

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie

Bakalářská práce



**Imunitní reakce plžů čeledi Lymnaeidae
proti larvám motolic**

Martin Vostrý

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

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za kritické připomínky a trpělivost v době psaní této práce. Také děkuji své rodině za podporu a umožnění mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Petra Horáka, Ph. D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 2. 5. 2007

.....

Podpis

Obsah:

1 Úvod	6
2 Literární přehled	7
2.1 Charakteristika čeledi Schistosomatidae	7
2.1.1 Důležité morfologické znaky	7
2.1.2 Vývojový cyklus	8
2.2 Vnitřní obranný systém měkkýšů	11
2.2.1 Charakteristika IDS	11
2.2.2 Humorální imunita	11
2.2.3 Buněčná imunita	14
2.2.3.1 Hemocyty	15
2.2.3.2 Průběh eliminace parazita hemocyty	16
2.3 Specifita vztahu hostitel-parazit	19
2.3.1 Vliv parazitů na plže	19
2.4 Závěr	23
2.5 Použitá literatura	24

Abstrakt

Schistosomy, včetně druhů vyskytujících se v ptácích, jsou parazité způsobující onemocnění významná pro humánní i veterinární medicínu. Část svého vývoje prodělávají v mezihostiteli, kterým jsou vodní plži patřící do různých čeledí. Kombinace parazit-mezihostitel je pravděpodobně vysoce druhově specifická. Ochranu plžů před parazity zajišťuje vnitřní obranný systém. Ten se skládá ze složky humorální a buněčné. Nejdůležitější součástí buněčné složky a zároveň základním prvkem obrany plžů před trematody jsou hemocyty. Hemocyty jsou buňky vyskytující se v hemolymfě a pojivové tkáni plžů, kde slouží jako hlavní nástroj fagocytózy a enkapsulace parazitů, kterým se podařilo proniknout do těla plže. Hemocyty dokáží syntetizovat a dále využívat určité složky humorální imunity, jako jsou například lektiny zajišťující rozpoznávání cizích nebo vlastních poškozených struktur. Paraziti se snaží zabránit svému rozpoznání a následné eliminaci. Proto vytváří exkreční/sekreční produkty blokuující receptory hemocytů pro povrchové struktury parazitů.

Abstract

Schistosomes including bird species are parasites causing diseases important in both human and veterinary medicine. In one part of their life-cycle they develop within the intermediate snail hosts from different families. The parasite-intermediate host combinations are probably highly species-specific. The internal defence system (IDS) is involved in protection of snails against parasites. The IDS is comprised of humoral and cellular limbs. The most important part of cellular limb and the fundamental component of defence against trematodes is a hemocyte. Hemocytes are free cells occurring in the haemolymph and connective tissue of snails. They represent the major defence tool, being able to phagocytose and/or encapsulate pathogens within the body of snails. Hemocytes can synthesize and use certain factors of humoral immunity, e.g. lectins recognising non-self and self damaged particles. On the other hand, the parasites try to avoid recognition and elimination by hemocytes, e.g. by means of their inhibitory excretory/secretory products; such molecules could interfere with hemocyte receptors responsible for recognition of specific parasite surface epitops.

1 Úvod

Motolice jsou významní paraziti napadající člověka i zvířata. Způsobují závažná onemocnění, která mohou vést až ke smrti infikovaného organismu. Častým objektem výzkumu se stávají zejména zástupci čeledi Schistosomatidae. Důvodem je přibližně 200 milionů lidí nakažených schistosomami v endemických zemích (<http://www.who.int/schistosomiasis/en/> 2007). Díky tak vysokému počtu řadí Světová zdravotnická organizace (WHO) schistosomózy mezi deset nejsledovanějších infekčních onemocnění (<http://www.who.int/tdr/index.html> 2004).

V posledních dvou desetiletích se pozornost vědců obrací znovu i k ptačím schistosomám (devět platných rodů: *Austrobilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Macrobilharzia*, *Bilharziella*, *Trichobilharzia*, *Jilinobilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Dendritobilharzia*, *Allobilharzia*; Kolářová a kol. 2006), a to hlavně k nejlépe prostudovanému rodu *Trichobilharzia*. Tento zájem je vyvolán i novými případy výskytu cercáriové dermatitidy v různých zemích (např. Island, Itálie, Francie), jejímž původcem jsou převážně larvy zástupců tohoto rodu. K zájmu o trichobilharzie přispěla také identifikace nových druhů (např. *Trichobilharzia franki*, *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia salmanticensis*). Z dat získaných jejich výzkumem vyplývá širší spektrum původců onemocnění s různými životními cykly, hostitelskou specifitou a patogenitou (Horák 2004).

2 Literární přehled

2.1 Charakteristika čeledi Schistosomatidae

Všichni zástupci čeledi Schistosomatidae (Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea) jsou krevní paraziti obratlovců (hematofágové). Tomuto způsobu života se v průběhu evoluce značně přizpůsobili z hlediska morfologie, fyziologie a ekologie. Schistosomy se vyskytují v 74 endemických zemích, kde žije v rizikových oblastech na 650 milionů lidí. Asi 200 milionů lidí je infikovaných a podle některých zdrojů až 200 tisíc lidí ročně v důsledku onemocnění schistosomózou zemře (<http://www.who.int/schistosomiasis/en/> 2007).

2.1.1 Důležité morfologické znaky

Schistosomy mají protáhlé, štíhlé tělo o velikosti 0,5 – 20 mm. Díky charakteristické struktuře svého povrchu jsou společně s ostatními zástupci taxonu Trematoda a dále zástupci taxonů Monogenea a Cestoda řazeni do skupiny Neodermata. Jejich povrch – neodermis (s výjimkou prvního larválního stádia schistosom) je tvořen vnější bezjadernou vrstvou, která je napojena cytoplasmatickými spoji na vlastní buněčná těla, tzv. cytony. Ty obsahují jádro a další buněčné orgány a jsou zanořeny pod bazální membránu a vrstvu svaloviny. Dalším typickým znakem trematodů jsou zpravidla dvě svalnaté přísavky, ústní asociovaná s přijímacím (a zároveň vyvrhovacím) otvorem a břišní přísavka – acetabulum. Schistosomy mají obě přísavky, které jim pomáhají k přichycení se v hostiteli. Jinou povrchovou strukturou charakteristickou pro schistosomy jsou tuberkuly, hrbolky na těle pomáhající při pohybu v cévách hostitele. Tuberkuly mohou sloužit také jako taxonomický znak. Schistosomy nemají tělní dutiny, anus, dýchací ani oběhovou soustavu. Naopak dobře vyvinutá je trávicí soustava, exkreční systém protonefridiálního typu a jako u všech motolic také rozmnožovací soustava. Schistosomy mají vysoký reprodukční potenciál. Samice je schopná denně vyprodukovat 50 – 1500 vajíček ektolecitálního typu bez víčka. Tvar vajíček je druhově specifický a může sloužit jako taxonomický znak. Schistosomy jsou gonochoristé (mezi motolicemi výjimka) s výrazným pohlavním dimorfismem. Pokud se v definitivním hostiteli setkají dva jedinci různého pohlaví, zalézají štíhlejší

a delší samice do rýhy zvané canalis gynaecophorus na těle kratšího a širšího samce. Vývojové cykly schistosom jsou stejně jako u ostatních trematodů složité. Nervová soustava je typu orthogon. Všechny vnitřní orgány jsou uloženy v parenchymu.

