2\mu M$), jehož působením narostla po 60 min produkce NO $1,72\times$ oproti bazální produkci. K jiným výsledkům došli u hemocytů *L. stagnalis* v jiné laboratoři. Stimulace hemocytů PMA zde způsobila 8-násobný nárůst oproti bazální produkci (Wright a kol. 2006) (téměř $3\times$ víc než v našich pokusech). Z toho vyplývá, že schopnost různě intenzivně odpovídat na různé stimuly se liší nejen mezi jednotlivými druhy, ale zřejmě i mezi populacemi v rámci jednoho druhu. Jedním z faktorů, který by mohl vysvětlit odlišné výsledky, je vliv okolních (abiotických i biotických) podmínek na plže (diskutováno níže).

Zyosan neměl vliv na produkci NO hemocyty *L. stagnalis*. V dříve publikovaných výsledcích však zyosan ($10\mu g/ml$) měl stimulační efekt na produkci NO hemocyty *L. stagnalis*. Po 60 min způsobil u hemocytů *L. stagnalis* zvýšení produkce NO $2,2\times$ oproti bazální produkci (Wright a kol. 2006). Stimulace hemocytů laminarinem ($10 mg/ml$) způsobila po 60 min nárůst produkce NO $4\times$ oproti bazální produkci (Wright a kol. 2006). V našich pokusech nebyla tato stimulace možná, protože fluorescenční sonda pro detekci NO (DAF-FM diacetát) interagovala s laminarinem za tvorby fluorescenčního produktu i bez přítomnosti NO. Vzhledem k tomu, že Wright a kol. (2006) používali identické chemikálie od stejné společnosti (DAF-FM diacetát – Invitrogen, laminarin – Sigma), může být námi pozorovaná interakce chemikálií způsobená různými výrobními šaržemi produktů nebo nějakou interferující příměsí.

U hemocytů plže *R. lagotis* nebyl objeven žádný funkční stimulant produkce NO. Vyzkoušeny byly jak chemicky definované látky jako PMA, zyosan, laminarin, LPS, tak i usmrcené bakterie a kvasinky. Hemocyty plže *V. ater* lze k produkci NO stimulovat LPS (Conte a Ottaviani 1995), stejný efekt LPS však nebyl pozorován u plovatky *L. stagnalis* (Wright a kol. 2006), která je plži *R. lagotis* fylogeneticky příbuznější. To, že se hemocyty *R. lagotis* nepodařilo stimulovat k produkci NO, může být způsobeno více fak-

tory. Je možné, že hemocyty už byly maximálně stimulované, takže žádný další stimulant už nemohl produkci NO zvýšit. Hemocyty *R. lagotis* jsou mnohem menší a náchylnější k poškození než hemocyty *L. stagnalis*, a je proto nutné s nimi pracovat mnohem opatrněji. Je proto možné, že už samotnou manipulací (vypuzením a odsáním hemolymfy, adheencí na dno destičky, promýváním pufrem) došlo k jejich maximální stimulaci nebo poškození. V jiných studiích způsobila manipulace s hemocyty během experimentu zvýšenou bazální fosforylaci ERK hemocytů plže *L. stagnalis* (Plows a kol. 2004; Wright a kol. 2006) a zvýšenou bazální produkci ROS hemocyty plže *L. littorea* (Gorbushin a Iakovleva 2007).

Abychom zjistili, zda jsou hemocyty ve stimulovaném stavu i bez použití stimulantu, vyzkoušeli jsme vliv inhibitoru PKC na bazální produkci NO. Aktivací PKC dochází v buňce ke spouštění řady důležitých dějů, mj. i k zahájení produkce NO po stimulaci. Při bazální produkci NO není PKC aktivovaná (Wright a kol. 2006). Pokud tedy dojde ke snížení bazální produkce NO vlivem inhibitoru PKC, jsou hemocyty stimulované už samotnou manipulací s nimi, a nejde tak o pravou bazální produkci. Inhibitor však neměl na bazální produkci významný vliv, protože bazální produkce NO s inhibitorem byla stejně vysoká jako bez inhibitoru. Signální dráha zahrnující PKC tedy zřejmě nebyla po manipulaci s hemocyty aktivovaná.

Další možností, proč se stimulační vlastnosti námi použitých látek na produkci NO hemocyty *L. stagnalis* lišily od výsledků jiné laboratoře (Wright a kol. 2006), je čistota prostředí, ve kterém jsou plži chováni (A. J. Walker, Kingston University London, ústní sdělení). Akvária našich plžů jsou čištěna nepravidelně (min. jednou měsíčně), na dně zůstávají ulity mrtvých plžů i samotní mrtví plži. V jiné studii bylo pozorováno, že hemocyty plžů vystavených kontaminovanému prostředí měly zvýšenou bazální produkci ROS, fagocytózu latexových částic i počet kolujících hemocytů (Gust a kol. 2013). Naše chovy plžů jsou napadené kroužkovcem *Chaetogaster* sp. (Oligochaeta). Ten se vyskytuje hlavně u plžů nakažených motolicemi, ale v menší míře je i u zdravých plžů. Bylo tedy možné, že v našem případě už samotný pobyt v kontaminovaném prostředí způsobil maximální stimulaci. Vzhledem k tomu, že inhibitor PKC nebyl schopen inhibovat bazální produkci NO hemocytů *R. lagotis*, hemocyty *R. lagotis* zřejmě nebyly manipulací a pobytem v kontaminovaném prostředí významně stimulovány.

Pro porovnání jsme testovali vliv čistoty prostředí na bazální i stimulovanou produkci

NO, a to u obou plovatkovitých plžů. Produkce NO byla měřena 1× týdně (*L. stagnalis*) a 1× za 14 dní (*R. lagotis*). Bazální produkce NO hemocytů plžů *L. stagnalis* chovaných v čistém prostředí narostla po 60 min 2,81×, zatímco u plžů z nečištěných akvárií jen 1,64×. V jiné studii byly získány zcela opačné výsledky. Bazální produkce ROS hemocytů plžů z kontaminovaného prostředí byla výrazně vyšší než u plžů z čistého prostředí (Gust a kol. 2013). Je možné, že častá výměna vody a manipulace s našimi plži (odběr hemolymfy 1× za týden) byly pro hemocyty větším stresem než samotné prostředí nečištěného akvária.

