

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Holečková

Imunomodulační vlastnosti TES

Immunomodulatory properties of TES

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Praha, 2019

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, 10. 1. 2019

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a za ochotu a trpělivost, se kterou vedl mou bakalářskou práci.

Abstrakt

Mezi parazitické škrkavky řadíme škrkavku psí (*Toxocara canis*) a škrkavku kočičí (*Toxocara cati*). Jejich definitivním hostitelem jsou psovitě, respektive kočkovité šelmy. Pokud tyto škrkavky napadnou člověka, způsobují onemocnění zvané toxokaróza. V těle hostitele produkují škrkavky proteiny souhrnně nazývané TES (Toxocara Excretory-Secretory antigens), jejichž cílem je zajistit dlouhodobé přežití parazita ve tkáních hostitele. Některé z těchto proteinů vytvářejí obal na povrchu larvy, který zvyšuje šanci parazita na přežití. Další proteiny, které larvy produkují, ovlivňují produkci cytokinů hostitelského organismu, čímž regulují jeho imunitní odpověď. Přítomnost larev škrkavky v napadeném organismu má za následek inhibici imunitní odpovědi založené na Th1 buňkách a podporu Th2 imunitní odpovědi, při které mimo jiné dochází ke zvýšení koncentrace IgE a eosinofilů. Také je podporována tvorba regulačních T lymfocytů.

Klíčová slova

Toxocara spp., toxokaróza, TES, imunomodulace, regulační T lymfocyty, cytokiny

Abstract

Toxocara canis and *Toxocara cati* are parasitic roundworms. Their definite hosts are canines or felines. Human infection is also possible and in that case these parasites cause human toxocariasis. Larvae of *Toxocara* spp. in the host release proteins called TES (Toxocara Excretory-Secretory antigens). The main role of these proteins is to ensure long-term survival of the parasite in the body of the host. The surface of the larvae is covered by coat made of some of those proteins, which increases the parasite's chances of survival. Other proteins secreted by *Toxocara* spp affect production of cytokines of the infected organism and parasite modulates the immune response to infection by that. Presence of the larvae results in inhibition of immune response based on Th1 cells and promotes Th2 immune response, during which levels of IgE and eosinophiles are elevated. Production of regulatory T lymphocytes is also stimulated.

Key words

Toxocara spp., toxocariasis, TES, immunomodulation, regulatory T lymphocytes, cytokines

Obsah

Seznam zkratk	i
1 Úvod	1
2 Škrkavky (<i>Toxocara</i> spp.)	2
2.1 Vývoj v definitivním hostiteli	3
2.2 Paratenický hostitel	4
3 Larvální toxokaróza	6
3.1 Útrobní larvální toxokaróza (larva migrans visceralis)	6
3.2 Oční larvální toxokaróza (larva migrans ocularis)	6
3.3 Neurotoxokaróza	7
3.4 Skrytá toxokaróza	7
4 Diagnostika	8
5 Proteiny produkované <i>Toxocara</i> spp.	9
5.1 TES-26	9
5.2 TES-32	9
5.3 TES-70	10
5.4 TES-120	10
6 Interakce imunitního systému se škrkavkami	11
6.1 CD4+ T lymfocyty	11
6.1.1 Th1 buňky	11
6.1.2 Th2 buňky	11
6.1.3 Th17 buňky	12
6.1.4 Treg buňky	12
6.2 Reakce imunitního systému na helminty	13
7 Interakce imunitního systému s TES	14
8 Závěr	17
9 Seznam použité literatury	18

Seznam zkratek

APC	buňka předkládající antigen, z anglického antigen presenting cell
CD	diferenční antigen, z anglického cluster of differentiation
CNS	centrální nervový systém
C-TLs	C-lektiny, z anglického C-type lectins
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, analytická metoda pro stanovení koncentrace antigenů
ES	excretory-secretory antigen
IFN- γ	interferon γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ILC	přirozená lymfoidní buňka, z anglického innate lymphoid cell
iTr35	indukované regulační T lymfocyty produkující IL-35, z anglického induced IL-35 producing regulatory T lymphocytes
iTreg	indukované regulační T lymfocyty, z anglického induced regulatory T lymphocytes
kDa	kilodalton
MHC	hlavní histokompatibilní komplex, z anglického major histocompatibility complex
OLM	oční larvální toxokaróza, z anglického ocular larva migrans
spp.	druhy, z latinského species
Tc	cytotoxické T lymfocyty, z anglického T cytotoxic lymphocytes
Tc-CTL	C-lektin produkovaný <i>Toxocara canis</i> , z anglického <i>Toxocara canis</i> C-type lectin
Tc-PEB	protein vázající fosfatidylethanolamin produkovaný <i>Toxocara canis</i> , z anglického <i>Toxocara canis</i> phosphatidylethanolamine binding protein
TCR	receptor T buněk, z anglického T cell receptor
TES	toxocara excretory-secretory antigen
TGF- β	transformující růstový faktor β , z anglického transforming growth factor β

Th	pomocné T lymfocyty, z anglického T helper lymphocytes
TNF- α	faktor nekrotizující nádory α , z anglického tumor necrosis factor α
Tr1	regulační T lymfocyty typu 1, z anglického type 1 regulatory T lymphocytes
Treg	regulační T lymfocyty, z anglického regulatory T lymphocytes
TSLP	thymový stromální lymfopoietin, z anglického thymic stromal lymphopoietin
VLM	útrobní larvální toxokaróza, z anglického visceral larva migrans
WB	Western Blot, analytické metoda pro detekci specifického antigenu

1 Úvod

Člověk se může stát hostitelem celé řady parazitických helmintů. Někteří se v lidském těle dokážou dále rozmnožovat, pro jiné je nakažení člověka slepou cestou, která nevede k produkci potomků. Místo toho většinou vytvářejí cysty v různých tkáních a mohou tím způsobovat nejrůznější zdravotní potíže.

V této práci se budu věnovat škrkavkám rodu *Toxocara*, konkrétně jejich dvěma druhům – *Toxocara canis* a *Toxocara cati*. Jedná se o parazity psovítych, respektive kočkovítych šelem. Jen v těchto definitivních hostitelích dokončují škrkavky svůj životní cyklus. Mohou napadat i jiná zvířata, ve kterých ovšem nedochází k množení parazitů. Místo toho larvy škrkavek vytváří cysty ve tkáních těchto hostitelů. K tvorbě cyst dochází i v případě infekce člověka.

Přítomnost encystovaných larev ve tkáních člověka způsobuje onemocnění zvané toxokaróza. Vzhledem k tomu, že larvy mohou putovat do rozdílných tkání, jsou projevy toxokarózy různorodé. Podle toho, jaká tkáň je napadena, rozlišujeme čtyři základní typy toxokarózy – orgánová formu, oční formu, neurotoxokarózu a skrytou toxokarózu.

Aby larvy dokázaly přežít v těle hostitele, produkují řadu proteinů. Některé z nich tvoří obal kolem larvy parazita, na který se navážou eosinofily hostitele a který poté škrkavka odvrhne. Jiné vykazují vysokou míru podobnosti s proteiny, které produkuje hostitelský organismus, a slouží k regulaci imunitní odpovědi hostitele.

V této práci se budu zabývat tím, jak interaguje imunitní systém hostitele s larvami toxokary. Nejprve popíšu příznaky, které přítomnost parazita v lidském organismu vyvolává. Poté se zaměřím na to, jak proteiny produkované larvami škrkavky ovlivňují imunitní odpověď hostitele, především jaké působí změny v produkci cytokinů, které ovlivňují diferenciaci CD4⁺ lymfocytů, a to zejména při pokusech využívajících myší modely i při experimentech *in vitro*.

2 Škrkavky (*Toxocara* spp.)

Škrkavky, konkrétně *Toxocara* spp., jsou parazitičtí červi patřící do kmene *Nematoda*, řádu *Ascaridida*, nadčeledi *Ascaroidea*. Mezi *Toxocara* spp. patří například parazit infikující psy a jiné psovitě šelmy *Toxocara canis* (škrkavka psi) a parazit napadající kočkovité šelmy *Toxocara cati* (škrkavka kočičí).