2.1.2 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus schistosom je nepřímý, dixenní. Vajíčka se dostávají do vnějšího prostředí s močí, stolicí, případně nazálním sekretem definitivního hostitele. Pro pokračování cyklu je nutné, aby se vajíčka dostala do vodního prostředí. Zde se z nich líhne první larvální stádium, tzv. miracidium. Miracidium je bohatě obrvená, aktivně se pohybující larva. Cilie se na povrchu miracidia vyskytují jen na specifických oblastech – ciliárních destičkách, které jsou od sebe odděleny mezibuněčnými valy. Povrch miracidia je tedy tvořen multiciliární epidermis (x neodermis u ostatních stádií). Uvnitř larvy jsou totipotentní zárodečné buňky, které dají později vzniknout dalším vývojovým stádiím. Cílem miracidia je vyhledat a proniknout do těla prvního mezihostitele. Tím je u schistosom vodní plž. Kombinace parazit – hostitel je v tomto případě vysoce druhově specifická. Daný druh schistosomy je schopný se vyvíjet a rozmnožovat často jen v jediném vhodném druhu plže. Specifické rozpoznání mezihostitele je umožněno díky miraxonům, látkám, které jsou pro plže druhově specifické. Miraxony atrahují miracidia. To se přiblíží k mezihostiteli a s využitím obsahu svých penetračních žláz pronikne do svalnaté nohy či hlavy plže. Po penetraci dochází k morfologickým změnám miracidia, přetváří se v mateřskou sporocystu. Při této přeměně jsou odvrženy ciliární destičky, které jsou silným antigenem a vyvolávají obrannou imunitní reakci těla plže, která by vedla k eliminaci parazita. Na místo ciliárních destiček expandují mezibuněčné valy a vzniká z nich neodermis. V nově vytvořené mateřské sporocystě vznikají asexuálním rozmnožováním ze zárodečných buněk dceřinné sporocysty. Ty následně opouštějí mateřskou sporocystu a migrují do hepatopankreatu, trávicí žlázy plžů. Zde se ve sporocystě opět asexuálně namnoží cercárie. Cercárie jsou druhé volně pohyblivé larvální stádium schistosom žijící ve vnějším prostředí. Jejich tělo je zakončeno rozeklaným ocáskem (furkocercárie). Po dozrání cercárie opouští tělo mezihostitele do vody, kde hledají definitivního hostitele (obratlovce). Předpokladem k jeho nalezení je výskyt cercárií na stejném místě a ve stejném čase

jako jejich hostitel. K tomu jim slouží nejrůznější receptory. Cerkárie schistosom jsou negativně geotaktické a pozitivně fototaktické, navíc rozpoznávají určité molekuly na povrchu hostitele. Když je hostitel identifikován jako vhodný, cercárie penetruje jeho povrch za pomoci produktů svých penetračních žláz. Při penetraci odhazuje ocásek a glykokalyx, povrchovou vrstvu sacharidů, která chránila cercárie proti hypoosmotickému prostředí sladké vody. Při určování vhodnosti hostitele se ale cercárie může zmýlit (cercárie ptačích schistosom penetrují kůži člověka). Stimulem pro identifikaci hostitele a penetraci jeho povrchu jsou ceramidy, cholesterol a mastné kyseliny. Tyto látky se vyskytují v savčí kůži ve vyšší koncentraci než v kůži ptáků a stávají se pro cercárie „neodolatelným“ signálem. Důsledkem takového omylu je vznik hypersenzitivní kožní reakce u lidí – cercáriová dermatitida (Horák a Kolářová 2005). V kůži definitivního hostitele se cercárie přetváří na schistosomulu se dvěma povrchovými membránami. Schistosomula se na základě gradientů D-glukózy a L-argininu dokáže orientovat v kůži a nalézt cévu svého hostitele. Poté, co vstoupí do krevního řečiště, migruje tělem hostitele (průběh migrace je u různých rodů čeledi různý) a dokončuje svůj vývoj. Průběh vývoje v nespecifickém hostiteli (savci) byl popsán při experimentálním výzkumu cercárií *Trichobilharzia ocellata*¹. Ty jsou schopny po penetraci do kůže savce, přestože je nespecifickým hostitelem, pokračovat ve vývoji do dalšího stádia – schistosomuly. Ta je dále schopna, zejména u předem neimunizovaných experimentálních savců, opustit kůži a migrovat do vnitřních orgánů. Zdá se, že hlavním cílem migrace viscerálních schistosom jsou plíce. U některých pacientů opakovaně vystavených nákaze cercáriemi ptačích schistosom byly zjištěny změny celkového zdravotního stavu doprovázené plicními poruchami (Bayssade-Dufour a kol. 2001, cit. dle Horák a Kolářová 2005).

¹ Rod *Trichobilharzia* zahrnuje více než 40 druhů, ale platnost některých z nich je zpochybňována (Rudolfová a kol. 2005). Poté, co byl na základě cercárií popsán druh *Trichobilharzia ocellata* nalezený v mezihostitelském plži *Lymnaea stagnalis*, bylo toto označení běžně používáno pro téměř všechny ocelátní furkocercárie nalezené v Evropě, přestože se lišil jejich mezihostitel, chování i rozměry. *T. ocellata* představuje komplex druhů (viz. review Farley 1971, Blair a Islam 1983), což bylo nedávno potvrzeno podrobnou analýzou morfologických znaků a životních cyklů. Výsledky podpořila i data získaná při molekulárních analýzách. Z těchto informací vyplývá nutnost přehodnocení platnosti druhu *T. ocellata* (Rudolfová a kol. 2005). V této práci jsou zachována původní označení tak, jak byla použita citovanými autory.

Migrace tkáněmi obratlovců byla popsána i u *T. regenti*. Ve specifickém ptačím hostiteli tato schistosoma proniká do periferních nervů, dále migruje přes míchu a mozek do nosní dutiny ptáka, kde dokončuje svůj vývoj a klade vajíčka (Blažová a Horák 2005). Průnik schistosomuly do míchy a mozku byl zjištěn i u pokusných savců. Zde ale migrace nepokračovala do nosní dutiny. Vzhledem k nespecifickému hostiteli byl vývoj schistosomuly zastaven a následoval její úhyn. Nicméně závažným následkem této migrace může být poškození míchy a neuromotorické poruchy včetně ochrnutí končetin. Tato poškození byla zaznamenána jak u infikovaných ptáků, tak savců (Horák a kol. 1999, Hrádková a Horák 2002).

Pokud se ve vnímavém hostiteli setkají jedinci různého pohlaví, dochází k jejich migraci do specifických orgánů hostitele (druhově specifická lokalizace), kde v krevním řečišti daného orgánu kopulují a samice klade vajíčka. Ta představují hlavní patogenní agens. Jen asi 50% vajíček se dostane ven z hostitele, zbytek zůstává deponován v jeho tkáních, kde kolem nich vzniká zánětlivá reakce – granulom. Při vyšší hustotě granulomů v tkáni může dojít k disfunkci daného orgánu. Klinickými projevy schistosomóz mohou být cercáriová dermatitida, hematurie, hepatosplenomegálie, anémie, ezofageální varixy, cor pulmonale. Pokud není schistosomóza diagnostikována a léčena, dokáže parazit v hostiteli přežívat až 30 let.

2.2 Vnitřní obranný systém měkkýšů

Obratlovci i bezobratlí živočichové, měkkýše nevyjímaje, potřebují obranný systém chránící je před napadením nejrůznějšími patogeny jako jsou například viry a bakterie, jejichž útokům jsou denně vystaveni. Musí čelit i vlastním přestárlym či poškozeným buňkám. Bránit jedince před tímto potenciálním nebezpečím má za úkol vnitřní obranný systém (internal defence system, IDS), „obdoba“ imunitního systému u obratlovců.