Hemocyty plovatek *R. lagotis* chovaných v čistém prostředí se podařilo stimulovat k produkci NO (na rozdíl od plžů z akvárií čistěných měsíčně). Hemocyty produkovaly po stimulaci 10μM PMA 1,29× víc NO než nestimulované hemocyty. Bazální produkce NO hemocytů plžů z nečištěných akvárií byla (stejně jako v případě plže *L. stagnalis*) vyšší než u plžů z čistého prostředí, rozdíl však není signifikantní. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo stimulovat produkci NO u hemocytů plžů *R. lagotis* z nečištěných akvárií, a u hemocytů plžů z čistého prostředí ano, má čistota prostředí vliv na schopnost produkovat NO. Efekt však není výrazný a na neschopnosti hemocytů *R. lagotis* produkovat NO se budou zcela jistě podílet i další faktory.

Schopnost produkovat NO pravděpodobně závisí i na jiných abiotických faktorech než čistota prostředí. Vysoká teplota nebo nedostatek kyslíku snižuje produkci ROS (Mosca a kol. 2013). Vliv budou mít i biotické faktory, v našem případě zřejmě hlavně už zmíněný *Chaetogaster* sp. Výsledek stimulace závisí také na délce měření, protože některé stimulanty mohou mít efekt až hodiny po stimulaci, některé mají efekt už během desítek minut (PMA během 60 min (Wright a kol. 2006), IL-2 až po 24 h (Novas a kol. 2004)).

Dalším důvodem, proč nelze hemocyty stimulovat k produkci NO, může být vyčerpání zásob prekurzoru NO (L-argininu) nebo nedostatečná aktivita enzymu NOS (Zhu a kol. 2012). To by vysvětlovalo, proč hemocyty plže *R. lagotis* byly schopné po stimulaci produkovat H₂O₂ ale už ne NO. Nevysvětluje to však už přítomnost bazální produkce NO.

Hemocyty plže *L. stagnalis* byly vystaveny i parazitárním komponentám, konkrétně homogenátu cercárií *T. regenti* a *T. szidati*, a hemocyty plže *R. lagotis* homogenátu cercárií *T. regenti*. Nákaza motolicí snižuje schopnost hemocytů produkovat ROS (Gorbushin a Iakovleva 2008). Mohou za to pravděpodobně aktivní látky v jejich ESP (Connors a Yoshino 1990), které budou zřejmě ovlivňovat buněčnou signalizaci hemo-

cytů a následnou imunitní odpověď plže (Walker 2006). Expozicí hemocytů homogenátu cercárií by proto v kompatibilní variantě mohlo dojít ke snížení produkce radikálů (motolice obsahuje látky, které inhibují imunitní odpověď, aby přežila), zatímco v nekompatibilní variantě by mělo dojít naopak ke stimulaci (plž se infekci ubrání). Ve všech testovaných kombinacích (homogenát cercárií *T. regenti* s hemocyty *L. stagnalis* a *R. lagotis*, a homogenát cercárií *T. szidati* s hemocyty *L. stagnalis*) však byla pozorovaná jen nesignifikantní inhibice produkce NO. V homogenátu se vyskytují díky obsahu penetračních žláz cysteinové peptidázy (Mikeš a kol. 2005), které mohly inhibovat signální dráhy. Homogenát byl proto připraven s inhibitory peptidáz, avšak inhibitory interferovaly s fluorescenční sondou. Nesignifikantní inhibice produkce NO hemocyty *R. lagotis* a *L. stagnalis* po expozici homogenátu cercárií tedy nebyla způsobena schopností motolice inhibovat imunitní odpověď. Homogenát cercárií není zcela vhodný materiál pro testování imunosuprese, protože plž se běžně setkává pouze s povrchovými strukturami cercárií a homogenát obsahuje i jejich vnitřní obsah. Vhodnějším materiálem by byly např. ciliární destičky miracidíí.

Schopnost motolic tlumit imunitní odpověď byla testována i porovnáním bazální produkce NO u zdravých plžů *R. lagotis* a plžů nakažených *T. regenti*. Pokus byl proveden nejprve za použití stejného objemu hemolymfy (200 μ l). Rozdíl mezi produkcí NO hemocytů zdravých a nakažených plžů měl však zcela opačný trend, než jsme očekávali. Hemocyty nakažených plžů produkovaly na 200 μ l hemolymfy 1,07 \times více NO než hemocyty plžů zdravých (i když nesignifikantně). Vzhledem k tomu, že nakažení plži měli asi 1,8 \times více hemocytů než plži zdraví, byla produkce NO změřena i na 100 000 hemocytů. Produkce NO byla takto přepočtena za předpokladu, že 100 hemocytů vyprodukuje 100 \times víc NO než jeden hemocyt. Případné interakce mezi hemocyty se tudíž nebraly v potaz. Po přepočtu produkovaly hemocyty zdravých plžů po 60 min asi 1,6 \times více NO než hemocyty nakažených plžů. Zdá se, že jednotlivé hemocyty nakažených plžů produkovaly méně NO, vnitřní obranný systém plže však toto oslabení kompenzoval nárůstem počtu kolujících hemocytů. Ve výsledku bylo tak v celé hemolymfě nakaženého plže produkováno více NO než u zdravého plže (viz výše měření na objem). To by odpovídalo i pozorování, kdy hemocyty *L. stagnalis* při nákaze *T. szidati* neprodukovaly na objem hemolymfy méně superoxidu oproti hemocytům ze zdravých jedinců (Dikkeboom a kol. 1988). Snížení bazální produkce NO asi na polovinu bylo naopak pozorováno u hemocytů

mlžů *L. littorea* nakažených motolicí *H. elongata* (počítáno na objem hemolymfy, nakažení plži měli asi 1,75× více hemocytů než zdraví plži) (Gorbushin a Iakovleva 2008).