Škrkavky řadíme mezi gonochoristické parazity s pohlavním dimorfismem, kteří mají protáhlé nesegmentované tělo, na průřezu kruhové, na povrchu pokryté třívrstevnou kutikulou bílé nebo krémové barvy. Ta je chrání před trávicími enzymy hostitele i před enzymy a toxiny produkovanými střevní mikrobiotou. Při přechodu mezi jednotlivými vývojovými stádii dochází ke svlékání kutikuly. Velikost druhů škrkavek, kterým se ve své práci věnuji, se liší. Zatímco samci druhu *Toxocara canis* dorůstají v dospělosti 4 až 10 centimetrů a samice 6 až 18 centimetrů, tělo škrkavek *Toxocara cati* je kratší a širší, samci dorůstají velikosti 3 až 6 centimetrů, samice 4 až 12 centimetrů. (Douglas a Baker, 1966; cit. dle Glickman a Schantz, 1981)

Dospělé škrkavky žijí v tenkém střevě a živí se především tráveninou, ale i buňkami a krví hostitele. Samice klade ve střevě nahnědlá téměř kulatá vajíčka o velikosti asi 75–85 mikrometrů, která odcházejí spolu se stolicí hostitele. Glickman a Schantz uvádějí, že během jednoho dne je samice schopna naklást až 200 000 vajíček. (V jiných zdrojích se tento údaj mnohdy liší, někteří zmiňují 20 000 vajíček za den, jiní sice stejné číslo, ale vztahují ho k celému životu samice škrkavky.) Ve vnějším prostředí potřebují vajíčka nejprve dozrát, aby se stala infekčními. Tato fáze, kdy parazit ještě není infekční, trvá přibližně 2 až 6 týdnů. Ve vajíčku se larva dvakrát svléká a prochází tak postupně třemi larválními stádii (L1, L2 a L3.) Ve stádiu L3 je larva schopná přežít ve vhodném prostředí až tři roky. Pokud se tato infekční larva dostane do definitivního hostitele, následuje další růst a přeměna do stádia L4 a poté do dospělého jedince. Kromě definitivního hostitele může být larva pozřena i hostitelem paratenickým, tedy takovým, ve kterém nedochází k vývoji v dospělého jedince. Mezi paratenické hostitele škrkavek patří například hlodavci, ptáci, prasata, králíci a primáti, tedy i člověk. V následujících odstavcích se budu věnovat životnímu cyklu toxokary, který je také zobrazen níže na obrázku 1.

2.1 Vývoj v definitivním hostiteli

Po pozření vajíčka definitivním hostitelem, v případě *Toxocara canis* tedy psovitou šelmou, v případě *Toxocara cati* šelmou kočkovitou, dochází k dalšímu vývoji. V tenkém střevě se z vajíček vylíhnou larvy, které pronikají stěnou střeva do krevního oběhu a tělních tkání. Larvy se dostanou do plic, odkud jsou vykašlány do ústní dutiny a opět spolknuty. Poté, co se takto podruhé dostanou do tenkého střeva, larvy dospějí a dochází zde k reprodukci. Oplodněné samice škrkavek pak produkují velké množství vajíček, která odcházejí z těla hostitele spolu s trusem.

Výše popsany vývoj, který prodělaly larvy, se nazývá enterohepatopulmonální migrace. Ne vždy se však larva v definitivním hostiteli vyvine až do dospělého jedince, často nastane somatická migrace, při které se larvy akumulují ve tkáních, kde následně encystují. Zda dojde k enterohepatopulmonální nebo somatické migraci je ovlivněno mnoha faktory.

Pokud je vajíčky nakaženo mládě hostitele, migrují ve většině případů larvy do plic a následně se vyvíjejí v dospělého jedince. U starších zvířat je pravděpodobnější, že larvy vycestují do tkání, kde encystují. U *Toxocara canis* je tato věková rezistence výraznější – pokud se nakazí dospělý pes, je jen velmi malá šance, že se larvy dostanou do plic a poté do střeva. U *Toxocara cati* je věková rezistence méně výrazná, i u dospělých koček může parazit dospět, děje se to ale méně často než u nakažených mláďat.

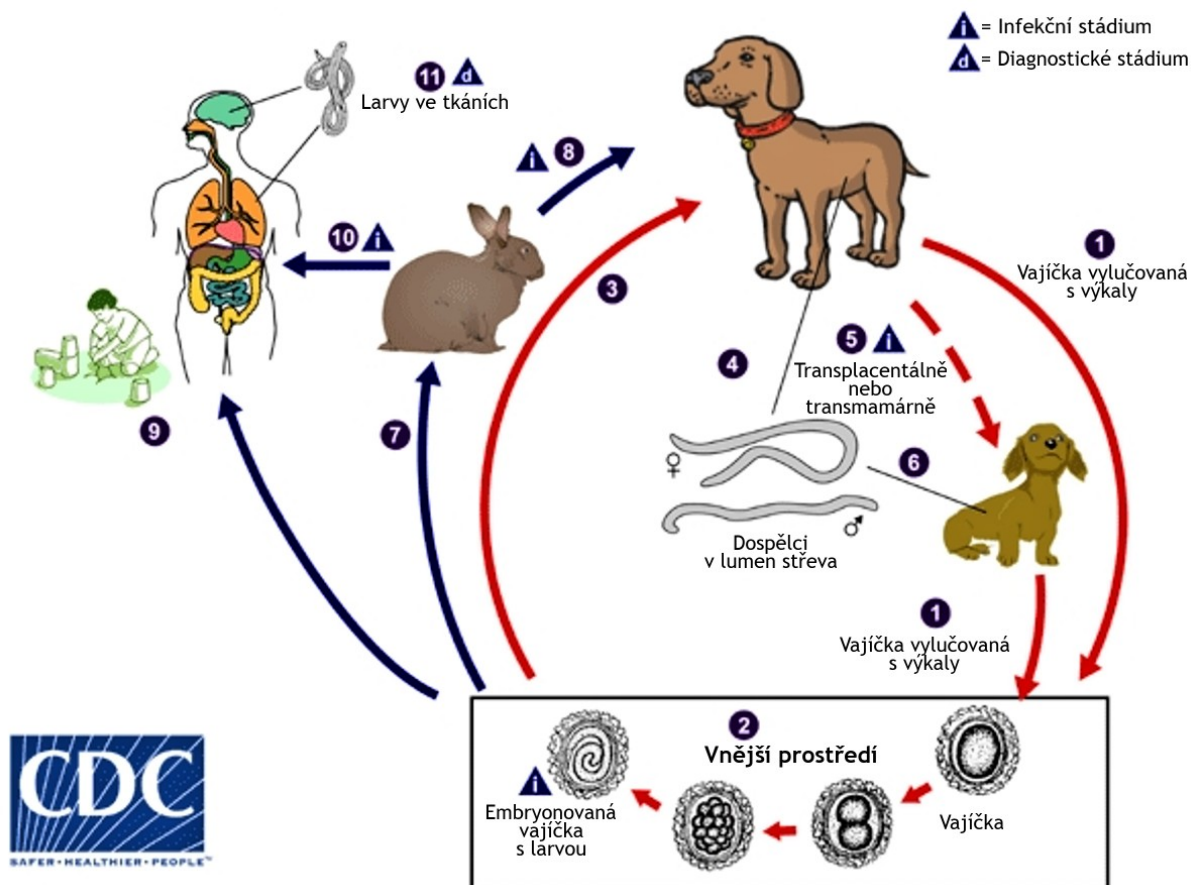
Larvy, které jsou encystované ve tkáni samice, která následně zabřezne, se mohou vlivem hormonů opět reaktivovat. (Oshima, 1961) Poté putují buď přes placentu do vyvíjejících se plodů, nebo do mléčných žláz samice. U psovitých šelem dochází k transplacentálnímu přenosu parazita z feny s chronickou nákazou na plod přibližně v 98 % případů a jen v necelých 2 % se štěňata nakazí transmamárně, tedy kojením od infikované matky. (Burke a Robertson, 1985) U březích koček nastává migrace larev především do mléčných žláz a infekce se přenáší ve většině případů transmamárně. (Coati a kol., 2004) Po porodu nebo po nákaze přes mateřské mléko migrují larvy do plic mláďate a poté dospívají v jeho střevech.