2.2.1 Charakteristika IDS

První obranná linie je tvořena povrchem těla, který je pokryt sekretovaným hlenem obsahujícím dráždivé a mikrobicidní látky znemožňující penetraci povrchu (Kamiya a kol. 1989). Samotný vnitřní obranný systém měkkýšů postrádá adaptivní (získanou) část imunitních reakcí, rozpoznávání antigenů pomocí imunoglobulinů, nevyužívá T ani B buněk a nemá imunologickou paměť (van der Knaap a Loker 1990). Musí se spoléhat pouze na neadaptivní (vrozenou) imunitu (Horák a Kolářová 2005), jejíž fungování je zajištěno hemolymfou, respektive látkami a buňkami v ní obsaženými. Parazit, kterému se podaří proniknout do těla měkkýše, je rozpoznán jako cizí (pravděpodobně pomocí lektinů) a následně se ho snaží obranný systém eliminovat pomocí dalších složek humorální, ale i buněčné obrany (Adema a kol. 1991).

2.2.2 Humorální imunita

Humorální imunita je zprostředkována nejrůznějšími humorálními faktory, které jsou produkovány kromě jiného i hemocyty (součástí buněčné složky imunity) (Mohandas a kol. 1992, Sminia 1972) a uvolňované do hemolymfy. Molekulární charakteristika je známa jen u některých z nich (Adema a kol. 1991). Mezi humorální faktory patří lysozym a jiné lysozomální enzymy, bakteriostatické a baktericidní látky, agglutinin, lektiny, cytokine-like molekuly, oxid dusnatý a další (Adema a kol. 1991).

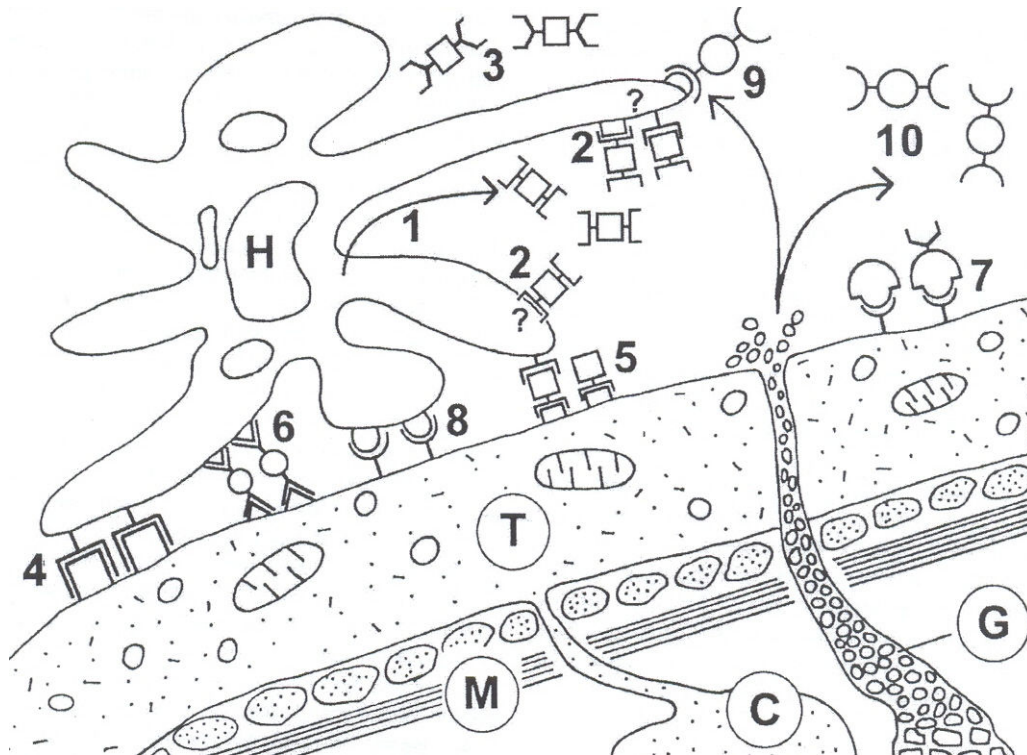
Bakteriostatické látky obsažené v plazmě (hemolymfa zbavená buněk) *Lymnaea stagnalis* dokáží velmi efektivně inhibovat množení Gram-pozitivních bakterií jako je *Staphylococcus saprophyticus*. U Gram-negativních bakterií (*Escherichia coli*) je účinek jen okrajový (van der Knaap a Meuleman 1986). Jsou zde zastoupeny

i baktericidní látky schopné určité druhy bakterií zabít (Cushing a kol. 1971 a Mori a kol. 1984, cit. dle Adema a kol. 1991).

Lektiny jsou proteiny (neimunoglobulinové a neenzymatické povahy) rozpoznávající specificky sacharidové struktury a sloužící jako důležitý faktor k rozeznání cizích částic (antigenů) od vlastních. Místo jejich syntézy je většinou neznámé, ale v některých případech jsou produkovány bílkovinnou žlázou (Horák a van der Knaap 1997) nebo hemocyty (van der Knaap a kol 1981). Vyskytují se jak vázané na hemocytech jako membránové receptory, tak ve formě volně rozpustných faktorů v hemolymfě (Horák a Deme 1998). V rozpustné formě mohou sloužit jako můstky spojující povrchový sacharid patogenu na jedné straně a hemocyt na straně druhé (rozpoznání patogenu) nebo jako opsoniny, pak dojde k navázání lektinu na sacharidový epitop antigenu, to vyvolá změnu konformace lektinu a vystavení vazebného místa pro hemocyt. Lektin tímto způsobem vlastně označí cizí strukturu, aby mohla být hemocytem rozpoznána (opsonizace) a odstraněna (Richards a Renwranz 1991). Další možnou funkcí lektinů je agglutinace (propojení, sesíťování antigenů dohromady) usnadňující fagocytózu antigenů (Horák a van der Knaap 1997). Lektiny hemolymfy se mohou také reverzibilně vázat na povrch hemocytů a sloužit zde jako cytofilní receptory pro rozpoznávání cizích buněk (van der Knaap a kol. 1983)(obrázek 1). Funkce některých lektinů může být ovlivněna přítomností divalentních kationtů kovů, především Ca^{2+} . Tím se stává v určitých případech proces rozpoznávání antigenu a jeho následná fagocytóza hemocyty Ca^{2+} -dependentní, jak bylo prokázáno na hemocytech *L. stagnalis* v interakci s erytrocyty králíka (Horák a Deme 1998). Hladina agglutininů a opsoninů odráží věk jedince (Dikkeboom a kol. 1985), jeho fyziologický stav, stresové reakce a případnou přítomnost patogenů v těle (Couch a kol. 1990). Jejich produkce může být ovlivněna některými infekcemi včetně nákazy larvami trematodů (Monroy a kol. 1992, Loker a kol. 1994, Monroy a Loker 1993). Syntéza některých může být dokonce zahájena *de novo* až jako reakce na infekci (Ottaviani 1992). Informace o lektinech a agglutininech měkkýšů však zdaleka nejsou kompletní. Jistě představují zajímavý objekt pro budoucí výzkum (Horák a van der Knaap 1997).

Oxid dusnatý (NO) je molekulární posel mnoha organismů s řadou funkcí včetně regulace cévního tonu, buněčné signalizace v mozku a eliminace patogenů nespecifickou imunitní odpovědí. Je produkován NO-syntázou, jejíž funkce je

Ca²⁺-dependentní (Conte a Ottaviani 1995). V měkkýších NO způsobuje shlukování bakterií kolem hemocytů a následně je usmrtí svojí bakteriocidní aktivitou. Tento



Obrázek 1:

Schématické znázornění lektin-sacharidových interakcí obranného systému pláž s larvami trematodů.