5.4 Fagocytóza

Nákaza motolicí má vliv na fagocytózu hemocytů mezihostitelských plžů. Snížená schopnost fagocytovat byla pozorována u plže *L. stagnalis* nakaženého motolicí *T. szidati* (Núněz a kol. 1994), plže *L. littorea* nakaženého motolicí *H. elongata* (Iakovleva a kol. 2006) a plže *B. glabrata* nakaženého motolicí *E. paraensei* (Noda a Loker 1989). Tato inhibice byla pozorována dny až týdny po nákaze. V krátkodobém časovém horizontu (hodiny po nákaze) bylo pozorováno přechodně i zvýšení fagocytózy hemocytů nakažených plžů (Amen a kol. 1992; Noda a Loker 1989). Tato zvýšená aktivita byla zřejmě namířena proti ciliárním destičkám miracidí (Amen a kol. 1992).

Fagocytóza hemocytů plžů *R. lagotis* nakažených motolicí *T. regenti* byla hodnocena v patentní periodě (asi 7 týdnů po infekci). Hemocyty ochotně pohlcovaly myší a králičí erythrocyty, kvasinky a bakterie značené FITC a bakterie značené pHrodo.

Použití buněk značených FITC bylo problematické. Aby bylo možné odečítat fagocytózu, bylo nutné odmyt nepohlčené buňky nebo bylo potřeba zhasnout jejich fluorescenční signál. Odmytí se muselo provádět velmi opatrně, protože hemocyty, které již fagocytovaly, měly nižší schopnost adherence, a mohlo tedy lehce dojít k jejich ztrátě. Proto byla zvolena cesta zhasínání extracelulární fluorescence pomocí trypanové modři. Zhasínání jak laboratorně, tak i komerčně FITC-značených buněk bylo problematické. Nepodařila se totiž nalézt taková kombinace koncentrace trypanové modři a doby barvení, aby bylo možné spolehlivě odlišit pohlčenou částici od nepohlčené a trypanová modř nebyla pro hemocyty toxická. V jiné práci stačila koncentrace trypanové modři 5 mg/ml po dobu 15 min (Horák a Deme 1998), avšak v našem případě ani nasycený roztok (10 mg/ml) trypanové modři nedokázal za 20 min částice efektivně zhasnout. Tato kombinace je však extrémní vzhledem k tomu, že trypanová modř byla v této koncentraci pro hemocyty toxická. To, že se nám částice nepodařilo zhasnout, mohlo být např. způsobeno větší afinitou fluoresceinu ke značeným částicím. K odlišení pohlčených částic od nepohlčených lze použít i jiná zhasedla. Například ethidium bromid mění při ozáření UV světlem zelenou fluorescenci FITC na oranžovou (Drevets a Campbell 1991), ale vzhledem k jeho

toxicitě nebyl testován.

Bakterie *E. coli* značené pHrodo jsou výhodné v tom, že se pHrodo rozsvítí až v kyselém pH, to znamená až v lysosomu, a odpadá tak problém se zhasínáním nepohlcených bakterií. Fagocytóza hemocytů plžů *R. lagotis* nakažených motolicí *T. regenti* hodnocená na stejný objem hemolymfy (200 μ l) byla nižší než aktivita hemocytů zdravých plžů. Rozdíl však nebyl statisticky významný. Vzhledem k různému počtu hemocytů u zdravých a nakažených plžů byla hodnocena zároveň také fagocytóza přepočítaná na 100 000 hemocytů. Opět jsme předpokládali, že mezi hemocyty nejsou žádné interakce a 100 hemocytů pohltí 100 \times víc částic než 1 hemocyt. Hemocyty nakažených plžů měly pak schopnost fagocytovat asi 2 \times nižší než hemocyty zdravých plžů. Zdá se tedy, že stejně jako v případě produkce NO měli nakažení plži inhibovanou fagocytózu. Tento deficit byl zřejmě opět kompenzován nárůstem počtu kolujících hemocytů.

Snížení fagocytózy hemocytů plžů s min. 7 týdnů starou infekcí souhlasí s výsledky experimentů na jiných modelových organismech (viz výše). Přechodné zvýšení fagocytózy hodiny po nákaze (Amen a kol. 1992; Noda a Loker 1989) nemohlo být v našich experimentech zachyceno.

Předpokládá se, že inhibice obranných funkcí hemocytů je způsobena inhibicí kináz zodpovědných za spouštění obranných reakcí proti patogenům (Walker 2006). Sporocysty a ESP *S. mansoni* např. dokážou inhibovat ERK kinázu hemocytů mezihostitelského plže *B. glabrata* (Zahoor a kol. 2008). Regulace fagocytózy pomocí ERK kinázy byla potvrzena i u hemocytů plže *L. stagnalis* (Plows a kol. 2004). Testován byl proto vliv ERK inhibitoru na fagocytózu hemocytů plže *R. lagotis*. Efekt inhibitoru byl závislý na jeho koncentraci, při 10 μ M koncentraci byla fagocytóza snížena o 43 %. Fagocytóza je tedy u hemocytů plže *R. lagotis* alespoň částečně řízena ERK kinázou. Je-li fagocytóza hemocytů *R. lagotis* regulována pomocí ERK kinázy a má-li zároveň motolice *T. regenti* inhibiční vliv na ERK kinázu, je pak tato motolice schopna zásahem do signálních drah aktivně snižovat schopnost hemocytů *R. lagotis* fagocytovat. Pro potvrzení této hypotézy je třeba ještě dodat důkaz o nižší aktivitě ERK kinázy u hemocytů plžů nakažených *T. regenti*.

5.5 Tvorba panožek a adheze hemocytů k povrchu

Nákaza plžů motolicí má vliv na morfologii jejich hemocytů. Hemocyty plže *B. glabrata* mají tendenci se zakulacovat při nákaze motolicí *E. paraensei* (Adema a kol. 1994a). Stejný efekt mají sporocysty této motolice i na nekompatibilní hostitele z čeledi Lymnaeidae, avšak efekt už není patrný u fylogeneticky vzdáleného plže *H. aspersa* (Sapp a Loker 2000a). Také v případě testování samotných ESP kompatibilních motolic docházelo k zakulacování hemocytů a snižování adherence hemocytů zdravých plžů k povrchu (DeGaffé a Loker 1998; Loker a kol. 1992).