Dalším způsobem, jak může proběhnout nákaza škrkavkou, je pozření paratenického hostitele, v jehož tkáních jsou larvy encystovány. Larvy, které byly v paratenickém hostiteli encystovány a jejichž vývoj se zastavil ve stádiu L3, pokračují ve svém vývoji poté, co se dostanou do střev definitivního hostitele.

2.2 Paratenický hostitel

Přestože k vývoji v dospělého jedince a ke svému rozmnožování potřebuje parazit, aby byla jeho vajíčka pozřena výhradně psy, respektive kočkami, k samotnému vylíhnutí vajíček může dojít i po jejich pozření jinými živočichy. Stejně jako v definitivním hostiteli, i v těchto paratenických hostitelích se larvy vylíhnou a prostoupí skrz střevní stěnu do krve. Nedostanou se ale do plic, místo toho zůstávají v nejrůznějších tkáních hostitele.

Přestože v paratenickém hostiteli nemohou larvy dospět a tím pádem se škrkavka nerozmnoží, mají i tito hostitelé význam v přenosu parazita. Jak již bylo zmíněno, mohou být pozřeni psovitou či kočkovitou šelmou, čímž se parazit dostane do definitivního hostitele. Stejně jako v definitivním hostiteli, i v nakažených paratenických hostitelích může docházet k vertikálnímu přenosu z matky na potomky. Význam pro rozmnožení parazita má takovýto přenos především u hlodavců a dalších malých savců, kteří se rychle množí, a tím parazit zvyšuje šanci, že některé z nakažených zvířat bude uloveno kočkovitou či psovitou šelmou, tedy definitivním hostitelem.



Obrázek 1: Životní cyklus *Toxocara canis*

Popis životního cyklu: 1) Vajíčka jsou vyloučena s trusem definitivního hostitele. 2) Vajíčka dozrávají ve vnějším prostředí a stávají se infekčními. 3) Vajíčka jsou pozřena psy. 4) Infekční vajíčko se vylíhne a larvy penetrují stěnu střeva. V mladších psech migrují larvy přes plíce, bronchiální strom a jícen. Dospělý červ začne klást vajíčka v tenkém střevě. 5) Ve starších psech může také dojít k takovému vývoji, častější je ale encystace larev ve tkáních. V samicích jsou encystované larvy aktivovány v průběhu březosti a infikují štěňata přes placentu nebo přes mateřské mléko. 6) V tenkém střevě štěňat se vajíčka usídlí. Štěňata jsou hlavním zdrojem kontaminace prostředí vajíčky toxokary. 7) *Toxocara canis* může být také přenášena pozřením paratenického hostitele. Vajíčka pozřená malými savci (například králíky) se vylíhnou, larvy penetrují stěnu střeva a migrují do různých tkání, kde se encystují. 8) Životní cyklus je dokončen, když psi snědí tyto paratenické hostitele. 9) Člověk se stává hostitelem nahodile, když pozře infekční vajíčka v kontaminované půdě. 10) Může také pozřít vajíčka v paratenickém hostiteli. 11) Po pozření se vajíčka vylíhnou, larvy penetrují stěnu tenkého střeva a jsou krevním oběhem roznesena do různých tkání (játra, srdce, plíce, mozek, svaly, oči). V těchto tkáních nedochází k žádnému dalšímu vývoji.¹

¹ Převzato, přeloženo a upraveno z CDC - Toxocariasis - Biology. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/biology.html> [poslední přístup 10. 1. 2019].

3 Larvální toxokaróza

Larvální toxokaróza je nemoc způsobená encystovanými larvami *Toxocara canis* nebo *Toxocara cati* v paratenickém hostiteli. Rozlišit, zda se jedná o nákazu *Toxocara canis*, nebo *Toxocara cati* je problematické, protože příznaky nákazy jsou v obou případech podobné. Ani diagnostika pomocí protilátek nemusí být specifická, protože dochází ke křížové reaktivitě mezi antigeny *T. canis* a *T. cati*. Jelikož larvy mohou migrovat do nejrůznějších orgánů, může se i larvální toxokaróza projevovat širokou škálou příznaků dle postiženého orgánu. Rozlišujeme čtyři základní formy toxokarózy podle orgánů, ve kterých se larvy nacházejí, nebo podle různých příznaků, kterými trpí nemocný. (Fan a kol., 2015)

3.1 Útrobní larvální toxokaróza (larva migrans visceralis)

Útrobní larvální toxokaróza (VLM, Visceral Larva Migrans) je nejčastější formou toxokarózy, která je způsobena větším množstvím larev v různých měkkých tkáních a orgánech. Poprvé byla popsána v 50. letech 20. století u dětí se zvětšenými játry a hypereosinofilií. (Beaver a kol., 1952; Beaver, 1956) Nejčastěji se vyskytuje u dětí ve věku od jednoho roku do sedmi let v důsledku nižších hygienických návyků, častějšího hraní si s hlinou a zvyku olizovat si špinavé prsty. Ohroženější jsou ty děti, které přicházejí do styku se štěňaty či koťaty. VLM se nicméně může vyskytnout i u dospělých. Mezi příznaky VLM patří horečka, malátnost, snížená chuť k jídlu, neklidnost, kašel, sípavost, astma, zvětšení jater a hypereosinofílie (Magnaval a kol., 2001).

3.2 Oční larvální toxokaróza (larva migrans ocularis)

Při oční larvální toxokaróze (OLM, Ocular Larva Migrans) se larvy vyskytují v očích. Pro projevení této formy toxokarózy stačí nákaza menším množstvím larev než v případě VLM. Tato forma toxokarózy je mnohem méně častá. Nakaženy jsou nejčastěji děti v mladším školním věku, ale mohou se nakazit i starší děti či mladí dospělí. Ve většině případů je postiženo jen jedno oko. Nákaza může způsobovat záněty v oku (uveitida, hyalitida, chorioretinitida) (Fillaux a Magnaval, 2013), často se projevuje nálezem granulomu na periferii či zadní části oka, může vést až k odchlípení sítnice. (Arevalo a kol., 2012) V některých případech může být oční toxokaróza příčinou oslepnutí. (Taylor, 2001) OLM může ale probíhat i téměř bez příznaků a k její diagnóze může dojít až při náhodné lékařské prohlídce očí. (Good a kol., 2004)

3.3 Neurotoxokaróza

Při neurotoxokaróze, (též cerebrální toxokaróze), je napaden centrální nervový systém (CNS). U lidí je výskyt tohoto onemocnění málo doložen. Při experimentech na zvířatech docházelo velice často při nákaze toxokarou k napadení CNS (Magnaval a kol., 2001), ale u člověka bylo zatím zdokumentováno jen asi sto případů neurotoxokarózy. (Deshayes a kol., 2016) Oproti VLM jsou příznaky neurotoxokarózy nespecifické, přítomnost larev v CNS může způsobovat řadu onemocnění, u žádného z nich ale není toxokara výlučným spouštěčem. (Magnaval a kol., 1997) V některých případech nákazy proto pravděpodobně nedochází k diagnóze neurotoxokarózy, přestože je nervový systém člověka infikován. Mezi onemocnění způsobené neurotoxokarózou patří například meningitida, encefalitida, meningoencefalitida nebo myelitida. Neurotoxokaróza se pravděpodobně také může podílet na vzniku schizofrenie či kognitivních poruch. (Fan a kol., 2015)

3.4 Skrytá toxokaróza

Skrytá toxokaróza je forma toxokarózy nevyznačující se specifickými příznaky. K jejímu objevu vedla vysoká séroprevalence, ale relativně málo zaznamenaných případů VLM. (Glickman a kol., 1987; Taylor a kol., 1988) Její příznaky jsou mírné a nespecifické, jedná se například o trávicí obtíže a bolesti břicha, různé alergické reakce organismu, kašel, nevolnost, bolest hlavy, u dětí poruchy spánku. Diagnostika tohoto typu toxokarózy je obtížná a nemoc většinou zůstane neodhalená.