Funkce potvrzené experimentálními daty:

1 – lektiny jsou syntetizované v hemocytech a vystaveny na jejich povrchu nebo uvolňovány do hemolymfy; 2 – některé lektiny z hemolymfy se vážou na povrch hemocytů, kde slouží jako cytofilní receptory pro cizí buňky; 3 – lektiny v hemolymfě pochází i z jiných tkání; 4 – membránové lektiny hemocytů rozpoznávají patogeny; 5 – lektiny v hemolymfě slouží jako opsoniny, jejichž sacharidové zbytky jsou rozpoznávány membránovými lektiny hemocytů

Další předpokládané funkce lektinů (prozatím nepotvrzené experimentálně):

6 – lektiny původem z plže a/nebo parazita rozpoznávají sacharidové zbytky na obojím, hemocytech i povrchu parazita, a slouží jako propojující můstek; 7 – povrchové lektiny motolice se účastní maskování parazita použitím získaných glykosylovaných molekul plže; 8 – povrchové lektiny motolice se vážou na hemocyty; 9 – lektiny jsou exkretovány/sekretovány parazitem, reagují se sacharidy hemocytů a stimulují nebo inhibují hemocyty; 10 – exkretované/sekretované lektiny parazita reagují s buňkami/orgány plže a ovlivňují jeho funkce ne přímo se týkající obranného systému.

H – hemocyt; T – tegument (neodermis); M – vrstva svaloviny; C – vlastní tělo buňky s organelami (cyton); G – exkreční/sekreční žláza

Převzato z Horák a van der Knaap 1997

proces je nezávislý na fagocytóze hemocyty (Franchini a kol. 1995, Ottaviani a kol. 1993).

Cytokiny jsou rozpustné „zprostředkovatelské“ molekuly regulující efektorovou fázi imunitní odpovědi. Bylo prokázáno jejich zapojení v imunitní odpovědi měkkýšů. Různé cytokiny (IL-1 α , IL-2, TNF- α) významně stimulují motilitu hemocytů měkkýšů (vliv cytokinů na motilitu se mezi druhy měkkýšů liší), zvyšují aktivitu při fagocytóze a podněcují zahájení syntézy oxidu dusnatého (Ottaviani a kol. 1995).

2.2.3 Buněčná imunita

V měkkýších je buněčná imunita zastoupena čtyřmi typy buněk: antigen vychytávající endotelové buňky, pórové buňky pohlcující cizí proteiny, fagocytující retikulární buňky a volně pohyblivé hemocyty (van der Knaap a kol. 1992).

Antigen vychytávající buňky lemují krevní cévy a hrají důležitou roli v první fázi odstraňování cizích částic (van der Knaap a kol. 1981). Ty rozpoznávají pomocí lektin-like receptorů, které mají na svém povrchu (Renwraantz a Cheng 1977, cit. dle Adema a kol. 1991). Po zachycení částice nedochází k jejímu pohlcení antigen vychytávající buňkou, ale je fagocytována jedním z cirkulujících hemocytů (Adema a kol. 1991).

Retikulární buňky jsou fixní fagocyty s vysokým počtem lysosomů, které jsou schopné degradovat široké spektrum cizích látek (Sminia 1981, cit. dle Adema a kol. 1991). Narozdíl od hemocytů nedisponují enzymem peroxidázou (Adema a kol. 1991).

Pórové buňky jsou druhým zástupcem fixních fagocytů. Mají velké, kulaté jádro a dobře vyvinuté drsné endoplasmatické retikulum obsahující hemocyanin (Sminia a kol. 1972). Ten je u některých druhů plžů (*Helix aspersa*) produkován přímo pórovými buňkami (Sminia a Vlugt-van Daalen 1977). V jejich buněčné membráně se vyskytují četné invaginace, což se na průřezu jeví jako póry v buněčné membráně. Těmito invaginacemi procházejí všemi směry výběžky cytoplasmy obklopené vrstvou cytoplasmatické membrány (též obsahují hemocyanin; Sminia a kol. 1972), mezi kterými zůstávají štěrbinny o velikosti 20 - 30 nm (Sminia a kol. 1972, Sminia 1972). Takové prostorové uspořádání dává nakonec vzniknout struktuře připomínající síto, díky které mají pórové buňky schopnost selektivní endocytózy (velikost pronikající částice je omezena velikostí štěrbin v invaginacích cytoplasmatické membrány). Navíc jsou schopné rozlišovat přijímané látky na základě jejich povahy - mají

vysokou afinitu k proteinům (Adema a kol. 1991). Jejich schopnost štěpit cizí látky je poměrně nízká (Sminia 1972). To naznačuje, že pórové buňky nejsou dostatečně vybaveny vhodnými enzymy a že jejich primární funkce asi nebude v odstraňování cizích látek. Pravděpodobně se podílí na procesech degradace vlastních proteinů (Adema a kol. 1991). Studie některých druhů majících v hemolymfě hemoglobin (*Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*) naznačují, že pórové buňky navíc dokáží syntetizovat hemoglobin (Sminia a kol. 1972, Sminia a Vlugt-van Daalen 1977).

2.2.3.1 Hemocyty

Nejdůležitější složkou buněčné imunity jsou hemocyty. Tyto buňky se podílejí na tvorbě humorálních faktorů hemolymfy měkkýšů, dále disponují schopností účinně fagocytovat cizí částice a účastní se také při enkapsulaci patogenů, jejichž velikost znemožňuje eliminaci prostřednictvím fagocytózy. Hemocyty se pohybují volně v otevřeném oběhovém systému měkkýšů a mohou snadno migrovat do pojivové tkáně a naopak. Díky své pohyblivosti slouží jako neustálý dozor. Jejich pohyb je směřován chemotakticky (Schmid 1975). Místem vzniku hemocytů může být tzv. orgán produkující hemocyty (hemocyte-producing organ), jehož lokalizace v těle se může mezi druhy lišit (část ledviny u *Lymnaea truncatula*), nebo se mohou hemocyty formovat v pojivové tkáni (Monteil a Matricon-Gondran 1991). Počet hemocytů se značně liší jak mezi jednotlivými druhy, tak mezi samotnými jedinci jednoho druhu (Sminia 1972). Jejich počet se mění také v závislosti na stavu jedince (infekce, stáří; van der Knaap a kol. 1987, Dikkeboom a kol. 1985). Stáří jedince nemá vliv zdaleka jen na počet hemocytů. U juvenilních plžů je fagocytóza hemocytů méně efektivní a je také snížena schopnost plasmy zajistit opsonizaci a agglutinaci cizích částic (Dikkeboom a kol. 1985, van der Knaap a kol. 1987). To pravděpodobně přispívá k větší vnímavosti juvenilních jedinců k infekcím motolicemi (Dikkeboom a kol. 1985). Z hlediska morfologie lze nalézt dva typy hemocytů. Prvním typem jsou hemocyty kruhového tvaru (round hemocytes) s malým obsahem lysosomů, některými autory nazývané hyalinocyty. Druhým typem jsou buňky s mnoha panožkami rozprostírajícími se do stran (spreading hemocytes) nazývané granulocyty. Ty mají vysoký obsah lysosomů naznačující dobrou schopnost fagocytovat (Ottaviani 1983). Klasifikace hemocytů však zdaleka není jednotná, tyto

dva typy buněk jsou některými autory považovány jen za dvě různá vývojová stádia jedné buněčné linie (Bachere a kol. 1988).