Hemocyty plže *R. lagotis* měly vlivem nákazy kompatibilní motolicí *T. regenti* změněnou svoji morfologii. Obvod i plocha hemocytů byly zmenšené v průměru o 15,3 % (shodné číslo je dílem náhody, dílčí průměry jednotlivých pokusů se liší). Cirkularita buněk (kulatost; čím nižší hodnota, tím více má buňka panožek) byla u hemocytů z nakažených plžů zvýšená o 23,2 %. Hemocyty z nakažených plžů zaujímaly tedy v průměru menší plochu a tvořily méně panožek než hemocyty ze zdravých plžů, a měly tak snížený spreading. Neplatí to však obecně o celé populaci hemocytů. Spíše u nakažených plžů se vyskytovalo více malých zakulacenějších buněk s krátkými panožkami, které se u zdravých plžů také vyskytovaly, ale mnohem méně často.

5.6 Enkapsulace larev motolice

Schopnost adherovat na povrch a tvořit panožky úzce souvisí se schopností enkapsulovat. V případě, že je plž vůči nákaze rezistentní, nedochází ke změně morfologie hemocytů, a ty jsou tím pádem schopné adekvátně reagovat na patogena. Hemocyty plže *B. glabrata* rezistentního k nákaze *S. mansoni* dokážou enkapsulovat larvy této motolice (Harris 1970). Během prvních pár hodin po nákaze hemocyty kontaktovaly larvu a začaly pohlcovat tegument sporocyst, po 48 h byly v okolí destruované sporocysty pozorovány hemocyty plné fagosomů a 4 dny po infekci již nebylo možné sporocysty rozeznat (Loker a kol. 1982). V případě nákazy kompatibilní motolicí hemocyty nejprve kontaktovaly larvu, ale vlivem parazita se následně zakulacovaly, a nebyly tak schopné larvu enkapsulovat (Adema a kol. 1994a).

Schopnost hemocytů *L. stagnalis* enkapsulovat miracidia a sporocysty *T. regenti* byla pozorována *in vitro* během 7 h. Přestože *L. stagnalis* je pro *T. regenti* nekompatibilním

hostitelem, larvy *T. regenti* nejevily během inkubace žádné známky poškození. Hemocyty sice tvořily shluky, ve kterých byly nalézány larvy, ale zachycení v těchto shlucích se zdálo být náhodné. Larvy během času snižovaly svoji pohybovou aktivitu (zřejmě docházely energetické zásoby), ale jinak nedocházelo k žádnému poškození (např. destrukci povrchu).

Během inkubace byly Petriho misky s hemocyty mírně kývány, aby měly hemocyty větší pravděpodobnost kontaktu s larvou. Je možné, že pohyb Petriho misky fungoval spíše jako rušivý podnět, díky kterému hemocyty k larvě nedokázaly adherovat. Inkubace probíhala na parafilmu nebo na 1% agaru (Sapp a Loker 2000a). Povrch agaru se ukázal být vhodnější, protože na něj hemocyty neadherovaly ani po hodinách inkubace. Docházelo ale k adhezi hemocytů k sobě navzájem. Částečně jsme zabránili shlukování hemocytů tím, že byl kladen důraz na co nejčistší odběr hemolymfy (sliz odebraný s hemolymfou při inkubaci vytvářel sítě, do kterých se hemocyty zachytávaly a shlukovaly). Shlukování hemocytů se nám však nepodařilo nikdy úplně zabránit, a díky tomu jsme možná nepozorovali enkapsulaci larev.

Enkapsulace nebyla pozorována ani v případě inkubace hemocytů *H. aspersa* se sporocystami *E. paraensei* (Adema a kol. 1994a). Hemocyty různých druhů plžů (*B. glabrata*, *L. stagnalis*, *S. elodes*, *H. aspersa*) neadherovaly k povrchu redií *E. paraensei*, na druhou stranu adherovaly k povrchu sporocyst *S. mansoni*, *Schistosomatium douthitti* a *Echinostoma trivolvis*, a to nezávisle na vzájemné kompatibilitě. Ke sporocystám *E. paraensei* adherovaly hemocyty v porovnání se sporocystami jiných druhů jen omezeně (Sapp a Loker 2000a). Larvy různých druhů motolic jsou tak zřejmě pro hemocyty různě atraktivní.

Jiným důvodem, proč jsme enkapsulaci nekompatibilních larev nepozorovali, může být to, že hemocyty nejsou obecně schopné sporocysty rozeznat. Jediná efektivní obrana vůči motolicím může být pouze na úplném začátku infekce. K první vlně obrany může u některých plžů docházet ihned po penetraci miracidia do plže. Hemocyty v takových případech rozpoznají ciliární destičky jako cizí materiál, a larvu zničí. Ciliární destičky byly pozorovány ve fagosomech hemocytů (Loker a kol. 1982). Pro stadium sporocysty už hemocyt nemusí mít efektivní obrannou reakci, a nedokáže ji tedy zničit. Pozorována však byla i druhá vlna obrany vůči motolici, a to při průniku vzniklých sporocyst do dalších orgánů plže. Ve vylučovacích a rozmnožovacích orgánech plžů *B. glabrata* infikovaných *S. mansoni* byla v době, kdy měli vylučovat cercárie, pozorována místa se zbytky sporocyst obklopených hemocyty. Imunitní systém zničil sporocysty, plž tudíž nevylučoval

v době patentní periody cercárie (de Souza a kol. 1997).

5.7 Toxicita plazmy plžů pro larvy motolic

Kompatibilita plž–motolice závisí nejen na buněčné obraně, ale také na humorálních faktorech obsažených v hemolymfě. Hemolymfa obsahuje řadu látek, mezi nimi lektiny, bakteriostatické a baktericidní látky (Adema a kol. 1991a). Plazma plžů *B. glabrata* rezistentních k nákaze *S. mansoni* obsahovala více cytokinu IL-1 β než plazma vnímavých plžů. Tento cytokin se podílel na jejich rezistenci (Granath a kol. 2001), a to zvýšením fagocytózy a produkce superoxidu hemocyty (Connors a kol. 1995). V plazmě byl objeven i protein s cytotoxickou aktivitou, který perforací membrány zabíjí specificky pouze eukaryotické buňky (Hubert a kol. 1997). Plazma může být toxická nejen z důvodu přítomnosti cytolytických proteinů, ale i díky nevhodnému pH, osmolalitě, teplotě nebo množství kyslíku (Sapp a Loker 2000b).