4 Diagnostika

Toxokaróza je velmi časté onemocnění. Diagnostika této nemoci je ale poměrně obtížná, protože se jen v malém počtu případů nákazy projeví jednoznačné příznaky. V případě skryté toxokarózy lze nemoc odhalit jen specifickými krevními testy.

Larvy škrkavek produkují proteiny, které se souhrnně nazývají TES antigeny (Toxocara Excretory-Secretory antigens). Nejspolehlivějším a nejčastějším způsobem diagnostiky toxokarózy je pomocí detekce těchto proteinů. K tomu se využívá metoda ELISA (Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay) a výsledky se potvrzují metodou WB (Western Blot). (Despommier, 2003) Nevýhoda diagnostiky pomocí metody ELISA je její neschopnost rozlišit mezi antigeny toxokary a antigeny některých jiných helmintických parazitů, tedy její nespecifičnost. WB je pro diagnostiku toxokarózy přesnější, protože využívá proteiny o nižší molekulové hmotnosti, ale metoda WB je výrazně dražší než ELISA, proto se používá až k potvrzení diagnózy. (Nicoletti, 2013) Pro detekci toxokarózy se využívá především antigenů TES-120, TES-32 a TES-26, o kterých bude řeč později.

Při diagnostice pomocí antigenů toxokary jsou většinou detekovány antigeny parazita *Toxocara canis*, protože toxokaróza je častěji způsobena právě škrkavkou psí než kočičí. Antigeny *Toxocara cati* též často reagují stejně jako antigeny *Toxocara canis*. Proto i v případě, že onemocnění způsobuje *Toxocara cati*, dojde většinou k detekci parazita i při použití testu, jehož primárním cílem jsou antigeny druhého druhu. Přestože díky nespecifičnosti metody ELISA lze odhalit nákazu *T. cati* stejnými testy, jaké se používají pro detekci *T. canis*, nejedná se o ideální způsob detekce *T. cati*. Při pokusech s rekombinantními TES-120 produkovaných *T. cati* se ukázalo, že pro diagnózu nákazy způsobovanou *T. cati* se jedná o spolehlivější variantu. (Zahabium a kol., 2015) Využití specifické detekce *T. cati* by mohlo mít význam především v oblastech, kde je výrazně vyšší výskyt koček než psů, například v některých arabských zemích.

Pro diagnostiku se většinou používají přirozené TES, ale možné je i použití rekombinantních TES. Pokusy s rekombinantními antigeny (konkrétně s TES-120, TES-30 a TES-26) ukázaly vysokou citlivost a specifičnost pro diagnostiku toxokarózy. (Mohamad a kol., 2009) Ne všechny rekombinantní antigeny, které lze použít pro diagnostiku u lidí, je vhodné používat v případě pokusů na myších. Zatímco rekombinantní TES-30 je použitelný i v případě myší, rekombinantní TES-120 se ukázal jako nevhodný. (dos Santos a kol., 2018)

5 Proteiny produkované *Toxocara* spp.

Na povrchu larev *Toxocara* spp. se nachází obal z proteinů, který slouží k ochraně před imunitním systémem hostitele. Díky němu může larva přežívat v paratenickém hostiteli mnoho let i bez toho, aby byla započata adekvátní imunitní reakce, která by parazita zahubila. Larva škrkavky může produkovat velké množství TES o celkové hmotnosti představující až 1 % vlastní váhy larvy denně. (Meghji a Maizels, 1986)

Mezi TES se řadí velké množství různých proteinů, které můžeme rozdělit do několika hlavních skupin: muciny, C-lektiny a fosfatidylethanolamin vážící proteiny. (Maizels a kol., 2000) Mezi nejdůležitější popsané proteiny patří například TES-26, TES-32, TES-70 a TES-120. (Długosz a kol., 2015) U některých TES antigenů je popsán způsob, jakým interagují s imunitním systémem hostitele, ale u mnohých proteinů, které byly objeveny jako produkty toxokary, není dosud jasné, jakou mají funkci. Konkrétní označení TES antigenů jsou určena molekulovou hmotností daného proteinu – například TES-32 je glykoprotein o hmotnosti 32 kDa.

5.1 TES-26

Jedním z prvních izolovaných a naklonovaných TES antigenů *Toxocara* spp. byl TES-26. (Maizels a kol., 2000) Funkcí tohoto proteinu je vázat fosfatidylethanolamin, proto alternativní označení tohoto proteinu je Tc-PEB-1. Přestože se jedná o alternativu k savčímu proteinu vázajícímu fosfatidylethanolamin, v chemickém složení se TES-26 liší od homologních proteinů jiných druhů se stejnou funkcí. (Maizels, 2013)

5.2 TES-32

Jedním z nejdůležitějších TES antigenů toxokary je TES-32. Patří mezi C-lektiny, proto bývá také označován jako Tc-CTL-1. Jedná se o glykoprotein strukturou i funkcí velmi podobný savčím C-lektinům (C-TLs). Je schopný vázat na svém povrchu molekuly jak manosového tak galaktosového typu. (Loukas a kol., 1999) Svou strukturou vykazuje asi 20 až 30 % podobnost například s makrofágovým receptorem vázajícím manosu nebo s makrofágovým asialoglykoproteinovým receptorem. (Etebar a kol., 2018) Receptor na povrchu makrofágů je zodpovědný za řízení fagocytózy mikroorganismů. (Weis a kol., 1998)

5.3 TES-70

TES-70, nebo také Tc-CTL-4, patří, stejně jako TES-32, mezi C-lektiny. I tento protein produkováný larvami *Toxocara* spp. je schopný vázat proteiny hostitele namísto toho, aby byly navázány na hostitelovy molekuly C-lektinů. (Loukas a kol., 2000)

Pro larvu *Toxocara* spp. mají tyto (a další) lektiny pravděpodobně velký význam při unikání imunitnímu systému. TES-32 i TES-70 mají podobnou funkci jako C-lektiny hostitele. Ty jsou zodpovědné za řízení zánětlivé reakce i další interakce vedoucí k neutralizaci patogenů. (Weis a kol., 1998) Tím, že toxokara produkuje velké množství proteinů, které těmto receptorům hostitele konkurují, zabraňuje vzniku odpovídající imunitní odpovědi. (Loukas a kol., 2000; Maizels a kol., 2000)

5.4 TES-120

Glykoprotein TES-120 se řadí mezi muciny. Spolu s TES-32 patří k nejdůležitějším proteinům TES. V povlaku na povrchu larvy, který je asi 10 až 12 nm tlustý, se jedná o nejhojněji zastoupený glykoprotein. (Page a kol., 1992) Obal, který pokrývá celý povrch toxokary, je rozpoznáván buňkami imunitního systému. Poté, co se na něj navážou protilátky nebo granulocyty (především eosinofily), dokáže larva tento svůj obal odvrhnout a zbavit se tak spolu s ním i na něm navázaných protilátek a eosinofilů. (Smith a kol., 1981; Badley a kol., 1987)

6 Interakce imunitního systému se škrkavkami

6.1 CD4+ T lymfocyty

Na povrchu T lymfocytů se nacházejí receptory T buněk (TCR), které jsou klíčové pro rozpoznávání antigenů. T lymfocyty můžeme rozdělit na dva druhy, podle toho, zda tyto receptory obsahují transmembránové řetězce α a β nebo γ a δ . U člověka převažují T lymfocyty s $\alpha\beta$ -TCR.

T lymfocyty s $\alpha\beta$ -TCR můžeme dále rozlišovat podle toho, zda nesou koreceptor CD8, který se váže na MHC glykoproteiny I. třídy, nebo koreceptor CD4, který se váže na MHC glykoproteiny II. třídy. CD8+ T lymfocyty jsou ve většině případů prekursorem Tc (cytotoxic) buněk (cytotoxické T lymfocyty), zatímco CD4+ T lymfocyty jsou většinou prekursorem Th (helper) buněk (pomocné T lymfocyty). Mezi nejdůležitější pomocné T lymfocyty patří Th1, Th2, Th17, Treg (regulatory T lymphocytes, regulační T lymfocyty).