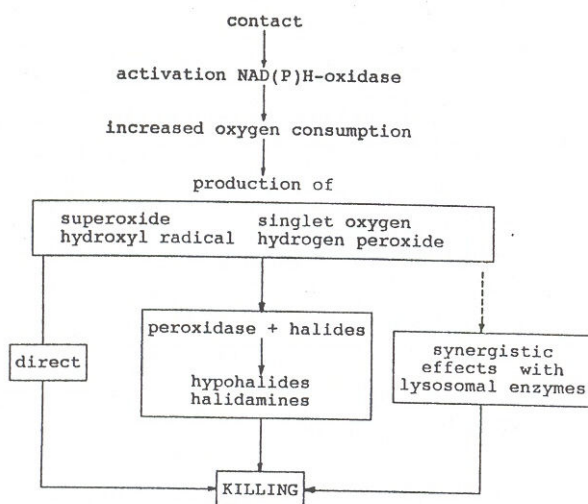
2.2.3.2 Průběh eliminace parazita hemocyty

V závislosti na velikosti parazita je buď fagocytován hemocytem nebo enkapsulován větším počtem hemocytů. Tyto aktivity musí být spuštěny signálem a ve svém průběhu musí být také regulovány (Adema a kol. 1991). Spouštěcím signálem jsou látky uvolňované patogenem, např. různé sacharidy rozpoznávané lektiny měkkýše (Schmid 1975, cit. dle Adema a kol. 1991), ale i látky proteinové povahy. Po navázání fyzického kontaktu musí hemocyt rozpoznat, jestli se jedná o vlastní či cizí strukturu. Prvním signálem je elektrostatický náboj povrchu cizí částice. Pokud se ten vzájemně odpuzuje s povrchovým nábojem hemocytu, kontakt je okamžitě ukončen. Tento fenomén byl prokázán na hemocytech *L. stagnalis*, které se vážaly různě k agarózovým částicím s různým elektrostatickým nábojem (Dikkeboom a kol. 1988). Bližší a přesnější rozpoznání antigenu je dále zajišťováno lektiny díky jejich specifické vazbě na sacharidové struktury. Schopnost lektinů agglutinovat mikroorganismy způsobí jejich imobilizaci, a tím zabrání jejich rozsevu v těle hostitele a zároveň tak sníží počet cílů pro efektorové buňky – hemocyty. Lektiny zprostředkovávají i kontakt mezi hemocyty a objektem určeným k enkapsulaci (Adema a kol. 1991). Enkapsulace je dosaženo několika vrstvami hemocytů, které obklopí danou strukturu (Sminia a kol. 1974). S tou má ale přímý kontakt pouze první vrstva hemocytů, ta vysílá signály, které zajistí nasedání dalších vrstev hemocytů. K dokončení enkapsulace je tedy zapotřebí komunikace mezi hemocyty, jejíž povaha však zatím není objasněna (Adema a kol. 1991). Pokud se jedná o nekompatibilní dvojici parazit-hostitel, hemocyty usmrtí cytotoxickými látkami enkapsulovaný organismus, a to dokonce i v nepřítomnosti humorálních faktorů v *in vitro* podmínkách (Dikkeboom a kol. 1988). Z toho vyplývá, že primárním efektorovým nástrojem jsou právě hemocyty. Humorální faktory slouží spíše jako poslové směřující aktivitu hemocytů (Adema a kol. 1991), což ukazují hemocyty z vnímavého hostitele, které po přidání plasmy z rezistentního hostitele získaly v určitých případech potenciál usmrtit sporocystu kompatibilního druhu motolice (Loker a Bayne 1982).

Humorální faktory produkované hemocyty představují nástroj boje hemocytů s patogeny na dálku, bez nutnosti přímého kontaktu. Druhým nástrojem jsou již

zmiňované cytotoxické látky používané při těsném kontaktu s parazitem (fagocytóza, enkapsulace). Mezi ně patří řada lytických enzymů (lysozym, peroxidáza) (Mohandas a kol. 1992, Sminia 1972), které se nacházejí v lysosomech, ale v některých případech byla jejich aktivita zaznamenána i v drsném endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Hladina těchto enzymů se po kontaktu s antigenem zvyšuje (Sminia a Barendsen 1980). Lytické enzymy mohou působit degradaci povrchu patogena jak extracelulárně při jejich uvolnění do štěrbin mezi hemocytem a enkapsulovaným parazitem (Dikkeboom a kol. 1988), tak intracelulárně po splynutím lysosomu s fagosomem při fagocytóze (Cheng a Calí 1974, cit. dle Adema a kol. 1991).

Dalším důležitým zdrojem cytotoxicity zprostředkované hemocyty jsou reaktivní intermediáty redukce kyslíku (reactive oxygen intermediates, ROIs). Oxidace je základní reakcí pro metabolismus většiny organismů, může být ale také velmi nebezpečná. Její toxické produkty jsou běžně využívány savčími leukocyty při odstraňování patogenů (obrázek 2). Využití tohoto mechanismu hemocyty



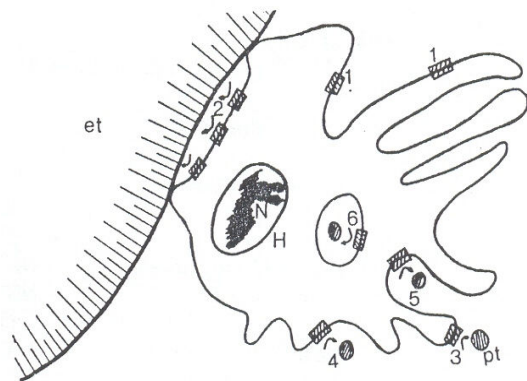
Obrázek 2:

Sled dějů pravděpodobně vedoucích k využití cytotoxických vlastností produktů oxidace:

NAD(P)H-oxidáza je aktivována kontaktem s antigenem. Transformuje kyslík na reaktivní intermediáty redukce kyslíku (ROIs): superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\cdot OH$) a singletový kyslík (1O_2). Tyto molekuly jsou částečně redukovány nebo mají nepárový elektron. To je činí vysoce reaktivními, a proto toxickými. Pokud reagují s látkami jako je peroxidáza nebo halidy (např. chloridy a bromidy), vznikají ještě toxičtější látky než jsou ROIs (hypohalidy, halidaminy). Mezi poškození způsobovaná produkty oxidace patří inhibice enzymů a narušení metabolismus, poškození buněčných membrán a poškození genetické informace (viz. review Adema a kol.1991).

Převzato z Adema a kol. 1991

měkkýšů zaznamenal až Chagot (1989, cit. dle Adema a kol. 1991), který demonstroval NAD(P)H-oxidázovou aktivitu enzymu nacházejícího se v cytoplasmatické membráně hemocytů *Ostrea edulis* a *Crassostrea gigas*. Tento enzym je klíčový v celém systému produkce reaktivních sloučenin kyslíku (Adema a kol. 1994). Následovalo prokázání tvorby superoxidu (O_2^-) hemocyty *L. stagnalis* a dále tvorby peroxidu vodíku (H_2O_2) hemocyty stejného plže (Dikkeboom a kol. 1987). Samo o sobě to ale nedokazuje zapojení těchto reaktivních produktů při obraně proti parazitům. To ověřil až pokus, kdy k hemocytům *L. stagnalis* byly přidány kvasinky. Po jejich vzájemném kontaktu byla pozorována extracelulárně tvorba O_2^- a H_2O_2 až do doby dokončení internalizační fáze fagocytózy. Poté tato extracelulární produkce klesla a vystřídala ji produkce uvnitř buňky, která se po určitou dobu ve fagosomech udržovala na vysoké hodnotě (Adema a kol. 1991). Reaktivní intermediáty redukce kyslíku mohou potenciálně sloužit jako zbraň eliminující fagocytované či enkapsulované parazity v organismu měkkýše (Adema a kol. 1994) (obrázek 3). Z uvedených faktů lze usoudit, že hemocyty představují nejdůležitější součást celého vnitřního obranného systému měkkýšů.