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo pozorovat enkapsulaci larev hemocyty nekompatibilního plže, byla testována toxicita samotné plazmy *L. stagnalis* k miracidii *T. regenti*. Životaschopnost larev byla sledována během 10,5 h inkubace. Miracidia postupně snižovala svoji pohybovou aktivitu a hynula. U některých bylo pozorováno poškození povrchového epitelu. Životaschopnost larev závisela na koncentraci plazmy. Počet přeživších miracidii ve 100% plazmě ale nebyl vůči počtu přeživších larev v SSS signifikantně nižší. Statisticky významný byl pouze trend závislosti životaschopnosti miracidii na koncentraci plazmy, což bylo způsobeno velkým rozptylem v počtech přeživších miracidii. V některých pokusech jich po 10,5 h přežila většina (ve 100% plazmě o něco méně než v kontrolním pufru), zatímco při opakování jich uhynula velká část jak v plazmě, tak i v kontrolním pufru (v pufru ale méně). Různá životaschopnost miracidii mohla být způsobena různými faktory v průběhu nákazy kachny a následné transformace miracidii na sporocysty, např. různě dlouhou stimulací miracidii světlem při jejich sběru, která mohla způsobit odlišné vyčerpání jejich energetických zásob.

V jiné studii byla plazma toxická pro larvy jen v méně než polovině nekompatibilních kombinací plž–motolice. Čím byl plž fylogeneticky bližší kompatibilnímu hostiteli, tím byla nižší toxicita jeho plazmy (Sapp a Loker 2000b). Naše modelové organismy *L. stag-*

nalis a *R. lagotis* jsou fylogeneticky velmi blízké (čeleď Lymnaeidae), a díky tomu nebyla plazma *L. stagnalis* pro larvy vyvíjející se normálně v plži *R. lagotis* příliš toxická. V jiné studii se toxicita plazmy nekompatibilních plžů projevovала nejen poškozením povrchového epitelu (pozorovaném i v našem případě), ale i ztrátou normálního tvaru těla larvy (tělo získalo sférický tvar) (Sapp a Loker 2000b). Míra poškození závisela na koncentraci plazmy. Závislost toxicity plazmy plže pro larvy motolice na její koncentraci byla pozorována nejen ve dvojici *Mytilus edulis*–*H. elongata* (Gorbushin a Levakin 2005), ale i v naší modelové dvojici *L. stagnalis*–*T. regenti*.

5.8 Infekce na histologických preparátech

Jedním z původních cílů bylo i sledovat průběh infekce nekompatibilní motolicí na histologických řezech plžem. Nejprve byla testována efektivita penetrace miracidíí do nekompatibilních plžů. Asi 80 % miracidíí *T. regenti* penetrovalo do plže *L. stagnalis*, zatímco jen kolem 35 % miracidíí *T. szidati* penetrovalo do plže *R. lagotis*. Efektivita penetrace byla testována jen orientačně, a pro jednoznačné závěry by bylo třeba pokus opakovat. Zdá se však, že miracidia *T. regenti* penetrují do nekompatibilního plže mnohem ochotněji než miracidia *T. szidati*.

V jiných studiích bylo zjištěno, že miracidia různých druhů motolic penetrují do různých druhů plžů také s odlišnou ochotou. Plži byli exponováni miracidíím vždy jednoho druhu motolice a v sérii pokusů byla testována efektivita penetrace v kompatibilních i nekompatibilních kombinacích. V některých případech penetrovalo víc miracidíí do nekompatibilního plže než do kompatibilního. Pokud nemá miracidium možnost penetrovat do kompatibilního plže, penetruje v mnoha případech ochotně i do nekompatibilních plžů (Sapp a Loker 2000b).

Vzhledem k tomu, že efektivita penetrace miracidíí *T. szidati* do plže *R. lagotis* se pohybovala kolem 35 %, byli plži určeni pro histologické zpracování inkubováni s vysokým počtem miracidíí. Při udržování laboratorního cyklu *T. regenti* v naší laboratoři se pro nákazu jednoho plže *R. lagotis* používají asi 3 miracidia. V infekcích plžů *R. lagotis* určených pro histologické zpracování bylo pro zvýšení záchyty penetrujících miracidíí na histologických řezech použito asi 40 miracidíí *T. szidati* na plže. Po 2 h inkubace s miracidíí byl plž postoupen histologickému zpracování. Na histologických řezech však nebyla na-

lezena žádná sporocysta. Důvodů může být více. Nemůžeme si být např. jisti úspěšností penetrace. Miracidium mohlo zůstat v povrchovém slizu plže a to, které penetrovalo, mohlo okamžitě uhynout těsně pod jeho epitelem.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala charakterizací vybraných aktivit hemocytů plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis*. Tito plži slouží jako specifictí meziphostitelé pro motolice *T. regenti*, resp. *T. szidati*, a proto byl také zjišťován vliv nákazy (v patentní periodě) na aktivity hemocytů. Nejzajímavější výsledky jsou shrnuty v následujících bodech.

- Hemocyty plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis* vystavené různým látkám produkují v reakci na ně různé množství H_2O_2 a NO. Hemocyty plže *L. stagnalis* byly stimulovány k produkci H_2O_2 zymosanem, naopak hemocyty plže *R. lagotis* pomocí PMA. Hemocyty plže *L. stagnalis* se podařilo stimulovat k produkci NO pomocí PMA, zatímco hemocyty plže *R. lagotis* se stimulovat k produkci NO nepodařilo.
- Čistota prostředí měla zásadní vliv na produkci NO hemocyty. Bazální produkce NO hemocyty plžů *L. stagnalis* chovaných v 1× týdně čištěných akváriích byla asi 1,75× vyšší než u hemocytů plžů chovaných v 1× měsíčně čištěných akváriích. Hemocyty plžů *R. lagotis* chovaných v 1× týdně čištěných akváriích se podařilo stimulovat k produkci NO pomocí PMA, zatímco hemocyty plžů z měsíčně čištěných akváriích se stimulovat k produkci NO nepodařilo (viz výše). Produkce NO narostla po stimulaci PMA 1,18× oproti bazální produkci. Čistota prostředí měla vliv i na počet hemocytů. Plži *R. lagotis* z 1× týdně čištěných akvárií měli asi 1,5× více hemocytů než plži z 1× měsíčně čištěných akvárií.
- Plži *R. lagotis* nakažení motolicí *T. regenti* měli oproti zdravým plžům stimulovanou produkci hemocytů. Nakažení plži měli v průměru 1,8× více hemocytů než plži zdraví.
- Většina aktivit hemocytů plže *R. lagotis* byla však vlivem nákazy *T. regenti* snížena.
 - Bazální produkce NO hemocytů nakažených plžů byla po 60 min 1,07× vyšší než bazální produkce hemocytů zdravých plžů (počítáno na 200 μ l hemolymfy). Po přepočtu na stejný počet hemocytů (100 000) však byla bazální produkce hemocytů nakažených plžů po 60 min asi 1,58× nižší než u hemocytů zdravých plžů. Hemocyty nakažených plžů měly tedy sníženou schopnost produkovat NO.