6.1.1 Th1 buňky

Imunitní reakce využívající Th1 buňky nastává v případě obrany organismu proti intracelulárním patogenům, například virům a některým bakteriím. Po rozpoznání takové infekce dochází k produkci cytokinu IL-12, který podporuje polarizaci naivních CD4+ T lymfocytů. TCR na povrchu prekurzorových buněk po setkání s buňkou prezentující antigeny (APC, antigen presenting cell) rozpozná patřičný antigen. Po obdržení kostimulačního signálu ve vhodném cytokinovém mikroprostředí dochází ke množení a k diferenciaci těchto buněk, čímž je spuštěna Th1 imunitní odpověď. Při tomto typu imunitní odpovědi spolupracují Th1 buňky s CD8+ T lymfocyty a s makrofágy, které se vlivem cytokinů produkovaných Th1 buňkami, především IFN- γ , mění na aktivované makrofágy. Produkce IFN- γ má také za následek další polarizaci Th buněk směrem k Th1 odpovědi a inhibici Th2 odpovědi. Th1 odpověď je také nazývána zánětlivou reakcí.

6.1.2 Th2 buňky

K imunitní odpovědi využívající Th2 buňky dochází v případě nákazy extracelulárními parazity, a to jak jednobuněčnými, tak mnohobuněčnými. Hrají tedy klíčovou roli právě při napadení organismu helminty. Do fenotypu Th2 buněk maturují CD4+ T lymfocyty v případě, že jejich TCR rozpoznají patřičný antigen na povrchu APC a zároveň jsou stimulovány cytokinem IL-4. Při imunitní odpovědi Th2 dochází ke spolupráci Th2 buněk s žírnými

buňkami, bazofily, eozinofily a B lymfocyty. Cytokin IL-5, který Th2 buňky produkují, způsobuje produkci a aktivaci eosinofilů. Cytokin IL-4 produkovaný Th2 buňkami spouští tvorbu imunoglobulinu IgE. Také je zodpovědný za další podporu Th2 odpovědi a inhibici Th1 odpovědi. (Mesquita Júnior a kol., 2010)

6.1.3 Th17 buňky

Dalším typem pomocných T lymfocytů jsou Th17 buňky. Ty jsou charakteristické produkcí cytokinu IL-17. Tento interleukin spolu s dalšími cytokiny má za následek zánětlivou reakci a přesun leukocytů, zejména neutrofilů, do místa zánětu. Tato imunitní odpověď je účinná zejména proti některým extracelulárním bakteriím a houbám. Pro diferenciaci naivních CD4+ buněk do Th17 buněk je zapotřebí cytokinů IL-6 a TGF- β . Odpověď Th17 je inhibována cytokiny produkovanými Th1, Th2 i Treg buňkami, naproti tomu cytokin IL-17 neinhibuje Th1 ani Th2 odpověď. (Nakae a kol., 2007)

6.1.4 Treg buňky

Rolí Treg buněk v organismu je udržování imunitní homeostázy. Potlačují přehnanou odpověď proti vnějším antigenům i proti antigenům vlastních tkání. (Ali a Rosenblum, 2017) Tím potlačují rozvoj autoimunitních onemocnění. Svou roli hrají i v imunitní odpovědi při infekci, kdy chrání tkáň před poškozením zánětlivou reakcí a produkcí amfipregulinu přispívají k rychlejší opravě již poškozené tkáně. (Arpaia a kol., 2015) Část Treg buněk dozrává v thymu (Jordan a kol., 2001), část jich vzniká z naivních periferních CD4+ buněk. (Chen a kol., 2003) Treg představují velmi heterogenní populaci buněk (zahrnující například iTreg, Tr1, iTr35 a Th3).

<i>T lymfocyty</i>	<i>produkované cytokiny</i>
Th1	IFN- γ , IL-2, TNF- α
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25
Th17	IL-17A, IL-21, IL-22,
Treg	TGF- β , IL-10, IL-35

6.2 Reakce imunitního systému na helminty

Helminti jsou široká skupina parazitů, kteří většinou zůstávají v hostiteli po dlouhou dobu, proto u nich došlo koevolucí k vývoji řady obranných mechanismů, aby nebyli hostitelem zahubeni. Když infikují hostitele, potřebují uniknout imunitní odpovědi. Především je pro jejich další vývoj klíčové, aby byli schopni dále v hostiteli přežít bez toho, aby ho poškodili natolik výrazně, že by toto poškození iniciovalo efektivní imunitní odpověď, která by parazita zahubila. (Mortan a kol., 2018) Proto je většina helmintů schopná v případě chronické nákazy měnit imunitní odpověď svého hostitele pomocí produkce ES (Excretory-Secretory) proteinů. (Nutman, 2015)

Po vstupu parazita do těla hostitele následuje akutní fáze imunitní odpovědi, kdy organismus hostitele identifikuje parazita a pokusí se ho zahubit a vyloučit z těla. První bariérou jsou pro parazita většinou buňky střevního epitelu, které jsou schopny při přítomnosti helmintů iniciovat Th2 imunitní odpověď, především atrakcí dendritických buněk, ale také přímo aktivací Th2 lymfocytů. (Bulek a kol., 2010) Pokud je epitelová buňka parazitem poškozena, produkuje cytokiny IL-25, IL-33 a TSLP (thymový stromální lymfopoietin, thymic stromal lymphopoietin). Ty poté podporují aktivaci buněk nespecifické imunity, které svou produkcí dalších cytokinů iniciují polarizaci CD4⁺ buněk na Th2 buňky, ovšem konkrétní role cytokinů produkovaných střevním epitelem při nákaze helminty není ještě zcela prozkoumána. (Oyesola a kol., 2018)

Výše zmíněné cytokiny produkované střevním epitelem stimulují přirozené lymfoidní buňky typu 2 (ILC2, Innate Lymphoid Cells) k produkci cytokinů IL-5 a IL-13. (Maizels a kol., 2012) Cytokinem IL-33 nejsou stimulovány jen ILC2, ale také řada dalších buněk přirozené imunity – basofily, eosinofily a mastocyty, které pod jeho vlivem produkuje cytokiny spjaté s Th2 odpovědí. (Yasuda a kol., 2012) Cytokinem IL-33 jsou stimulovány přímo také Th2 buňky, které poté produkuje cytokin IL-13. (Guo a kol., 2015) Přestože je většinou při iniciaci Th2 odpovědi přítomný cytokin IL-4, vlivem IL-33 ho z buněk přirozené imunity produkuje jen bazofily a mastocyty, (Yasuda a kol., 2012) nikoliv ILC2 buňky. Při rozvoji Th2 imunitní odpovědi, během kterého hrají klíčovou roli ILC2 buňky, dochází k aktivaci Th2 buněk především cytokinem IL-13. (Price a kol., 2010)

7 Interakce imunitního systému s TES

Při nákaze člověka *Toxocara* spp. dochází k rozpoznání cizorodých patogenů a k reakci imunitního systému hostitele. Hlavními znaky této reakce jsou produkce specifických protilátek, diferenciací naivních CD4⁺ buněk na Th2 lymfocyty a indukce eosinofilů. (Del Prete a kol., 1991) Přítomnost parazita stimuluje makrofágy a ty produkují cytokiny podporující Th2 reakci. Přeměna naivních buněk na Th2 lymfocyty je iniciována přítomností interleukinu IL-4, a Th2 buňky poté produkují cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13, které dále podporují tento typ imunitní odpovědi. Zvýšená hladina IL-4 také stimuluje dozrávání B lymfocytů a isotypový přesmyk z IgM na IgE. (Del Río-Araizia a kol., 2018).

V případě, že se larvy škrkavky dostanou do paratenického hostitele, vycestují ze střev do tkání, kde dokážou dlouhodobě přežít bez toho, aby byly zlikvidovány imunitním systémem. (Giacomin a kol., 2008) V ideálním případě imunitní mechanismy extracelulárního parazita rozpoznají a eliminují. Larvy škrkavky nicméně mají schopnost imunitní odpovědi velmi dobře uniknout, přestože je imunitní systém rozpoznává a produkuje proti nim specifické protilátky.