Obrázek 3:

Předpokládaný model systému produkce ROIs v hemocytech měkkýšů:

(1) membránový enzym s NAD(P)H-oxidázovou aktivitou je aktivován kontaktem s velkým cizím objektem (2). ROIs jsou produkovány do prostoru mezi hemocytem (H) a enkapsulovaným objektem (et). (3) k aktivaci produkce ROIs dochází i po kontaktu s malým objektem (pt), ten je společně s enzymem produkujícím ROIs internalizován (4,5) až se aktivita ROIs zcela přesouvá dovnitř hemocytu (6).

N – jádro

Převzato z Adema a kol. 1991

2.3 Specifita vztahu hostitel-parazit

Vztah hostitel-parazit představuje velmi křehkou a do detailu přesně nastavenou koexistenci dvou různých živočišných druhů, z nichž jeden se snaží svými přizpůsobeními zajistit si přežití a co nejlepší podmínky pro rozmnožování a druhý se snaží svému napadení co neefektivněji ubránit. Takto fungující vztah však existuje jen u kompatibilní dvojice skládající se z vhodného hostitele a specifického parazita. Kompatibilita znamená, že parazit najde ve svém hostiteli fyziologicky vhodné prostředí a obranný systém, který selhává ve snaze rozpoznat a zničit parazita (van der Knaap a kol. 1987). Neznamená to ovšem, že by obranný systém plže nefungoval, stále je schopný rozpoznat a odstranit ostatní (nekompatibilní) patogeny. Kompatibilita představuje výjimku z normálního stavu, kterým je obecná rezistence k infekcím. Částečně je určena geneticky (Richards a kol. 1992), ale přesné faktory umožňující vznik takového vztahu zatím neznáme. Předpokládá se, že ke vzniku specifické dvojice hostitel-parazit je potřeba, aby se parazit vyhnul rozpoznání hostitelem, a to za použití molekulárního mimikry nebo aktivního získání molekul hostitele pro vlastní použití (maskování), a ovlivněním obranných mechanismů hostitele (imunosuprese) (Wright 1971, cit. dle Fryer a Bayne 1996).

2.3.1 Vliv parazitů na plže

Při výzkumu vlivu trematodů na mezihostitelské plže, v tomto případě *Lymnaea elodes* infikované motolicí *Echinostoma revolutum*, bylo zjištěno významné ovlivnění růstu, plodnosti a délky života plže. U infikovaných jedinců byla prokazatelně větší délka jejich ulity, často se u těchto jedinců vyskytoval tzv. gigantismus způsobený zrychleným růstem. Gigantismus běžně doprovází nákazu plžů motolicemi (Keymer a Read 1991, cit. dle Sorensen a Minchella 1998). Také byla pozorována zvýšená mortalita, a to u čerstvě infikovaných jedinců a dále několik týdnů po uvolnění prvních cercárií hostitelem. Plodnost infikovaných plžů prudce klesá už tři týdny po infikování a produkce všech vajíček byla u většiny hostitelů zastavena v období 5 – 6 týdnů po infikování. Částečně jsou tyto změny způsobené úbytkem energie hostitele v důsledku jejího čerpání parazitem. Přestože nedostatek energie znemožňuje vývoj vajíček hostitele, její zásoby jsou dostačující pro jeho urychlený růst (Sorensen

a Minchella 1998). Snížení reprodukčního potenciálu označované jako parazitická kastrace hostitele je běžným jevem doprovázejícím infekce měkkýšů schistosomami (El-Ansary 2003; Wright 1971, cit. dle Sorensen a Minchella 1998). Reprodukce hostitele by spotřebovávala energii, kterou potřebuje pro svůj vývoj parazit (Bayne a Loker 1987). Kastrace hostitele parazitem byla pozorována i u dalších dvojic hostitel-parazit, například *B. glabrata* infikovaná motolicí *Schistosoma mansoni* (Crews a Yoshino 1989). K úplnému zastavení kladení vajec došlo, stejně jako u předchozího příkladu, 5 týdnů po infikování. V průběhu migrace dceřiné sporocysty do trávicí žlázy byly již gonády plže značně menší než u kontrolních jedinců (Crews a Yoshino 1989). Laboratorní modely (*L. stagnalis* infikovaná motolicí *T. ocellata*; Schallig a kol. 1991, de Jong-Brink a kol. 1995, de Jong-Brink a kol. 2001, Hordijk a kol. 1991) studující molekulární podstatu parazitické kastrace ukazují, že schistosomy ve svých mezihostitelích podněcují tvorbu schistosominu, peptidu produkovaného pravděpodobně v centrální nervové soustavě (Schallig a kol. 1991) a identifikovaného v hemolymfě parazitovaných plžů v době dozrávání cercárií. Schistosomin ovlivňuje neuroendokrinní systém hostitele. Blokuje receptory bílkovinné žlázy pro hormon calfluxin a receptory obojetné žlázy pro hormon kaudodorzálních buněk. Tím dochází k ovlivnění kladení vajec (de Jong-Brink a kol. 1995). Navíc má také vliv na „light green“ buňky neuroendokrinního systému, které regulují růst plže (souvislost s výskytem gigantismu u infikovaných plžů) (de Jong-Brink a kol. 2001). Účinek schistosominu byl prokázán i v plžích infikovaných lidskými motolicemi rodu *Schistosoma* (de Jong-Brink a kol. 1991)

Infekce motolicí má vliv také na obranný systém plže, jak bylo ukázáno na *L. stagnalis* infikované ptačí schistosomou *T. ocellata*. Schopnost hemocytů infikovaného plže fagocytovat cizí buňky (experimentálně červené krvinky králíka) se zvyšuje přímo po penetraci miracidia do plže a během dalších tří týdnů trvání infekce (přítomna zatím jen mateřská sporocysta) (van der Knaap a kol. 1987, Amen a kol. 1991). Hemocyty se pravděpodobně aktivují fagocytováním ciliárních destiček uvolněných miracidiiem a poškozené tkáně v okolí rostoucí sporocysty. Nejnápadnější změny hemocytů se projevují pět týdnů po infekci (přítomna již mateřská i dceřiná sporocysta). Počet cirkulujících hemocytů značně roste, jejich schopnost fagocytovat naopak klesá a dokonce jejich morfologie prochází změnami - hemocyty jsou větší, mají více inkluzí a zvětšují svůj povrch tvorbou mnoha dlouhých, rozvětvených panožek (van der Knaap a kol. 1987). Zvýšení počtu cirkulujících

hemocytů v tomto stádiu infekce pravděpodobně není v důsledku jejich proliferace. Nebyla pozorována žádná mitotická vřeténka a hemocyty měly charakter zralých buněk (Dikkeboom a kol. 1984). Zdrojem jsou pravděpodobně existující zásoby hemocytů v pojivové tkáni hostitele (Sminia 1974).

Zajímavé využití hemocytů parazitem bylo zjištěno u plagiorchidní motolice *Haplometra cylindracea*. Jejím mezihostitelem je *Lymnaea truncatula*. Sporocysta vyvíjející se v tomto plži je obklopena "obalem", který je tvořen adherovanými a modifikovanými hemocyty hostitele. V infikovaném plži hemocyty rozpoznají sporocystu jako cizí objekt a přiblíží se k ní ve snaze ji enkapsulovat. Pak se ale jejich chování změní a již dále nejsou schopni vytvářet vrstevnatou strukturu typickou pro enkapsulaci. Hemocyty jsou obklopeny dlouhými mikrokly na povrchu sporocysty, které je od sebe navzájem izolují. Pak se morfologicky mění: ubývá cytoplasma, diferencují se desmosomy spojující hemocyt s povrchem parazita. Dále dochází u hemocytů ke změnám metabolismu, ztrátě organel, ztrátě endogenní peroxidázové aktivity a hromadění glykogenu a lipidů, které pravděpodobně slouží jako zdroj energie pro parazita. Prozatím nebylo zjištěno jakým mechanismem parazit inhibuje funkce hemocytů (Monteil a Matricon-Gondran 1991).