Tato neschopnost hemocytů nakažených plžů byla však zřejmě kompenzována nárůstem počtu kolujících hemocytů.

- Schopnost fagocytovat bakterie byla u hemocytů nakažených plžů snížena asi na polovinu. Naše výsledky ukázaly, že fagocytóza je řízena MEK 1/2 kinázou. Inhibitor této kinázy inhiboval fagocytózu v závislosti na jeho koncentraci.
 - Hemocyty nakažených plžů měly sníženou schopnost adherovat a tvořit panožky. Vlivem nákazy měly hemocyty o 15,3 % menší obvod i plochu buňky a o 23,2 % vyšší cirkularitu než hemocyty zdravých plžů.
- Toxicita plazmy *L. stagnalis* pro miracidia nekompatibilní motolice *T. regenti* byla závislá na koncentraci použité plazmy.

Vnitřní obranný systém plže *R. lagotis* je tedy nákazou kompatibilní motolicí *T. regenti* zásadně ovlivněn. Stejně jako bylo dříve pozorováno i u jiných dvojic plž–motolice, zaznamenali jsme také my inhibici aktivit hemocytů způsobenou nákazou kompatibilní motolicí. Plž zřejmě kompenzuje nedostatečnou aktivitu jednotlivých hemocytů zvýšením jejich počtu, a tím zvyšuje celkovou imunitní odpověď. Otázkou zůstává, proč je motolice schopna se vyvíjet v plži i přes nárůst počtu hemocytů (i když méně schopných). Je možné, že inhibované hemocyty nejsou např. schopny motolici rozpoznat. Tato otázka není zdaleka jediná, na kterou zatím nebyla nalezena uspokojivá odpověď.

Použitá literatura

- Adema, C. M., van der Knaap, W. P. W., Sminia, T. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4: 201–223, 1991a.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P., Meuleman, E. A., Sminia, T. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(1-2):17–26, 1991b.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P. W., Sminia, T. NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(5):379–383, 1993.
- Adema, C. M., Arguello II, D. F., Stricker, S. A., Loker, E. S. A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. *The Journal of Parasitology*, 80(5):719–727, 1994a. URL <http://www.jstor.org/stable/3283251>.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P., Sminia, T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology*, 109(4):479–485, 1994b.
- Adema, C. M., Hertel, L. A., Miller, R. D., Loker, E. S. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16):8691–8696, 1997.
- Allegretti, S. M., Carvalho, J. F., Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M. Behaviour of albino and melanic variants of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca: Planorbidae) following infection by *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Brazilian Journal of Biology*, 69(1):217–222, 2009.
- Amen, R. I., Baggen, J. M., Bezemer, P. D., de Jong-Brink, M. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, 104(1):33–40, 1992.
- Anderson, R. S., Paynter, K. T., Bureson, E. M. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus*

- marinus*. *Biological Bulletin*, 183(3):476–481, 1992. URL <http://www.jstor.org/stable/1542024>.
- Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal of Cell Biology*, 79(7):513–519, 2000.
- Bachere, E., Hervio, D., Mialhe, E. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11(2):173–180, 1991.
- Barbosa, L., Caldeira, R. L., Carvalho, O. S., Vidigal, T. H. D. A., Jannotti-Passos, L. K., Coelho, P. M. Z. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunology*, 28(5):209–212, 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00827.x>.
- Bayne, C. J., Yoshino, T. P. Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism. *American Zoologist*, 29(2):399–407, 1989. URL <http://icb.oxfordjournals.org/content/29/2/399.abstract>.
- Bender, R. C., Broderick, E. J., Goodall, C. P., Bayne, C. J. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H₂O₂ than susceptible snails. *Journal of Parasitology*, 91(2):275–279, 2005.
- Berrier, A. L., Yamada, K. M. Cell-matrix adhesion. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3):565–573, 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21237>.
- Boissier, J., Rivera, E. R., Mone, H. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*, 89(3):429–433, 2003. URL [http://dx.doi.org/:ABOTSB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/:ABOTSB]2.0.CO;2).
- Bramble, L., Anderson, R. S. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology*, 21(4):337–348, 1997.
- Carballal, M. J., López, M. C., Azevedo, C., Villalba, A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(2):127–135, 1997a.
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 7

- (6):403–416, 1997b. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464897900942>.
- Chen, J. H., Bayne, C. J. Bivalve mollusc hemocyte behaviors: Characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *The Biological Bulletin*, 188(3):255–266, 1995. URL <http://www.biolbull.org/content/188/3/255.abstract>.
- Cheng, T. C. Bivalves. V Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F. (Ed.) *Invertebrate Blood Cells*, 1, str. 233–300. London : Academic Press, 1981.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M. G., Ballarin, L. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(8):677–693, 2000. URL <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2000.0282>.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., Langlade, A. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1):23–30, 2003.
- Connors, V. A., Yoshino, T. P. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 76(6):895–902, 1990.
- Connors, V. A., Deburon, I., Granath, W. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 80(1):139–148, 1995. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489485710168>.
- Conte, A., Ottaviani, E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters*, 365(2-3):120–124, 1995.
- Davids, B. J., Yoshino, T. P. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 22(1):39–53, 1998.
- DeGaffé, G., Loker, E. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(1):64–72, 1998. URL <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1997.4710>.