Jedním z rysů obranného mechanismu proti mnohobuněčným parazitům je produkce eosinofilů. Experimenty *in vitro* ukázaly schopnost eosinofilů obalit parazita a pomocí degranulace ho zahubit. K produkci a atrakci eosinofilů dochází i při nákaze *Toxocara* spp., ale larva není důsledkem jejich degranulace zlikvidována. (Giacomin a kol., 2008) Při pokusech *in vitro* bylo pozorováno, že eosinofily parazita rozpoznaly a navázaly se na jeho povrch, konkrétně na povlak kryjící larvu, který tvoří mimo jiné glykoproteinem TES-120. Po navázání eosinofilů larva ze svého obalu unikla a zanechala na něm eosinofily. (Badley a kol., 1987; Smith a kol., 1981)

Další ze strategií, kterou larvy škrkavky využívají k přežití, spočívá v kompetici TES a proteinů produkovaných hostitelem. Jak bylo uvedeno dříve, toxokara produkuje velké spektrum proteinů. Mezi nejdůležitější produkované proteiny ze skupiny C-lektinů patří antigeny TES-32 a TES-70, které vykazují vysokou míru podobnosti se savčími receptory ovlivňujícími iniciaci a rozvíjení zánětlivé reakce. (Hewitson a kol., 2009) Tyto antigeny, které larva toxokary hojně produkuje, dovedou vázat stejné molekuly jako receptory ovlivňující zánětlivou reakci, která by měla parazita zlikvidovat. *Toxocara* tímto způsobem inhibuje například adhezi buněk, která je důležitým faktorem pro přesun leukocytů do místa zánětu. (Etebar a kol., 2018)

Přítomnost larev *Toxocara* spp. má negativní vliv na produkci cytokinů podporujících Th1 odpověď. Pokusy na myších ukázaly, že larvy toxokary mají schopnost potlačit produkci IL-12, a tím snížit schopnost napadeného organismu odpovědět zánětlivou reakcí. (de Moura a kol., 2017) Také množství IL-2 se během prvních sedmi dnů nákazy u myší snížilo, což vedlo k útlumu zánětlivé reakce a snížení poškozování tkáně. (Ma a kol., 2015) Při pokusech *in vitro* byla inhibována produkce TNF- α , tedy dalšího cytokinu podporujícího Th1 odpověď. (Długosz a kol., 2015)

Larvy *Toxocara* spp. mají opačný účinek na sekreci cytokinů podporujících Th2 odpověď, mnoho pokusů prokázalo, že tyto cytokiny se u nakažených toxokarou vyskytují ve zvýšeném množství. U myší bylo pozorováno zvýšené množství cytokinů IL-4 a IL-5. (Ma a kol., 2015) Také ve studii zkoumající děti nakažené toxokarou bylo zaznamenáno zvýšené množství cytokinů IL-4, IL-6 (Mazur-Melewska a kol., 2014; Mazur-Melewska a kol., 2016) a IL-5. (Nagy a kol., 2012) Zvýšená produkce IL-5, IL-4 a IL-10 nastala také při pokusech *in vitro*. (Valli a kol., 2010)

Th17 odpověď je stimulována cytokiny IL-6 a TGF- β . Během prvních dnů infekce při pokusech na myších se zvýšila koncentrace IL-6 a IL-17, v dalších dnech ale jejich koncentrace opět klesla. (Resende a kol., 2015) Při pokusech *in vitro* nebylo pozorováno významné zvýšení počtu IL-17. (Długosz a kol., 2015)

Velmi důležitým faktorem pro přežití larev je indukce regulační T odpovědi. Treg buňky inhibují Th1 i Th2 odpověď, primárně aby zmírnily poškození organismu způsobované zánětlivou reakcí, ale vedlejším účinkem je také ochrana parazita. Cytokin TGF- β , který podporuje proliferaci Treg buněk, byl ve zvýšeném množství přítomný u lidí nakažených toxokarou. (Fan a kol., 2013) Zvýšení koncentrace tohoto cytokinu nastalo i při pokusech *in vitro* (Długosz a kol., 2015) a při pokusech na myším experimentálním modelu. (Othman a kol., 2011)

Zvýšená koncentrace dalšího z regulačních cytokinů, IL-10, byla pozorována při pokusech *in vitro* (Długosz a kol., 2015) i při využití myších modelů. (de Moura a kol., 2017; de Avila a kol., 2016) Při jiných pokusech se ovšem zvýšená koncentrace IL-10 nepodařila naměřit. (Resende a kol., 2015), Při vyšetření krve pacientů s toxokarózou byla zvýšená koncentrace IL-10 změřena. (Mazur-Melewska a kol., 2014; Mazur-Melewska a kol., 2016; Nagy a kol., 2012)

U dětí nakažených toxokarou bylo také pozorováno zvýšení počtu IgE, stejně jako k němu dochází i u jiných helmintických infekcí. Na zvířecích modelech došlo také ke zvýšení počtu jiných imunoglobulinů, konkrétně IgM a IgG. (Del Río-Araiza a kol., 2017) Při pokusech na myších došlo k vytvoření specifických IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (Novák a kol., 2017) a IgE. (Długosz a Wiśniewski, 2016) V případě zkoumání nákazy člověka se bylo zaznamenáno zvýšení počtu eosinofilů. (Mazur-Melewska a kol., 2014; Mazur-Melewska a kol., 2016; Nagy a kol., 2012) Hypereosinofilie i vyšší koncentrace IgE souvisí s dlouhodobým působením Th2 imunitní odpovědi, konkrétně s produkcí cytokinů IL-5 a IL-4.

8 Závěr

Toxocara spp. je celosvětově velmi rozšířený parazit, který způsobuje toxokarózu, nemoc postihující zejména děti v chudších regionech. Projevy této nemoci jsou odlišné podle toho, do jaké tkáně či orgánu docestují. Většina příznaků toxokarózy není specifických, proto se předpokládá, že velká část nakažených lidí nemusí být nikdy správně diagnostikována.

Pro detekci toxokarózy se využívají proteiny produkované toxokarou nazývané TES, které slouží škrkavce především k tomu, aby larvám umožnily dlouhodobě přežít v hostiteli. TES-120 je glykoprotein, tvořící obal na povrchu encystovaných larev. Při imunitní odpovědi hostitele se na něj naváží eosinofily, které se pokusí larvu svou degranulací usmrtit. Toxokara má schopnost tento svůj obal opustit a tím se vyhnout ničivým účinkům eosinofilů, které jsou na něm navázané.

Další proteiny produkované toxokarou jsou podobné některým proteinům hostitele a slouží k regulaci jeho imunitní odpovědi. Přítomnost TES v hostiteli má za následek inhibici některých cytokinů Th1 imunitní odpovědi a zvýšenou produkci cytokinů Th2 imunitní odpovědi. Pro dlouhodobé přežití larev v organismu hostitele je klíčovým faktorem podpora Treg buněk. Ty potlačují jak Th1 tak Th2 odpověď, čímž sice omezují poškození tkání hostitele, které vlastní imunitní buňky působí, ale zároveň snižují obranyschopnost proti parazitovi.

Dlouhodobá zvýšená koncentrace cytokinů IL-4 a IL-5, které jsou produkovány Th2 buňkami, má za následek zvýšenou koncentraci eosinofilů a zvýšení počtu IgE i dalších imunoglobulinů.

Jedním z důvodů, v čem by mohlo být přínosné studium vlivu helmintů na imunitní systém člověka, je právě jejich schopnost ovlivňování imunitní odpovědi. V posledních desetiletích došlo k poklesu počtu lidí nakažených helminty a současně k nárůstu chronických zánětlivých onemocnění jako například astma, a autoimunitních onemocnění, například roztroušené sklerózy. (Wammes a kol., 2014) Schopnost helmintů inhibovat Th1 imunitní odpověď a podpora Treg buněk by mohla snižovat riziko vzniku takových nemocí. Přestože by přítomnost parazita v organismu mohla být přínosem pro léčbu či prevenci autoimunitních onemocnění, zároveň způsobuje jiné problémy. Řešením by mohlo být použití izolovaných antigenů, které parazité produkují.