Přestože plži nemají imunologickou paměť, jejich vnitřní obranný systém zůstává na vysokém stupni aktivity několik dnů po stimulaci infekčním agens, jak bylo zjištěno u plže *L. stagnalis*. Po naočkování mrtvými bakteriemi došlo k aktivaci obrany plže. Po reinfikování o čtyři dny později (tentokrát živými bakteriemi) byla pozorována rychlejší odezva obranného systému infikovaného plže. Pravděpodobně se jedná o nespecifickou aktivaci. Výzkum prokázal, že míra aktivace je závislá na velikosti dávky při prvním infikování. Čím vyšší první dávka, tím lepší je schopnost patogen zlikvidovat při reinfekci. Tento stav zvýšené aktivity trval nejméně 64 dnů. Důvodem je pravděpodobně aktivace hemocytů plže, neboť po reinfikování počet hemocytů stoupá rychleji u plžů pre-infikovaných bakteriemi než u kontrolních jedinců a hemocyty pre-infikovaných plžů vykazují vyšší fagocytární aktivitu *in vitro* než hemocyty kontrol (van der Knaap a kol. 1983).

Opakem k tomuto stavu se zdá být situace při infikování plže vhodnou motolicí, která suprimuje imunitní systém hostitele a zvýší tak šance na přežití dalšího druhu motolice, která následně infikuje téhož plže (van der Knaap a kol. 1987). Vrozená rezistence plže *B. glabrata* k infekci *S. mansoni* může být snížena, pokud je plž nejdříve nakažen motolicí *E. paraensei* (Lie a kol. 1977). Tento efekt může být

prokázán i přímo na hemocytech. Pokud jsou inkubovány s kompatibilní larvou echinostomy, snižuje se jejich snaha odstranit nekompatibilní sporocystu *S. mansoni* (Loker a Bayne 1986). Podobné ovlivnění obranného systému plže předchází infekcí trematody se pravděpodobně vyskytuje i u jiných kombinací trematod-plž (van der Knaap a kol. 1987). To je pravděpodobně umožněno exkrečními/sekrečními (E-S) produkty samotné motolice. E-S produkty schistosom dokáží ovlivnit buněčné složky obranného systému plžů inhibováním motility hemocytů (Lodes a Yoshino 1990), snížením fagocytární aktivity hemocytů, snížením produkce cytotoxického superoxidu (Connors and Yoshino 1990) a inhibováním proteinové sekreční aktivity hemocytů (El-Ansary 2003). Motolice jsou toho schopny blokováním povrchových receptorů hemocytů (van der Knaap a Loker 1990). Výzkum prováděný na ptačí schistosomě *T. ocellata* a jejím mezihostitelském plži *L. stagnalis* odhalil dva E-S produkty, jeden aktivující a druhý suprimující aktivitu hemocytů plže (Núnez a de Jong-Brink 1997, Núnez a kol. 1997). Využití těchto E-S produktů může být způsob, jakým trichobilharzie uniká rozpoznání a odstranění hemocytů plže. E-S produkty dokáží modulovat aktivitu správným způsobem jen ve specifických mezihostitelích, z čehož lze soudit, že alespoň částečně určují specifitu vztahu trematod-plž (Núnez a de Jong-Brink 1997).

2.4 Závěr

Tato bakalářská práce představuje na vybraných příkladech shrnutí základních údajů o vnitřním obranném systému měkkýšů. Ten využívá pouze neadaptivní imunitu dělí se na humorální složku, kde jsou nejdůležitější součástí lektiny, a buněčnou složku, kam patří hemocyty. Ty díky své multifunkčnosti (schopnost fagocytovat a enkapsulovat parazity, tvorba humorálních faktorů atd.) tvoří základní prvek zajišťující obranu měkkýšů před parazity a především obranu plžů proti larvám motolic.

V současné době se výzkum obranných mechanismů měkkýšů zaměřuje především na molekulární podstatu dějů probíhajících v rámci obranných reakcí, na charakterizaci specifických látek zapojujících se do imunitní odpovědi, jako jsou například nejrůznější bioaktivní peptidy a cytokiny a také na způsoby, jakými je vnitřní obranný systém měkkýšů ovlivňován produkty parazitů.

Opakovaně se „vynořující“ výskyt cercáriové dermatitidy, jeho ekonomický dopad a možná patogenita ptačích schistosom pro člověka jsou důvody pro jejich další výzkum.

Data uvedená v této práci budou tvořit informační základ pro můj výzkum v navazujícím magisterském studiu. Během něj se budu snažit charakterizovat především buněčnou imunitní reakci plžů rodu *Radix* na nákazu ptačími schistosomami rodu *Trichobilharzia*. Dále je mým cílem charakterizovat hemocyty plžů tohoto rodu z hlediska morfologie, porovnat hemocyty infikovaných plžů s hemocyty zdravých plžů a srovnat imunitní reakci různých druhů plžů rodu *Radix* na infekci různými druhy rodu *Trichobilharzia*. Svými výsledky chci přispět k objasnění fenoménu specifity vztahů parazitů s jejich hostiteli.

2.5 Použitá literatura

- Adema C.M., van Deutekom-Mulder E.C., van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A., Sminia T. 1991:** Generation of oxygen radicals in haemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology* 15:17-26
- Adema C.M., Van der Knaap W.P.W., Sminia T. 1991:** Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4:201-223
- Adema C.M., van Deutekom-Mulder E.C., van der Knaap W.P.W., Sminia T. 1994:** Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology* 109:479-485
- Amen R.I., Tijnagel J.M., van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A., de Lange-de Klerk E.S., Sminia T. 1991:** Effects of *Trichobilharzia ocellata* on hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology* 15:105-115
- Bachere E., Chagot D., Grizel H. 1988:** Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental and Comparative Immunology* 12:549-559
- Bayne C.J., Loker E.S. 1987:** Survival within the snail host. In: Rollinson D., Simpson A.J.G. (Eds) *The biology of schistosomes: from genes to latrines*. Academic Press, San Diego, 321-346
- Blažová K., Horák P. 2005:** *Trichobilharzia regenti*: The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* 54:167-172
- Connors V.A., Yoshino T.P. 1990:** *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology* 76:895-902
- Conte A., Ottaviani E. 1995:** Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters* 365:120-124
- Couch L., Hertel L.A., Loker E.S. 1990:** Humoral responses of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: observations on a circulating hemagglutinin. *The Journal of Experimental Zoology* 255:340-349

- Crews A.E., Yoshino T.P. 1989:** *Schistosoma mansoni*: effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* 68:326-334
- De Jong-Brink M., Elsaadany M., Solis Soto M. 1991:** The occurrence of schistosomin, an antagonist of female gonadotropic hormones, is a general phenomenon in haemolymph of schistosome-infected freshwater snails. *Parasitology* 103:371-378
- De Jong-Brink M., Hoek R.M., Smit A.B., Bergamin-Sassen M.J.M., Lageweg W. 1995:** *Schistosoma* parasites evoke stress response in their snail host by a cytokine-like factor interfering with neuro-endocrine mechanisms. *Netherlands Journal of Zoology* 45:113-116
- De Jong-Brink M. Bergamin-Sassen M., Solis Soto M. 2001:** Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology* 123:129-141
- Dikkeboom R., van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A., Sminia T. 1984:** Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research* 238:43-47
- Dikkeboom R., Tijnagel J.M.G.H., Mulder E.C., van der Knaap W.P.W. 1987:** Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *Journal of Invertebrate Pathology* 49:321-331
- Dikkeboom R., van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A., Sminia T. 1985:** A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology* 55: 547-553
- Dikkeboom R., Bayne J.C., van der Knaap W.P.W., Tijnagel J.M.G.H. 1988:** Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitology Research* 75:148-154
- El-Ansary A. 2003:** Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136:227-243
- Franchini A., Fontanili P., Ottaviani E. 1995:** Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology* 110:403-407
- Fryer S.E., Bayne C.J. 1996a:** Host-parasite interactions in molluscs. In: B.Rinkevich and W.E.G. Müller (Eds.), *Invertebrate Immunology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 131-153

