

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Možnosti studia (charakterizace) hemocytů měkkýšů

Diversity of methods used for characterization of molluscan hemocytes

Zuzana Jindrová

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

2010

Zde bych chtěla poděkovat svému školiteli Petru Horákovi za cenné rady a připomínky během psaní této práce. Dále můj dík patří Martinovi a Ondrovi za technickou podporu a mnohým dalším, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. . .

Obsah

Abstrakt	2
Úvod	3
1 Hemocyty	4
1.1 Morfologie hemocytů	4
1.1.1 Granulocyty	5
1.1.2 Agranulocyty	6
1.2 Chemická povaha hemocytů	6
1.3 Enzymatická výbava hemocytů	7
1.4 Aktivita hemocytů	8
1.4.1 Respirační vzplanutí	8
1.4.2 Produkce oxidu dusnatého	9
1.4.3 Fagocytóza	9
1.4.4 Enkapsulace	10
2 Metody studia hemocytů	11
2.1 Mikroskopie	11
2.2 Gradientová centrifugace	12
2.3 Průtoková cytometrie	13
2.4 Lektinové sondy	14
2.5 Monoklonální protilátky	14
2.6 Metody detekce respiračního vzplanutí	15
2.6.1 Chemiluminiscence	16
2.6.2 Redukce cytochromu C	17
2.6.3 Oxidace fenolové červeně	18
2.6.4 Fluorescence kyseliny homovanilové	18
2.6.5 Fluorescence Amplex Red	18
2.6.6 Fluorescence DCFH	19
2.6.7 Oxidace diaminobenzidinu	19
2.6.8 Redukce NBT	20
2.7 Metody měření produkce oxidu dusnatého	20
2.7.1 Griessova reakce	21
2.7.2 Reakce s diaminonaftalenem	22
2.7.3 Chemiluminiscence	22
2.7.4 Radioaktivní značení	22
Závěr	23
Použitá literatura	24

Abstrakt

Hemocyty jsou hlavní imunitní buňky bezobratlých organismů, tedy i měkkýšů. Liší se mezi sebou jak v morfologii, tak i ve svých funkcích. Dva základní všeobecně uznávané morfologické typy, granulocyty a hyalinocyty, se odlišují mírou fagocytózy a enkapsulace, produkcí kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého nebo přítomností některých enzymů. Existuje řada metod, pomocí kterých se hemocyty charakterizují. Mikroskopie slouží primárně ke studiu jejich morfologie. Jemné detaily v antigenním složení povrchových struktur je možné rozeznat monoklonálními protilátkami nebo lektinovými sondami. Na základě granularity a velikosti buňky se hemocyty dělí pomocí gradientové centrifugace nebo průtokové cytometrie. Produkce oxidu dusnatého a kyslíkových radikálů se sleduje dodáním vhodného substrátu, který po reakci s radikálem mění své vlastnosti. Může začít fluorescenčně zářit, změnit absorbanci roztoku nebo vytvořit viditelnou sraženinu. Další možností je využití chemiluminiscence. Cílem studia hemocytů je objasnit interakci mezi měkkýšem a jeho patogenem.

Klíčová slova: *Mollusca*, granulocyt, hyalinocyt, průtoková cytometrie, gradientová centrifugace, lektiny, monoklonální protilátky, kyslíkové radikály, respirační vzplanutí, oxid dusnatý.

Abstract

Hemocytes are the main immune cells of invertebrates; therefore they can be found in molluscs, too. They differ both in morphology and function. The two generally accepted morphological types, granulocytes and hyalinocytes, vary in the level of phagocytosis and encapsulation, production of reactive oxygen species and nitrogen oxide, and presence of some enzymes. There is an array of methods by means of which hemocytes can be characterized. Microscopy serves particularly for study of morphology. Antigens localized on the surface can be determined by monoclonal antibodies or lectin probes. Hemocytes can be divided on the basis of cell size and granularity using gradient centrifugation or flow cytometry. Production of nitrogen oxide and reactive oxygen species is monitored by adding appropriate substrate which changes its properties after reaction with the radical. It may become fluorescent, change absorbance of the solution or form a visible precipitate. Another possibility is the use of chemiluminescence. The objective of hemocyte research is to explain mollusc-pathogen interaction.

Key words: *Mollusca*, granulocyte, hyalinocyte, flow cytometry, gradient centrifugation, lectins, monoclonal antibodies, reactive oxygen species, respiratory burst, nitric oxide.

Úvod

Parazitismus je nejrozšířenější životní strategií, protože snad každý volně žijící organismus hostí minimálně jednoho parazita. A dokonce i sám parazit může být hostitelem. Parazitologicky velice zajímavou skupinou bezobratlých organismů jsou měkkýši, protože tvoří mezičlánek ve vývojovém cyklu mnoha parazitických helmintů. Bez měkkýše coby meziphostitele nejsou takoví helminti schopni dokončit svůj životní cyklus. Měkkýši jsou ale hostiteli i pro organismy z jiných taxonomických skupin. Příkladem mohou být prvoci, kteří jsou pohromou pro komerčně chované druhy mlžů, jako jsou např. ústřice.