9 Seznam použité literatury

Review jsou označeny *

- * ALI, Niwa & ROSENBLUM, Michael D. (2017). Regulatory T cells in skin. *Immunology*. **152**(3), 372-381.
- * AREVALO, J. Fernando, ESPINOZA Juan V. & AREVALO Fernando A. (2013). Ocular Toxocariasis. *Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus*. **50**(2), 76-86.
- ARPAIA, Nicholas, GREEN, Jesse A., MOLTEDO, Bruno, ARVEY, Aaron, HEMMERS, Saskia, YUAN, Shaopeng, TREUTING, Piper M. & RUDENSKY, Alexander Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell*. **162**(5), 1078-1089.
- BADLEY, Jane E., GRIEVE Robert B., ROCKEY John H. & GLICKMAN Lawrence T. (1987). Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunology*. **9**(1), 133-143.
- BEAVER, Paul C., SNYDER, Charlene Hoffman, CARRERA, George M., DENT, John H. & LAFFERTY, John W. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. *Pediatrics*. **9**(1), 7-19
- * BEAVER, Paul C. (1956). Larva migrans. *Experimental parasitology*. **5**(6), 587-621.
- * BULEK, Katarzyna, SWAIDANI, Shadi, ARONICA, Mark & LI, Xiaoxia (2010). Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunology and Cell Biology*. **88**(3), 257-268.
- BURKE, T. Michael & ROBERSON Edward L. (1985). Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: Experimental infection of the bitch before pregnancy. *International Journal for Parasitology*. **15**(1), 71-75.
- CHEN, WanJun, JIN, Wenwen, HARDEGEN, Neil, LEI, Ke-jian, LI, Li, MARINOS, Nancy, MCGRADY, George & WAHL, Sharon M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. **198**(12), 1875-1886.

- COATI, N., SCHNIEDER, Thomas & EPE, Christian (2004). Vertical transmission of *Toxocara cati* Schrank 1788 (Anisakidae) in the cat. *Parasitology Research*. **92**(2), 142-146.
- DE AVILA, Luciana Faria da Costa, DE LEON, Priscila Marques Moura, DE MOURA, Micaele Quintana, BERNE, Maria Elisabeth Aires, SCAINI, Carlos James & LEIVAS LEITE, Fabio Pereira (2016). Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology*. **38**(5), 326-330.
- DE MOURA, Micaele Quintana, DA SILVA TERTO, Wesley Douglas, JESKE, Sabrina Taiza, DE CASTRO, Leonardo Mortagua, PINTO, Natália Berne, DE AVILA, Luciana Farias da Costa, LEIVAS LEITE, Fabio Pereira & BERNE, Maria Elisabeth Aires (2017). Evaluation of the transcription of interleukin-12 in the intestinal mucosa of mice subjected to experimental toxocariasis and supplemented with *Saccharomyces boulardii*. *Veterinary Parasitology*. **242**, 59-62.
- DEL PRETE, Gianfranco F., DE CARLI, Marco, RICCI, Mario & ROMAGNANI, Sergio (1991) Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *Journal of Experimental Medicine*. **174**(4), 809-813.
- DEL RÍO-ARAIZA, Víctor Hugo, NAVA-CASTRO, Karen Elizabeth, ALBA-HURTADO, Fernando, QUINTANAR-STEPHANO, Andrés, MUÑOZ-GUZMÁN, Marco Antonio, CUENCA-MICÒ, Olga & MORALES-MONTOR, Jorge (2018). Endocrine immune interactions during chronic Toxocariasis caused by *Toxocara canis* in a murine model: New insights into the pathophysiology of an old infection. *Veterinary Parasitology*. **252**, 173-179.
- * DESHAYES, Sebastien, BONHOMME, Jerry & DE LA BLANCHARDIÈRE, Arnaud (2016). Neurotoxocariasis: a systematic literature review. *Infection*. **44**(5), 565-574.
- DESPOMMIER, Dickson (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**(2), 265-272.
- DŁUGOSZ, Ewa, WASYL, Katarzyna, KLOCKIEWICZ, Maciej & WIŚNIEWSKI, Marcin (2015). *Toxocara canis* mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. *Parasitology Research*. **114**(9), 3365-3371.

- DŁUGOSZ, Ewa & WIŚNIEWSKI, Marcin (2016). *Toxocara canis* glycans influence antigen recognition by mouse IgG1 and IgM antibodies. *Acta Parasitologica*. **61**(1), 191-194.
- DOUGLAS J. R. & BAKER N. F. (1966). Some host-parasite relationships of canine helminths. In: McCAULEY J. E. (ed.) Proceedings of the 26th Biological Colloquium, April 23-24. Cornwallis. 97–115.
- DOS SANTOS, Lucas Moreira, DE MOURA, Micaele Quintana, AZEVEDO, Morgana Lüdtke, MARQUES, Giuli Argou, DE AVILA, Luciana Farias da Costa, SCAINI, Carlos James, BERNE, Maria Elisabeth, MOREIRA, Ângela Nune & CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo (2018). Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*. **40**(8)
- ETEBAR, Fazeleh, HOSSEINI, Seyed Hossein, JALOUSIAN, Fatemeh & RANJBAR, Mohammad Mehdi (2018). Phylogenetic Analysis of C Type Lectin from *Toxocara canis* Infective Larvae and Comparison with the C Type Lectin Family in the Immune System of Mouse and Human. *Iran J Parasitol*. **13**(1), 49-57.
- FAN, Chia-Kwung, LIAO, Chien-Wei & CHENG, Yu-Chieh (2013). Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. *Veterinary Parasitology*. **193**(4), 342-352.
- FAN, Chia-Kwung, HOLLAND, Celia V., LOXTON, Karen & BARGHOOTH, Ursula (2015). Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders?. *Clinical Microbiology Reviews*. **28**(3), 663-686.
- FILLAUX, Judith & MAGNAVAL Jean-François (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*. **193**(4), 327-336.
- GIACOMIN, Paul R., CAVA, M., TUMES, Damon J., GAULD Ashley D., IDDAWELA, Devika R., MCCOLL, Shaun R., PARSONS, Jim C., GORDON, David L. & DENT, Lindsay A. (2008). *Toxocara canis* larval excretory/secretory proteins impair eosinophil-dependent resistance of mice to *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunology*. **30**(8), 435-445.
- GLICKMAN, Lawrence T. & SCHANTZ, Peter M. (1981). Epidemiology and Pathogenesis of Zoonotic Toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*. **3**(1), 230-250.
- GLICKMAN, Lawrence T., MAGNAVAL, Jean-Francois, DOMANSKI, Linda M., SHOFER, Frances S., LAURIA, Salvatore S., GOTSTEIN, Bruno & BROCHIER,

- Bernard (1987). Visceral Larva Migrans in French Adults: A New Disease Syndrome?. *American journal of epidemiology*. **125**(6), 1019-1034.
- GOOD, Barbara, HOLLAND, Celia V., TAYLOR, M. R. H., LARRAGY, J., MORIARTY, Paul & O'REGAN, Myra (2004). Ocular Toxocariasis in Schoolchildren. *Clinical Infectious Diseases*. **39**(2), 173-178.
- GUO, Liying, HUANG, Yuefeng, CHEN, Xi, HU-LI, Jane, URBAN JR., Joseph F. & PAUL, William E. (2015). Innate immune function of Th2 cells in vivo. *Nature Immunology*. **16**(10), 1051-1059.
- * HEWITSON, James P., GRAINGER, John R., MAIZELS, Rick M. (2009). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **167**(1), 1-11.
- JORDAN, Martha S., BOESTEANU, Alina, REED, Amy J., PETRONE, Andria L., HOLENBECK, Andrea E., LERMAN, Melissa A., NAJI, Ali & CATON, Andrew J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*. **2**(4), 301-306.
- LOUKAS, Alex, MULLIN, Nicholas P., TETTEH, Kevin K. A., MOENS, Luc & MAIZELS, Rick M. (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology*. **9**(15), 825-828.
- LOUKAS, Alex, DOEDENS, Andrew, HINTZ, Martin & MAIZELS, Rick M. (2000). Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology*. **121**(5), 545-554.
- MA, Guangxu, TAN, Yancai, HU, Ling, LUO, Yongfang, ZHU, Honghong & ZHOU, Rongqiong (2015). Short communication: Experimental toxocarosis in Chinese Kun Ming mice. *Research in Veterinary Science*. **103**, 16-19.
- MAGNAVAL, Jean-François, GALINDO, V., GLICKMAN, Lawrence T. & CLANET, M. (1997). Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case-control study. *Parasitology*. **115**(5), 537-543.
- * MAGNAVAL, Jean-François, GLICKMAN, Lawrence T., DORCHIES, Philippe & MORASSIN, Bruno (2001). Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology*. **39**(1), 1-11.