- Horák P. 2004:** New trends in the research of bird schistosomes. IX European Multicolloquium of Parasitology
- Horák P., Deme R. 1998:** Lectins and saccharides in *Lymnaea stagnalis* haemocyte recognition. *Comparative Haematology International* 8:210-218
- Horák P., Kolářová L. 2005:** Molluscan and vertebrate immune responses to bird schistosomes. *Parasite Immunology* 27:247-255
- Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. 1999:** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology* 119:577-581
- Horák P., van der Knaap W.P.W. 1997:** Lectins in snail-trematode interactions: a review. *Folia Parasitologica* 44:161-172
- Hordijk P.L., Schallig H.D.F.H., Ebberink R.H.M., de Jong-Brink M., Joosse J. 1991:** Primary structure and origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biochemical Journal* 279:837-842
- Hrádková K., Horák P. 2002:** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* 76:137-141
- Kamiya H., Muramoto K., Goto R., Sakai M., Yamazaki M. 1989:** Antibacterial protein(s) in the secretion of a sea hare *Aplysia juliana*. *Developmental and Comparative Immunology* 13:450
- Kolářová L., Rudolfová J., Hampl V., Skírnisson K. 2006:** *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.)(Anatidae). *Parasitology International* 55:179-186
- Lie K.J., Heyneman D., Richards C.S. 1977:** Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 29:118-125
- Lodes M.J., Yoshino T.P. 1990:** The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *Journal of Invertebrate Pathology* 56:75-85
- Loker E.S., Couch L., Hertel L.A. 1994:** Elevated agglutination titres in plasma of *Biomphalaria glabrata* exposed to *Echinostoma paraensei*: characterization and functional relevance of a trematode-induced response. *Parasitology* 108:17-26
- Loker E.S., Bayne C.J. 1986:** Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. *Symposium of Zoological Society of London* 56:199-220

Loker E.S., Bayne C.J. 1982: *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 31:999-1005

Mohandas A., Adema C.M., van der Knaap W.P.W., Sminia T. 1992: The effect of haemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in *Lymnaea stagnalis* haemocytes: a cytochemical study. Comparative Haematology International 2:61-67

Monteil J.F., Matricon-Gondran M. 1991: Interactions between the Snail *Lymnaea truncatula* and the plagiourchiid trematode *Haplometra cylindracea*. Journal of Invertebrate Pathology 58:127-135

Monteil J.F., Matricon-Gondran M. 1991: Hemocyte production in trematode-infected *Lymnaea truncatula*. Parasitology Research 77:491-497

Monroy F.P., Loker E.S. 1993: Production of heterogenous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology 79:416-423

Monroy F., Hertel L.A., Loker E.S. 1992: Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: Strain specificity and the effects of trematode infection. Developmental and Comparative Immunology 16:355-366

Núñez P.E., de Jong-Brink M. 1997: The suppressive excretory-secretory product of *Trichobilharzia ocellata*: a possible factor for determining compatibility in parasite-host interactions. Parasitology 115:193-203

Núñez P.E., Molenaar M.J., Lageweg W., Li K.W., de Jong-Brink M. 1997: Excretory-secretory products of *Trichobilharzia ocellata* and their modulating effects on the internal defence system of *Lymnaea stagnalis*. Parasitology 114:135-144

Ottaviani E. 2006: Molluscan immunorecognition. Invertebrate Survival Journal 3:50-63

Ottaviani E. 1983: The blood cell of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). Developmental and Comparative Immunology 7:209-216

Ottaviani E. 1992: Presence of a memory-type response in the freshwater snail *planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). Zoologische Jahrbücher für Physiologie 96:291-298

Ottaviani E., Franchini A., Cassanelli S., Genedani S. 1995: Cytokines and invertebrate immune responses. Biology of the Cell 85:87-91

Ottaviani E., Paeman L.R., Cadet P., Stefano G.B. 1993: Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *European journal of Pharmacology* 248:319-324

Richards C.S., Knight M., Lewis F.A. 1992: Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today* 8:171-174

Richards E.H., Renwranz L.R. 1991: Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺-dependent, GalNac-specific lectin and a Ca²⁺-independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognises activated homologous opsonins. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology* 161:43-54

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

Schallig H.D.F.H., Hordijk P.L., Oosthoek P.W., de Jong-Brink M. 1991: Schistosomin, a peptide present in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail's central nervous system. *Parasitology Research* 77:152-156

Schmid L.S. 1975: Chemotaxis of hemocytes from the snail *Viviparus malleatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 25:125

Sminia T. 1972: Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Cell and Tissue Research* 130:497-526

Sminia T. 1974: Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell and Tissue Research* 150:443-454

Sminia T., Borghart-Reinders E., van de Linde A.W. 1974: Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. An electron microscopic and autoradiographic study. *Cell and Tissue Research* 153:307-326

Sminia T., Barendsen L. 1980: A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. *Journal of Morphology* 165:31-39

Sminia T., Boer H.H., Niemantsverdriet A. 1972: Haemoglobin producing cells in freshwater snails. *Cell and Tissue Research* 135:563-568

- Sminia T., Vlugt-van Daalen I.E. 1977:** Haemocyanin synthesis in pore cells of the terrestrial snail *Helix aspersa*. Cell and Tissue Research 183:299-301
- Sorensen R.E., Minchella D.J. 1998:** Parasite influences on host life history: *Echinostoma revolutum* parasitism of *Lymnaea elodes* snails. Oecologia 115:188-195
- Van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A. 1986:** Interaction between the immune system of lymnaeid snails and trematode parasites. Symposium of Zoological Society of London 56:179-198
- Van der Knaap W.P.W., Loker E.S. 1990:** Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitology Today 6:175-182
- Van der Knaap W.P.W., Sminia T., Schutte R., Boerrigter-Barendsen L.H. 1983:** Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*. Immunology 48:377-383
- Van der Knaap W.P.W., Adema C.M., Sminia T. 1992:** Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Comparative Haematology International 3:20-26
- Van der Knaap W.P.W., Sminia T., Kroese F.G.M., Dikkeboom R. 1981:** Elimination of bacteria from the circulation of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Developmental and Comparative Immunology 5:21-32
- Van der Knaap W.P.W., Meuleman E.A., Sminia T. 1987:** Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitology Research 73:57-65
- Van der Knaap W.P.W., Boots A.M.H., van Asselt L.A., Sminia T. 1983:** Specificity and memory in increased defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Developmental and Comparative Immunology 7:435-443
- Van der Knaap W.P.W., Boerrigter-Barendsen L.H., van den Hoeven D.S.P., Sminia T. 1981:** Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Cell and Tissue Research 219:291-296

<http://www.who.int/schistosomiasis/en/> 2007

<http://www.who.int/tdr/index.html> 2004

<http://members.aol.com/mkohl2/Lymnaeidae.html> 2007

www.weichtiere.at/english/gastropoda 2005