Přestože hostitel poskytuje svému parazitovi vše potřebné, nemá to takový parazit vůbec jednoduché. Hostitel totiž dělá vše, aby svého příživníka vypudil, a úspěch parazita pak závisí na jeho schopnosti vypořádat se s imunitním systémem hostitele. Ten je ale i u bezobratlých dost dokonalý na to, aby nepřizpůsobeného hosta zničil. Neustále dochází k inovacím jak na straně hostitelovy obrany, tak na straně úskoků parazita. Parazit se tedy musí adaptovat tak, aby imunitní systém nějakým způsobem oklamal. Někdy si umí zajistit, že jej hostitel nevnímá jako cizí element, v jiných případech utlumí proti sobě namířenou imunitní reakci nebo je jednoduše schopný útok přežít.

Existuje řada metod, pomocí kterých se studuje vliv parazita na hostitelův imunitní systém. Sleduje se, jak je parazit schopný imunitní systém obcházet, jak jej ovlivňuje ve svůj prospěch a na čem závisí rezistence vůči nákaze. Cílem této práce je vybrat nejdůležitější metody, kterými se dají zkoumat imunitní buňky – hemocyty, a popsat, co se pomocí těchto metod dá zjistit. První část obsahuje popis hemocytů jako buněčných typů. Druhá část se zabývá už jednotlivými metodami. Ve své bakalářské práci se budu zabývat pouze plži a mlži, protože hlavonožci nejsou z hlediska parazitologie tolik významní.

1 Hemocyty

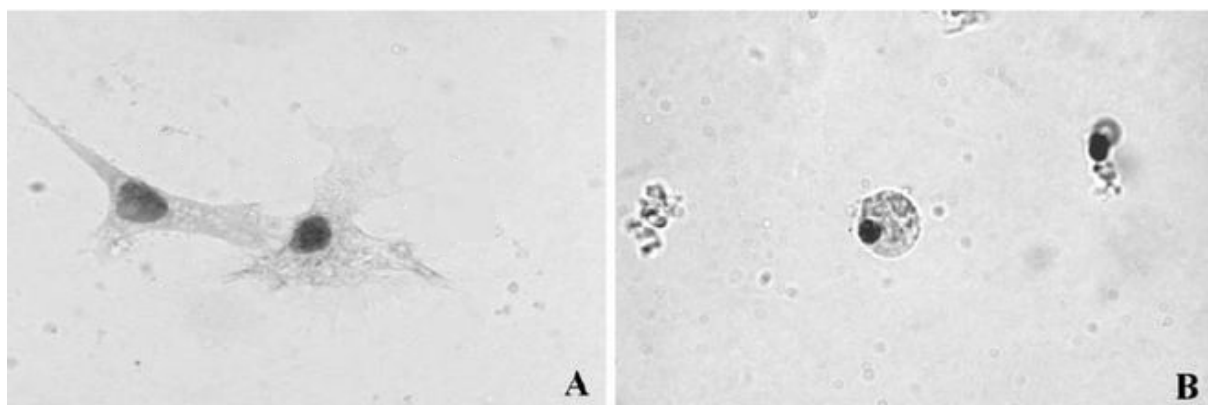
Imunitní systém bezobratlých je neadaptivní. Chybí mu imunologická paměť ve smyslu, jak ji známe u obratlovců. Odpověď je vždy nespecifická. Proto je fagocytóza v obraně mnohem důležitější než např. u savců. Fagocytické buňky se nazývají hemocyty a kromě buněčné odpovědi se obrany proti patogenům účastní také řada proteinů (humorální složka). Hemocyty hrají důležitou roli v udržování homeostáze, jejich funkce je velice různorodá. Podílí se na opravách schránky, pomáhají regenerovat, účastní se trávení potravy, jejího transportu a exkrece. Jsou základní složkou imunitního systému (Cheng 1981). Není jednotný názor, zda jsou hemocyty nějak funkčně rozlišeny, nebo jestli existuje pouze jeden typ, který zastává všechny funkce. To záleží na tom, podle jakých znaků se hemocyty popisují.

1.1 Morfologie hemocytů

První charakterizace hemocytů byla založena na jejich morfologii. V hemolymfě byly pozorovány dva typy buněk. Jedna skupina obsahovala v cytoplazmě velké množství granulí (granulocyty), u druhé skupiny granule víceméně pozorovány nebyly (agranulocyty). Agranulocyty se také často nazývají hyalinocyty (Cheng 1981). Následné práce na různých modelových organismech většinou podpořily přítomnost dvou odlišných skupin hemocytů. Kromě těchto dvou skupin jsou ale popsány i další typy hemocytů, u kterých často dosud neznáme funkci. Na příklad u mlže *Tapes philippinarum* byly pozorovány navíc dva typy hemocytů – hemoblasty a sérové buňky. Hemoblasty odpovídají nediferenciovaným buňkám. Jsou CD34-pozitivní (CD34 je adhezivní molekula typická pro kmenové buňky). Sérové buňky by mohly mít exkreční funkci (Cima et al. 2000). U plže *Biomphalaria glabrata* není možné hemocyty dělit podle granularity. Byly pozorovány tři skupiny na základě jejich velikosti. Ve velké míře se vyskytovaly velké a středně velké hemocyty, mnohem méně pak malé hemocyty (Matricón-Gondran a Letocart 1999).