- Dikkeboom, R., van der Knaap, W. P., Meuleman, E. A., Sminia, T. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, 55(3):547–553, 1985.
- Dikkeboom, R., van der Knaap, W. P., van den Bovenkamp, W., Tijnagel, J. M., Bayne, C. J. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(3):509–520, 1988.
- Drevets, D. A., Campbell, P. A. Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *Journal of Immunological Methods*, 142(1):31–38, 1991.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goic, N., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 377(1):1–11, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098109002184>.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., Cyr, D. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 59(1-2):83–92, 2002.
- Franchini, A., Fontanili, P., Ottaviani, E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110(2):403–407, 1995. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049194001630>.
- Fryer, S. E., Bayne, C. J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 76(1):45–52, 1990.
- Gao, Y. The multiple actions of NO. *Pfugers Archiv : European journal of physiology*, 459(6):829–839, 2010. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-009-0773-9>.
- Gorbushin, A. M., Iakovleva, N. V. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1):434–438, 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.002>.
- Gorbushin, A. M., Iakovleva, N. V. Haemogram of *Littorina littorea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(5):1175–1181, 2006. URL http://journals.cambridge.org/article_S0025315406014160.

- Gorbushin, A. M., Iakovleva, N. V. Functional characterization of *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia) blood cells. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 87(3):741–746, 2007.
- Gorbushin, A. M., Iakovleva, N. V. The enigma of the haemogram "left-shift" in periwinkles infected with trematodes. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(6):745–751, 2008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.018>.
- Gorbushin, A., Levakin, I. Encystment *in vitro* of the cercariae *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41(4):428–436, 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10893-005-0079-2>.
- Gourdon, I., Guérin, M. C., Torreilles, J., Roch, P. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, 5(1):1–6, 2001. URL <http://dx.doi.org/10.1006/niox.2000.0327>.
- Granath, J. W. O., Connors, V. A., Raines, A. E. Effects of exogenous interleukin-1beta on primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* (Trematoda) incubated with plasma and hemocytes from schistosome-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Invertebrate Biology*, 120(4):365–371, 2001. URL <http://www.jstor.org/stable/3227261>.
- Granath, W. J., Yoshino, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 58(2):188–193, 1984.
- Gust, M., Fortier, M., Garric, J., Fournier, M., Gagné, F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*, 126(1):393–403, 2013. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.001>.
- Hahn, U. K., Bender, R. C., Bayne, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *Journal of Parasitology*, 87(2):292–299, 2001a. URL [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0292:KOSMSB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0292:KOSMSB]2.0.CO;2).
- Hahn, U. K., Bender, R. C., Bayne, C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 87(4):778–785, 2001b. URL [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0778:IONOIK\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0778:IONOIK]2.0.CO;2).

- Halliwell, B., Aruoma, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1-2):9–19, 1991.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9):3007–3017, 1998.
- Hanington, P. C., Forys, M. A., Loker, E. S. A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3):1–9, 2012. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001591>.
- Harris, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266(1):446–464, 1970.
- Hertel, L. A., Adema, C. M., Loker, E. S. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(4):295–303, 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X04001272>.
- Horák, P., Deme, R. Lectins and saccharides in *Lymnaea stagnalis* haemocyte recognition. *Comparative Haematology International*, 8(4):210–218, 1998. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF02752851>.
- Horák, P., van der Knaap, W. P. W. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica*, 44(1):161–172, 1997.
- Horák, P., Kolářová, L., Adema, C. M. Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology*, 52(1):155–233, 2002.
- Hubert, F., Cooper, E. L., Roch, P. Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1361(1):29–41, 1997.
- Humphries, J. E., Yoshino, T. P. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(5):554–562, 2008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.001>.
- Iakovleva, N. V., Shaposhnikova, T. G., Gorbushin, A. M. Rediae of echinostomatid and heterophyid trematodes suppress phagocytosis of haemocytes in *Littorina littorea*

- (Gastropoda: Prosobranchia). *Experimental Parasitology*, 113(1):24–29, 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.002>.
- Jeffroy, F., Paillard, C. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6):1137–1141, 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.10.008>.
- de Jong-Brink, M., Bergamin-Sassen, M., Solis Soto, M. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology*, 123(S):129–141, 2001.
- Kawai, T., Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5):637–650, 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>.
- van der Knaap, W. P., Loker, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, 6(6):175–182, 1990.
- Kock, S. Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology*, 123(1):67–70, 2001.
- Kolářová, L. Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. *Folia Parasitologica*, 54(2):81–87, 2007.
- Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2):289–305, 2000.
- Lacchini, A. H., Davies, A. J., Mackintosh, D., Walker, A. J. Beta-1, 3-glucan modulates PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* defence cells: a role for PKC in H₂O₂ production and downstream ERK activation. *The Journal of Experimental Biology*, 209(24):4829–4840, 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02561>.
- Lehmacher, W., Wassmer, G. Adaptive sample size calculations in group sequential trials. *Biometrics*, 55(4):1286–1290, 1999.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6):973–983, 1996.

- Lie, J. K., Heyneman, D., Jeong, K. H. Studies on resistance in snails. 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails. *Journal of Parasitology*, 62(2):286–291, 1976.
- Loker, E. S., Hertel, L. A. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. *Journal of Parasitology*, 73(3):503–513, 1987.
- Loker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M., Kruse, K. T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 68(1):84–94, 1982.
- Loker, E. S., Cimino, D. F., Stryker, G. A., Hertel, L. A. The effect of size of M line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei*. *Journal of Parasitology*, 73(6):1090–1098, 1987.
- Loker, E. S., Cimino, D. F., Hertel, L. A. Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. *Journal of Parasitology*, 78(1):104–115, 1992.
- López, C., Villalba, A., Bachére, E. Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(3):188–192, 1994. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201194901252>.
- Makino, R., Tanaka, T., Iizuka, T., Ishimura, Y., Kanegasaki, S. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeuteroheme-substituted horseradish peroxidase. *The Journal of biological chemistry*, 261(25):11444–11447, 1986.
- Matricon-Gondran, M., Letocart, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3):235–247, 1999. URL <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1999.4877>.
- McKerrow, J. H., Jeong, K. H., Beckstead, J. H. Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 37(3):341–347, 1985.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397, 1997. URL <http://dx.doi.org/10.1038/41131>.