- MAIZELS, Rick M., TETTEH, Kevin K. A. & LOUKAS, Alex (2000). *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *International Journal for Parasitology*. **30**(4), 495-508.
- MAIZELS, Rick M., HEWITSON, James P. & SMITH, Katherine A. (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current Opinion in Immunology*. **24**(4), 459-466.
- MAIZELS, Rick M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*. **193**(4), 365-374.
- MAZUR-MELEWSKA, Katarzyna., JOŃCZYK, Krzysztof, MODLIŃSKA-CWALIŃSKA, A., FIGLEROWICZ, Magdalena & SŁUŻEWSKI, Wojciech (2014). Visceral larva migrans syndrome: analysis of serum cytokine levels in children with hepatic lesions confirmed in radiological findings. *Parasite Immunology*. **36**(12), 668-673.
- MAZUR-MELEWSKA, Katarzyna, FIGLEROWICZ, Magdalena, CWALIŃSKA, A., MIKOŚ, Hanna, JOŃCZYK-POTOCZNA, Katarzyna, LEWANDOWSKA-STACHOWIAK, M. & SŁUŻEWSKI, Wojciech (2016). Production of interleukins 4 and 10 in children with hepatic involvement in the course of *Toxocara* spp. infection. *Parasite Immunology*. **38**(2), 101-107.
- MEGHJI, Munira & MAIZELS, Rick M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **18**(2), 155-170.
- * MESQUITA JÚNIOR, Danilo, PEREIRA ARAÚJO, Júlio Antônio, CATELAN, Tânia Tiekō Takao, DE SOUZA, Alexandre Wagner Silva, DE MELO CRUVINEL, Wilson, COELHO ANDRADE, Luís Eduardo & PEREIRA DA SILVA, Neusa (2010). Immune system – Part II. Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Revista Brasileira de Reumatologia*. **50**(5), 552-580.
- MOHAMAD, Suharni, AZMI, Norhaida Che & NOORDIN, Rahmah (2009). Development and Evaluation of a Sensitive and Specific Assay for Diagnosis of Human Toxocariasis by Use of Three Recombinant Antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *Journal of Clinical Microbiology*. **47**(6), 1712-1717.
- MOTRAN, Claudia Cristina, SILVANE, Leonardo, CHIAPELLO, Laura Silvina, THEUMER, Martin Gustavo, AMBROSIO, Laura Fernanda, VOLPINI, Ximena, CELIAS, Daiana Pamela & CERVI, Laura (2018). Helminth Infections: Recognition

- and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Frontiers in Immunology*. **9**:664.
- NAGY, D., BEDE, O., DANKA, J., Z. SZÉNÁSI, Z. & SIPKA, S. (2012). Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunology*. **34**(12), 581-588.
- NAKAE, Susumu, IWAKURA, Yoichiro, SUTO, Hajime & GALLI, Stephen J. (2007). Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of Leukocyte Biology*. **81**(5), 1258-1268.
- NICOLETTI, Alessandra (2013). Toxocariasis. *Handbook of Clinical Neurology*. **114** (*Neuroparasitology and Tropical Neurology*), 217-228.
- NOVÁK, Jan, PANSKÁ, Lucie, MACHÁČEK, Tomáš, KOLÁŘOVÁ, Libuše & HORÁK, Petr (2017). Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitologica*. **62**(4), 823-835.
- NUTMAN, Thomas B. (2015) Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunology*. **37**(6), 304-313.
- OSHIMA, Tomoo (1961). Influence of Pregnancy and Lactation on Migration of the Larvae of *Toxocara canis* in Mice. *The Journal of Parasitology*. **47**(4), 657-660.
- OTHMAN, Ahmad A., EL-SHOUBAGY, Safinaz H. & SOLIMAN, Rasha H. (2011). Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Experimental Parasitology*. **127**(2), 454-459.
- OYESOLA, Oyebola O., FRÜH, Simon P., WEBB, Lauren M. & TAIT WOJNO, Elia D. (2018). Cytokines and beyond: Regulation of innate immune responses during helminth infection. *Cytokine*. [v tisku]
- PAGE, Anthony P., RUDIN, W., FLURI, E., BLAXTER, Mark L., & MAIZELS, Rick M. (1992). *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Experimental Parasitology*. **75**(1), 72-86.
- PRICE, April E., LIANG, Hong-Erh, SULLIVAN, Brandon M., REINHARDT, R. Lee, EISLEY, Chris J., ERLE, David J. & LOCKSLEY, Richard M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107**(25), 11489-11494.

- RESENDE, Nathália M., GAZZINELLI-GUIMARÃES, Pedro Henrique, BARBOSA, Fernando S., OLIVEIRA, Luciana M., NOGUEIRA, Denise S., GAZZINELLI-GUIMARÃES, Ana, GONÇALVES, Marco Túlio P., AMORIM, Chiara C. O., OLIVEIRA, Fabrício M. S., CALIARI, Marcelo V., RACHID, Milene A., VOLPATO, Gustavo T., BUENO, Lilian L., GEIGER, Stefan M. & FUJIWARA, Ricardo T. (2015). New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites & Vectors*. **8**(1):354.
- SMITH, V. H., QUINN, R., KUSEL, J. R. & GIRDWOOD, R. W. A. (1981). The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surface of second stage *Toxocara canis* larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **4**(3-4), 183-193.
- TAYLOR, Mervyn R. H., O'CONNOR, P., KEANE, C. T., MULVIHILL, E. & HOLLAND, Celia (1988). The Expanded Spectrum of Toxocaral Disease. *The Lancet*. **331**(8587), 692-695.
- TAYLOR, Mervyn R. H. (2001). The epidemiology of ocular toxocariasis. *Journal of Helminthology*. **75**(2), 109-118.
- VALLI, J. L., WILLIAMSON, A., SHARIF, S., RICE, J. & SHEWEN, P. E. (2010). In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **134**(3-4), 218-229.
- * WAMMES, Linda J., MPAIRWE, Harriet, ELLIOTT, Alison M. & YAZDANBAKHSH, Maria (2014). Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infectious Diseases*. **14**(11), 1150-1162.
- WEIS, William I., TAYLOR, Maureen E. & DRICKAMER, Kurt (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews*. **163**(1), 19-34.
- YASUDA, Koubun, MUTO, Taichiro, KAWAGOE, Tatsukata, MATSUMOTO, Makoto, SASAKI, Yuki, MATSUSHITA, Kazufumi, TAKI, Yuko, FUTATSUGI-YUMIKURA, Shizue, TSUTSUI, Hiroko, ISHII, Ken J., YOSHIMOTO, Tomohiro, AKIRA, Shizuo & NAKANISHI, Kenji (2012). Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**(9), 3451-3456.

ZAHABIUN, Farzaneh, SADJJADI, Seyed Mahmoud, YUNUS, Muhammad Hafiznur, RAHUMATULLAH, Anizah, MOGHADDAM, Mohammad Hosein Falaki, SAIDIN, Syazwan & NOORDIN, Rahmah (2015). Production of *Toxocara cati* TES-120 Recombinant Antigen and Comparison with its *T. canis* Homolog for Serodiagnosis of Toxocariasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **93**(2), 319-325.