Podle jedné teorie existuje pouze jeden typ hemocytů. Hyalinocyty jsou jen součástí jedné vývojové řady hemocytů a jsou to tedy jen nezralé granulocyty (Mix 1976, cit. dle Ottaviani et al. 1998), ale tento názor je menšinový.

V současné době se většinou přijímá existence dvou hlavních skupin hemocytů, granulocyty a hyalinocyty. Oba typy se nachází buď v rozprostřené (spreading), nebo kulovité



Obr. 1: Morfologie hemocytů, A - rozprostřený (spreading) hemocyt, B - kulovitý (round) hemocyt; barveno Giemsou; dle Pampanin et al. 2002, upraveno.

(round) formě (Cima et al. 2000), viz obr. 1.

Pomocí elektronové mikroskopie se odhalila morfologie těchto buněk a jejich organel.

1.1.1 Granulocyty

Společným znakem granulocytů už podle názvu jsou časté cytoplazmatické granule. Velikost buňky se pohybuje kolem 3–16 μm (Cima et al. 2000). Obecně jsou granulocyty větší než hyalinocyty (Russel-Pinto et al. 1994). Buňky jsou většinou jednojaderné. Jádro je kulovité (Carballal et al. 1997c; Cima et al. 2000), umístěné excentricky (Russel-Pinto et al. 1994; Cima et al. 2000; Bigas et al. 2006) a obsahuje shluky kondenzovaného heterochromatinu (Carballal et al. 1997c). Buňky jsou charakteristické malou velikostí jádra v porovnání s objemem cytoplazmy (Allam et al. 2002; Bigas et al. 2006). V cytoplazmě se nachází větší množství organel než u hyalinocytů. Časté jsou mitochondrie, cisterny a vezikuly rER i sER a hodně vyvinutý Golgiho aparát, lysosomy a volné ribosomy (Russel-Pinto et al. 1994; Carballal et al. 1997c). Buňky vytváří dlouhá úzká i široká pseudopodia (Russel-Pinto et al. 1994). V cytoplazmě se nachází také velké depozity glykogenu (Carballal et al. 1997c). Podle zastoupení organel se dá říci, že granulocyty jsou sekretoricky velmi aktivní buňky. Velikost granulí se pohybuje kolem 0,2–1,8 μm (Carballal et al. 1997c). V buňkách bylo pozorováno více druhů granulí. Granule se liší jak velikostí, tak i chemickým složením (Carballal et al. 1997a).

U *Mytilus edulis* byly granulocyty rozděleny na dvě skupiny. Jedna skupina je charakteristická velkými granulemi (0,5–1,5 μm), druhá malými granulemi (0,2–0,3 μm) (Pipe

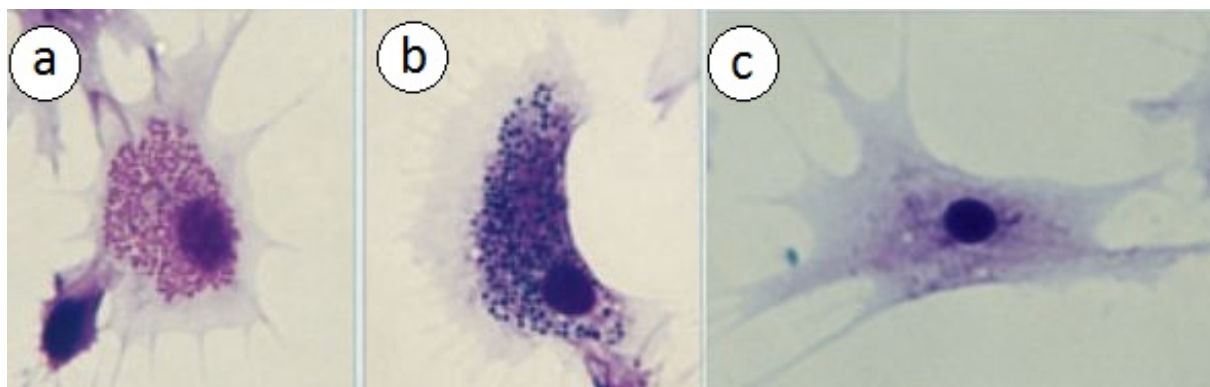
1990). K podobným výsledkům se došlo pomocí elektronové mikroskopie i u *Ostrea edulis* (Bigas et al. 2006). Malé granule mají často protáhlý tvar a jsou dominantní v nezralých buňkách. Ve zralých buňkách mají hlavně kulovitý tvar. Granule splývají s dalšími granulemi, endosomálními váčky, ale také s plazmatickou membránou (degranulace). Všechny jsou funkčně stejné a splýváním vznikají z malých granulí velké. Granulocyty s malými protáhlými granulemi jsou tedy jen nezralá stadia (Cajaraville a Santi 1995).