- Mikeš, L., Zídková, L., Kašný, M., Dvořák, J., Horák, P. *In vitro* stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology Research*, 96(4):230–241, 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-005-1347-1>.
- Mosca, F., Narcisi, V., Calzetta, A., Gioia, L., Finoia, M. G., Latini, M., Tiscar, P. G. Effects of high temperature and exposure to air on mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk 1819) hemocyte phagocytosis: Modulation of spreading and oxidative response. *Tissue and Cell*, 45(3):198–203, 2013. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.12.002>.
- Mounkassa, J. B., Jourdane, J. Dynamics of the leukocytic response of *Biomphalaria glabrata* during the larval development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma liei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55(3):306–311, 1990.
- Noda, S. Effects of excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* larvae on the hematopoietic organ of M-line *Biomphalaria glabrata* snails. *Journal of Parasitology*, 78(3):512–517, 1992.
- Noda, S., Loker, E. S. Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snails: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. *Journal of Parasitology*, 75(2):261–269, 1989.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J. I. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(3):390–394, 2004.
- Núñez, P. E., Adema, C. M., de Jong-Brink, M. Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, 109(3):299–310, 1994.
- Ordás, M. C., Novoa, B., Figueras, A. Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(7):611–622, 2000. URL <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2000.0276>.
- Pearce, S., Newton, R. A., Nair, S. V., Raftos, D. A. Humoral opsonins of the tunicate, *Pyura stolonifera*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(5-6):377–385, 2001.
- Plows, L. D., Cook, R. T., Davies, A. J., Walker, A. J. Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes.

- Biochimica et Biophysica Acta*, 1692(1):25–33, 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.002>.
- Plows, L. D., Cook, R. T., Davies, A. J., Walker, A. J. Phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes: a potential role for phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase A. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1):74–77, 2006a. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.011>.
- Plows, L. D., Cook, R. T., Davies, A. J., Walker, A. J. Integrin engagement modulates the phosphorylation of focal adhesion kinase, phagocytosis, and cell spreading in molluscan defence cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(8):779–786, 2006b. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.008>.
- Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Pierce, R. J., Galinier, R., Mitta, G. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(2):217–227, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685107003349>.
- Rudolfová, J., Hampl, V., Bayssade-Dufour, C., Lockyer, A. E., Littlewood, D. T. J., Horák, P. Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research*, 95(2):79–89, 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-004-1262-x>.
- Santos, D. V. V., Santos, M. A. V., Rodrigues, I. R. Hemocyte production in *Biomphalaria glabrata* snails after exposure to different *Schistosoma mansoni* infection protocols. *Revista Pan-Amazonica de Saúde*, 2(2):33–38, 2011.
- Sapp, K. K., Loker, E. S. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: *in vitro* interactions between hemocytes and digenean larvae. *Journal of Parasitology*, 86(5):1020–1029, 2000a. URL [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1020:ACSOMU\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1020:ACSOMU]2.0.CO;2).
- Sapp, K. K., Loker, E. S. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *Journal of Parasitology*, 86(5):1012–1019, 2000b. URL [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1012:MUDSSR\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1012:MUDSSR]2.0.CO;2).
- Schallig, H., Schut, A., van der Knaap, W., de Jong-Brink, M. A simplified medium for the *in vitro* culture of mother sporocysts of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology Research*, 76(3):278–279, 1990. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00930825>.

- de Souza, C. P., Cunha, R. C., Andrade, Z. A. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 37(3):201–206, 1995.
- de Souza, C. P., Borges, C. C., Santana, A. G., Andrade, Z. A. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(4):517–522, 1997.
- Shozawa, A., Suto, C., Kumada, N. Superoxide production by the haemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni* : COMMUNICATION : Immunology. *Zoological Science*, 6(5):1019–1022, 1989. URL <http://biostor.org/reference/106888>.
- Sminia, T. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell and Tissue Research*, 150(4):443–454, 1974. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00225968>.
- Sullivan, J. T., Pikios, S. S., Alonzo, A. Q. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 90(1):92–96, 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1645/GE-3266>.
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(3):197–205, 2003.
- Torreilles, J., Guerin, M.-C. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(7):509–518, 1999. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898902005>.
- Tunholi, V. M., Lustrino, D., Tunholi-Alves, V. M., de Mello-Silva, C. C., Maldonado, A. J., Rodrigues, M. L., Pinheiro, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2):192–195, 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.006>.
- Uchikawa, R., Loker, E. S. *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*: adherence of unaltered or modified latex beads to hemocytes of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 75(2):223–232, 1992.

- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(10):968–977, 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.006>.
- Virág, L., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters*, 140-141(1):113–124, 2003.
- Walker, A. J. Do trematode parasites disrupt defence-cell signalling in their snail hosts? *Trends in Parasitology*, 22(4):154–159, 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.003>.
- Walker, A. J., Lacchini, A. H., Sealey, K. L., Mackintosh, D., Davies, A. J. Spreading by snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells is regulated through integrated PKC, FAK and Src signalling. *Cell and Tissue Research*, 341(1):131–145, 2010. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-010-0986-4>.
- Wright, B., Lacchini, H. A., Davies, J. A., Walker, J. A. Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells: a role for PKC and ERK signalling pathways. *Biology of the Cell*, 98(5):265–278, 2006.
- Xia, Y., Zweier, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13):6954–6958, 1997.
- Zahoor, Z., Davies, A. J., Kirk, R. S., Rollinson, D., Walker, A. J. Disruption of ERK signalling in *Biomphalaria glabrata* defence cells by *Schistosoma mansoni*: implications for parasite survival in the snail host. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(12):1561–1571, 2008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.014>.
- Zahoor, Z., Davies, A. J., Kirk, R. S., Rollinson, D., Walker, A. J. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Parasit Vectors*, 2(1): 18, 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-18>.
- Zelck, U. E., Janje, B., Schneider, O. Superoxide dismutase expression and H₂O₂ production by hemocytes of the trematode intermediate host *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda). *Developmental and Comparative Immunology*, 29(4):305–314, 2005.
- Zhu, X., Pan, Y., Li, Y., Cui, L., Cao, Y. Supplement of L-Arg improves protective immunity during early-stage *Plasmodium yoelii* 17XL infection. *Parasite immunology*, 34(8-9):412–420, 2012. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01374.x>.