1.1.2 Agranulocyty

Pro agranulocyty (hyalinocyty) je charakteristické, že ani pomocí světelné mikroskopie ani průtokové cytometrie nejsme schopni detekovat cytoplazmatické granule. Někdy se pojem hyalinocyt používá i trochu volněji, pro buňky s velmi malým množstvím granulí. Většinou mají kulaté, centrálně položené jádro, někdy i s jadérkem (Carballal et al. 1997c; Cima et al. 2000). Buňky jsou charakteristické velkým jádrem v porovnání s množstvím cytoplazmy (Russel-Pinto et al. 1994; Carballal et al. 1997c; Bigas et al. 2006) a obsahují také poměrně málo organel. Přítomné je malé množství mitochondrií, rER i sER, ribosomů, Golgiho aparát je málo vyvinutý (Russel-Pinto et al. 1994; Carballal et al. 1997c). Vytváří úzká dlouhá pseudopodia (Carballal et al. 1997c) nebo vůbec žádná (Russel-Pinto et al. 1994). Obecně jsou menší než granulocyty, kolem 4–12 μm (Ford et al. 1994).

1.2 Chemická povaha hemocytů

Kombinováním morfologických kritérií a afinity k barvivům získáme skupiny hemocytů založené jak na vzhledu, tak na chemické povaze. Kyselé komponenty uvnitř buněk (jádro, jadérko, rER) jsou bazofilní. Zásadité složky (cytoplazma) jsou eozinofilní (acidofilní). Použitím různých typů barviv (Pappenheim, Ehrlich) můžeme rozlišit tři typy granulí. Různě se obarví bazofilní, neutrofilní a acidofilní granule (Cima et al. 2000), viz obr. 2. Pouze mladé granulocyty obsahují bazofilní granule. S dozráním se mění na acidofilní (Cheng 1981). Izopyknickou centrifugací se hemocyty rozdělí podle velikosti granulí a jejich množství. Po obarvení Wrightovým roztokem se objeví skupiny hemocytů, které se překrývají se skupinami vzniklými centrifugací. Malé agranulární buňky nebo buňky s malými granulemi jsou bazofilní. Granulární s velkými granulemi jsou eozinofilní (Pipe et al. 1997). Hemocyty s eozinofilní cytoplazmou mají malé excentricky položené jádro,



Obr. 2: Granule hemocytů, a - eozinofilní granulocyt, b - bazofilní granulocyt, c - agranulocyt; barvení May-Grünwald Giemsa; dle Chang et al. 2005, upraveno.

plné velkých granulí, které se barví stejně jako cytoplazma. Bazofily mají centrální velké jádro, drobné cytoplazmatické granule a jsou obecně menší. Eozinofily jsou pravděpodobně jediné cytotoxické (Friebel a Renwranz 1995).

1.3 Enzymatická výbava hemocytů

Hemocyty se dají také charakterizovat podle přítomnosti různých enzymů. Mnoho enzymů je lokalizováno do cytoplazmatických granulí. Dlouhou dobu nebylo jasné, jakou roli granule v hemocytech vlastně hrají. Jednou variantou byla funkce lysosomů. Lysosomy jsou váčky charakteristické přítomností hydrolytických enzymů, ribonukleázy, deoxyribonukleázy, katepsinu, β -glukuronidázy, ale hlavně kyselé fosfatázy (de Duve et al. 1955). U *Mercenaria mercenaria* byla přítomnost kyselé fosfatázy zjištěna uvnitř granulí, granule jsou tedy považovány za pravé lysosomy (Yoshino a Cheng 1976). U dalších organismů byla v granulích potvrzena kromě kyselé fosfatázy přítomnost i dalších hydrolytických enzymů, několika typů esteráz, β -glukuronidázy (Moore a Gelder 1985; Carballal et al. 1997a; Cima et al. 2000) a arylsulfatázy (Pipe et al. 1997; Cima et al. 2000). Přítomny jsou ale také oxidativní enzymy jako fenoloxidáza a peroxidáza (Pipe et al. 1997; Cima et al. 2000). Mezi důležité enzymy obranného systému měkkýšů patří β -glukuronidáza. Katalyzuje hydrolýzu peptidoglykanů (enzym štěpí glukosaminoglykany, ty jsou složkou peptidoglykanů), které jsou součástí např. buněčné stěny bakterií. Důležitý je také lysosomální enzym lysozym. Jeho obranná funkce spočívá v tom, že dokáže hydrolyzovat komponenty bakteriální stěny. Kromě toho se účastní také trávení potravy (Cheng 1983b).

Lysosomy mohou fúzovat s fagosomy, a tím do nich přinášet hydrolytické enzymy (Cajarville a Santi 1995). Také dochází k degranulaci, enzymy se tak dostávají mimo buňku (Foley a Cheng 1977). Hladina hydrolytických enzymů výrazně stoupá po fagocytóze (obrana nebo potrava). Předpokládá se, že enzymy se v buňkách nachází v latentní podobě, jak je tomu u lysosomů (Moore a Gelder 1985).

U *Mytilus galloprovincialis* byly lysosomální enzymy potvrzeny jak u granulocytů, tak i u hyalinocytů. U granulocytů se však vyskytují v mnohem větší míře (Carballal et al. 1997a). Jinak jsou hydrolytické enzymy ve většině případů připisovány spíše granulocytům.

1.4 Aktivita hemocytů

Hemocyty se dají také charakterizovat z pohledu jejich funkce, jejich aktivity. Umí produkovat v reakci na patogena kyslíkové radikály a oxid dusnatý. Nejdůležitější obranná reakce je však fagocytóza, případně enkapsulace.

1.4.1 Respirační vzplanutí

Respirační vzplanutí je obranný cytotoxický mechanismus, který umí spustit profesionální fagocyty. V reakci na stimulaci cizím tělesem začnou hemocyty produkovat kyslíkové radikály (ROS). Ty jsou toxické tím, že peroxidují lipidy buněčných membrán, denaturují proteiny, a tím ruší mj. funkci klíčových enzymů (Barron et al. 1949) nebo poškozují DNA v jádře (Halliwell a Aruoma 1991).

Respirační vzplanutí se většinou spouští během fagocytózy. Neplatí to ale u všech druhů měkkýšů. Produkce ROS nebyla pozorována u hemocytů mlžů *Ruditapes decussatus*, *Cerastoderma edule* (López et al. 1994) ani *M. mercenaria* (Cheng 1976). Respirační vzplanutí asi chybí u většiny mlžů z řádu *Veneroidea* (López et al. 1994). Vzplanutí ale bylo pozorováno u mlžů *M. edulis* (Pipe 1992), *M. galloprovincialis* (Carballal et al. 1997a), *T. philippinarum* (přestože patří mezi *Veneroidea*) (Cima et al. 2000) a sladkovodních plžů *Lymnaea stagnalis* nebo *B. glabrata* (Adema et al. 1992). ROS jsou produkovány v závislosti na vnější stimulaci, a to jak extracelulárně, tak dovnitř fagosomů. Množství extracelulárně uvolňovaných radikálů roste od počátku fagocytózy, s koncem fagocytózy klesá k nule. Intracelulární produkce ale pokračuje ještě nějakou dobu po skončení vlastní fagocytózy. Kontakt částice s membránou spustí systém produkující ROS a po její in-

ternalizaci tak pokračuje tvorba ROS tímto systémem uvnitř fagosomu (Adema et al. 1991).

Produkce kyslíkových radikálů (superoxidu (O_2^-) a jeho produktů) hraje svou roli při zneškodnění parazita. Hemocyty kmene *B.glabrata* rezistentního vůči infekci motolicí *Schistosoma mansoni* produkují signifikantně více peroxidu vodíku (H_2O_2) než hemocyty z kmene vnímavého (Bender et al. 2005). To samé platí i o produkci O_2^- (Connors a Yoshino 1990).

1.4.2 Produkce oxidu dusnatého

Hemocyty měkkýšů produkují oxid dusnatý (NO) během fagocytózy, např. u *R. decussatus* po stimulaci zymosanem a bakteriemi (Tafalla et al. 2003), u *Viviparus ater* lipopolysacharidem (Conte a Ottaviani 1995), nebo u *M. galloprovincialis* lidským interleukinem 12 (Novas et al. 2004). Bylo ale dokázáno, že produkce NO se spouští později než fagocytóza (Franchini et al. 1995). Oxid dusnatý tedy není mediátorem fagocytózy. Dokonce jeho přítomnost fagocytózu mírně inhibuje. Jde proto o dva nezávislé mechanismy boje proti patogenům, fagocytózu a produkci NO (Tafalla et al. 2003). Oxid dusnatý přitom není sám o sobě cytotoxický. Vzniká z něj daleko reaktivnější peroxynitrit ($ONOO^-$), který už má účinek při obraně proti patogenům. Kromě tvorby $ONOO^-$ by NO mohl hrát roli v regulaci genů. U octomilky *Drosophila melanogaster* NO aktivuje expresi genu pro antimikrobiální peptid diptericin (Nappi et al. 2000).

Preinkubace hemocytů s exogenním NO sníží produkci ROS, což vede k nižšímu množství $ONOO^-$. Tak se možná pomocí NO negativně reguluje množství $ONOO^-$, protože ten je pro buňku ve větším množství toxický (Tafalla et al. 2002). Přítomnost cytotoxického $ONOO^-$ byla u měkkýšů poprvé zaznamenána u *M. galloprovincialis*. Produkce byla asociovaná se stimulací zymosanem (Torreilles a Guérin 1999).

1.4.3 Fagocytóza

Fagocytóza je hlavní obrannou reakcí proti mikroorganismům. Aby mohla být částice pohlcena a následně uvnitř buňky degradována, musí ji fagocyt nejprve najít (chemotaxe). Pak musí být částice rozpoznána jako cizorodá a musí být připojena k povrchu fagocytu (Cheng 1983a). Většina fagocytujících buněk patří mezi granulocyty. Hyalinocyty jsou

také schopné fagocytovat, avšak v mnohem menší míře (Foley a Cheng 1975). V některých případech byly ale schopné fagocytovat pouze granulocyty. Hyalinocyty *M. galloprovincialis* nebyly schopné např. fagocytovat bakterie (Carballal et al. 1997b). Mezi granulocyty se úroveň fagocytózy také liší. Bazofily jsou výrazně méně aktivní než eozinofily, což souvisí s enzymatickým složením, viz kap. 1.2.

Granulocyty, které pohltily cizorodý materiál, obsahují méně granúl. Ty splynuly s primárními fagosomy (a předaly tak enzymy k degradaci) nebo došlo k jejich degranulaci (Carballal et al. 1997b; López et al. 1997). Vyšší fagocytická aktivita odpovídá většímu množství hydrolytických enzymů v lysosomech (López et al. 1997). Materiál je v lysosomech stráven stejně jako by šlo o potravu. Původně se myslelo, že hemocyty, které fagocytovaly, odchází do trávicí žlázy a odtud přes střevo ven. To ale většinou neplatí, protože naprostá většina uhlíku z fagocytovaných bakterií je recyklována a znovu použita na stavbu vlastních tkání (Bayne 1973). Některé molekuly (monosacharidy, mastné kyseliny) prochází difusí přes membránu fagosomu a dále se využívají. Z glukózy je syntetizován glykogen a v cytoplazmě tak vznikají glykogenová tělíska. Nestravitelný materiál zůstává ve fagosomu za vzniku reziduálních tělísek (Cheng 1981).

Hemocyt má více možností, jak naložit s fagocytovaným materiálem. Může migrovat epitelem do vnějšího prostředí, čímž se organismus zbaví nechtěného materiálu, aniž by ho degradoval. Další variantou je rozložit fagocytovaný materiál pomocí hydrolytických enzymů uvnitř hemocytu. Uvolněné látky jsou pak pro organismus využitelné jako stavební materiál. Poslední možností je uložení fagocytu v tkáni bez jakékoliv degradace. To však platí pouze pro inertní, neškodné částice. Patogenní částice jsou odstraňovány kombinací degradace a migrace do vnějšího prostředí. Osud částice tak závisí hlavně na jejím charakteru (Tripp 1961).

1.4.4 Enkapsulace

Pokud je cizorodý objekt příliš velký, není možné ho fagocytovat. Dochází k tzv. enkapsulaci. Příkladem může být infekce plže *B. glabrata* sporocystou *S. mansoni*. Hemocyty se akumulují kolem sporocysty a vysílají kolmo k ní své panožky, jako by ji chtěly pohltit. Panožky se postupem času zužují a sklápějí se, až jsou paralelně s povrchem objektu (Harris 1970). Hemocyty takto vytvoří okolo objektu až 15 vrstev o celkové tloušťce 10–40 μm . Vnitřní vrstva hemocytů je v bezprostředním kontaktu s povrchem objektu

(Loker et al. 1982). Enkapsulace se účastní jen granulocyty (Cheng a Garrabrant 1977). Obsahují množství lysosomů s hydrolytickými enzymy, pomocí kterých desintegrují povrch sporocysty a následně ji po částech pohlcují (Loker et al. 1982). Tímto způsobem jsou rezistentní kmeny schopny parazita odstranit.

2 Metody studia hemocytů

Hemocyty jsou velmi variabilní. Variabilita se objevuje jak na mezidruhové úrovni, tak i mezi jedinci téhož druhu a je způsobena jak vnějšími podmínkami, tak i genetickými faktory. Vliv mají doba a místo sběru měkkýšů, ale i podmínky v laboratořích během pokusů (Oliver a Fisher 1995). Navíc hlavní hodnotící znak (granularita) je spojitý. Těžko se vymezují hranice, co je granulární a co už ne. Proto se hemocyty charakterizují pomocí řady metod nejen na základě morfologie, ale i podle jejich funkce. Dají se charakterizovat podle přítomnosti určitých enzymů nebo pomocí lektinových sond, které se vážou na specifické sacharidové struktury na povrchu buněk. Použitím monoklonálních protilátek se detekuje přítomnost antigenů na povrchu i uvnitř buňky. Existuje řada metod k detekci produkce oxidu dusnatého nebo kyslíkových radikálů. Nejzákladnější a nejpůvodnější způsob pozorování je světelná mikroskopie. Její obměny jsou nedílnou součástí téměř všech níže popsaných metod.

2.1 Mikroskopie

Rozlišovací schopnost mikroskopu je $1/2$ vlnové délky použitého světla. S objevem elektronu se objevily i nové možnosti v mikroskopii. Vlnová délka urychleného elektronu je asi 100 000krát kratší než u viditelného světla. Použijí-li se místo fotonů elektrony, má takový mikroskop rozlišovací schopnost až 10^{-10} m.

Pomocí elektronové mikroskopie je možné vidět jemné detaily v morfologii hemocytů. Zjistí se množství, poloha a morfologie organel, na což už má světelná mikroskopie malé rozlišení, viz kap. 1.1.1.

2.2 Gradientová centrifugace

Gradientová centrifugace se provádí v gradientovém médiu. Jeho jednotlivé zóny mají různou hustotu. Ve chvíli, kdy se buňka dostane do prostředí o stejné hustotě jako je její vlastní, přestane sedimentovat. Tak je možné rozdělit buňky na základě jejich hustoty. Hustotní gradient v médiu může být spojitý (kontinuální gradientová centrifugace) nebo nespojitý (diskontinuální gradientová centrifugace). V druhém případě se na sebe navrstvují různé koncentrace media. Jednotlivé frakce se po centrifugaci odebírají z prostoru mezi vrstvami. Tato varianta je méně přesná a je proto vhodnější pro rozdělování do menšího počtu frakcí (Pertoft 2000).

Jako médium se používá sacharóza. Když je ale potřeba vyšší hustotní gradient, působí médium na buňky vysokým osmotickým tlakem (Day et al. 1971). Navíc sacharóza má malou molekulovou hmotnost a může tak pronikat do buněk. Médium je viskózní, díky tomu se musí centrifugovat několik hodin (Pertoft 2000). Jiné používané médium je Ficoll (syntetický polymer sacharózy). Výhody oproti sacharóze jsou dvě. Centrifugování trvá mnohem kratší dobu a Ficoll působí na buňky jen malým osmotickým tlakem (Kurokawa et al. 1965). Také se často používá Percoll. To jsou koloidní silikonové částičky pevně obalené vrstvou polyvinylpyrrolidonu. Toto médium má mnoho výhod. Má nízkou osmolalitu, která může být ještě upravena pomocí fyziologického roztoku. Je málo viskózní, takže částice rychle sedimentují (Wolf a Pertoft 1972). Percoll není toxický ani neproniká do buněk (Pertoft et al. 1977).

Na základě odlišné hustoty buněk se hemocyty rozdělí podle druhu měkkýše do různého počtu skupin. U *O. edulis* se tak objeví tři skupiny hemocytů. Rozdělí se na malé a velké hyalinocyty a na granulocyty (Xue et al. 2000). Různá hustota buněk je dána přítomností různého množství granúl. U *M. edulis* byly buňky barvením rozděleny na eozinofily a bazofily a následně rozděleny centrifugací. Bazofily mají nižší hustotu a tedy menší počet (nebo velikost) granúl než eozinofily (Friebel a Renwranz 1995). Různou hustotu také odráží různý poměr velikosti jádra k množství cytoplazmy (N:C poměr). Malé buňky s velkým poměrem N:C mají větší hustotu než větší buňky s malým poměrem N:C.

Pomocí gradientové centrifugace se dá ukázat, jak moc jsou hemocyty variabilní. Buňky se stejnou hustotou se liší jak v morfologii, tak v přítomnosti určitých enzymů (Adema et al. 1994).

2.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je velice efektivní metoda, protože dokáže rychle analyzovat suspenzi po jednotlivých buňkách a měřit u nich až více jak deset znaků najednou. Buňky jsou najednou značeny více fluorescenčními markery, které emitují světlo o různých vlnových délkách. Fluorochromy mohou být také navázány na monoklonálních protilátkách nebo lektinových sondách. Kromě fluorescenčních parametrů se měří ještě velikost buňky a její komplexita. Rozptyl světla směrem dopředu je úměrný velikosti buňky (forward scatter, FSC). Světlo rozptýlené nebo odražené do stran (side scatter, SSC) je úměrné vnitřní komplexitě buněk. Protože data jsou měřena pro každou buňku zvlášť, je možné porovnávat jednotlivé parametry mezi buňkami jedné populace. Měří-li se tedy aktivita hemocytů, nezjistí se pouze průměrná aktivita všech hemocytů, ale i rozdíly v aktivitách mezi jednotlivými subpopulacemi. Další výhodou je, že se buňky analyzují živé, v přirozené podobě. Data jsou kvantitativní, diagnostika je tudíž objektivní.

Průtoková cytometrie se používá jak pro morfologickou, tak pro funkční charakterizaci hemocytů. Hemocyty se rozdělí do subpopulací v závislosti na jejich velikosti a granularitě. U *O. edulis* byly takto nalezeny tři skupiny hemocytů, malé hyalinocyty, velké hyalinocyty a velké granulocyty (Xue et al. 2001). Použitím fluorescenčně značené protilátky specifické proti granulocytům se získal podobný výsledek, malé granulocyty, malé hemocyty s malým množstvím granúl a velké agranulocyty (Renault et al. 2001). U *Crassostrea virginica* byly nalezeny dokonce čtyři skupiny. Malé i velké granulocyty i agranulocyty (Hégaret et al. 2003).

Průtokovou cytometrií je také možné kvantifikovat aktivitu fagocytózy pomocí fluorescenčně značených částic. Podle počtu fagocytovaných částic vydává hemocyt odpovídající fluorescenční signál (Xue et al. 2001). Další využití je v analýze životaschopnosti buněk, tedy ke sledování vlivu různých metod na buňky. Buňky se inkubují s barvivem, které se váže na nukleovou kyselinu mrtvých buněk (neprochází celistvou membránou), a díky tomu začne silně fluorescenčně zářit. Jako barvivo se používá např. ethidium homodimer-1 (Ashton-Alcox a Ford 1998) nebo propidium jodid (Brousseau et al. 2000). Průtoková cytometrie se dá také využít k detekci respiračního vzplanutí, pokud se použije vhodná fluorescenční sonda, viz kap. 2.6.4.

2.4 Lektinové sondy

Další možností, jak dělit hemocyty, je použití molekulárních struktur na povrchu hemocytů. To je možno provést pomocí monoklonálních protilátek nebo lektinových sond.

Lektiny jsou enzymaticky neaktivní proteiny, které nepatří do imunoglobulinové rodiny. Specificky rozeznávají a reverzibilně vážou sacharidy volné nebo vázané na glykoproteinech a glykolipidech. Použitím fluorescenčně značených lektinových sond se hemocyty rozdělí podle přítomnosti povrchových ligandů (sacharidů). Známe-li specifitu použitých lektinů, můžeme určit, jaké sacharidy jsou na povrchu hemocytu v koncové pozici. To je důležité, protože lektiny mohou fungovat jako opsoniny. Propojují hemocyt s patogenem tak, že se na obou koncích vážou na specifické sacharidové struktury. Hrají proto důležitou roli v rozpoznávání cizího, a tím v některých ohledech plní funkci imunoglobulinů u obratlovců (Horák a van der Knaap 1997).

Konkanavalin A (Con A) se specificky váže na povrch hemocytů plže *B. glabrata*. Reakci inhibují D-glukóza a D-manóza. Tyto dva monosacharidy jsou tedy ligandy pro Con A (Yoshino 1981). Specificky se váže také lektin RCA (*Ricinus communis* agglutinin). Reakce je v tomto případě inhibovatelná D-galaktózou (Yoshino 1983). Tímto způsobem se zjistilo, že hemocyty *M. edulis* mají často na povrchu v koncových pozicích galaktózu, N-acetyl-D-glukosamin a N-acetyl-D-galaktosamin (Renwranz et al. 1985). Použitím lektinů je možné rozdělit hemocyty do podobných subpopulací jako při jejich dělení gradientovou centrifugací na eozinofily a bazofily. Použité lektiny měly v tomto případě afinitu převážně k eozinofilům (Pipe et al. 1997).

2.5 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou vysoce specifické molekulární sondy. Efektivně charakterizují buněčné typy a jejich funkce. Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu B-lymfocytů, vážou tedy jen jeden určitý antigen. *In vitro* se monoklonální protilátky získávají izolací těch klonů B-lymfocytů, které produkují protilátky žádané specifity. Klon se musí immortalizovat fúzí s myelomovou buněčnou linií. Výsledkem je hybridom (hybridní buňka), která se neomezeně dělí v kultuře a zároveň produkuje žádané protilátky. Diagnosticky je důležitá tzv. sekundární protilátka (protilátka proti primární protilátce). Je konjugovaná např. s enzymem (křenová peroxidáza) nebo fluorescenční sondou (značení

fluorochromem). Díky tomu se zviditelní místo navázání primární protilátky, a tedy i místo hledaného antigenu.

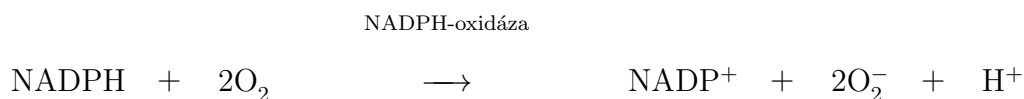
V případě studia měkkýšů byla např. připravena monoklonální protilátka specifická pro granule hemocytů *Crassostrea gigas*. Na základě toho se hemocyty rozdělily na granulocyty a agranulocyty. Hemocyty mají některé antigeny společné, proto se některé protilátky vážou jak na granulocyty, tak na hyalinocyty (Xue a Renault 2001). Protilátka vytvořená proti antigenu jednoho druhu měkkýše je schopná rozeznat „svůj“ antigen u jiného, i příbuzensky vzdáleného měkkýše. Přitom se nemusí shodovat místo značení (u jednoho druhu značí granule, u druhého povrchové struktury). Naopak příbuzné druhy některé antigeny sdílet nemusí (Harris et al. 1992). Pokud se použijí k imunizaci myši oddělené skupiny hemocytů (např. eozinofily a bazofily), vzniknou protilátky specifické pro tyto skupiny. Ty značí nejen granule, ale i hemolymfu. Je možné, že se molekuly (antigeny) dostávají z buňky degranulací a jsou tedy produkovány hemocyty (Dyrynda et al. 1997). Monoklonální protilátky se dají využít při studiu ontogenetického vývoje. Protilátka, která se váže na larvální hemocyty, se u adultních jedinců váže jen na bazofily a nikdy na eozinofily (Dyrynda et al. 1997). Bazofily by se tedy zřejmě mohly dále vyvíjet v eozinofily. Jiná protilátka, která se vážala na hemocyty u adultních jedinců, se zase nevážala na larvální stadia (Xue a Renault 2001).

2.6 Metody detekce respiračního vzplanutí

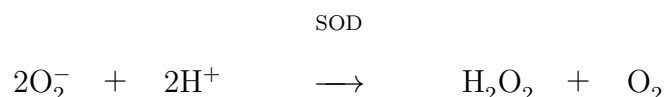
Neutrofilní granulocyty spotřebovávají během fagocytózy mnohem větší množství kyslíku než v klidu. Tento kyslík ale nesouvisí s energetickým metabolismem buňky. Je spotřebován právě na tvorbu ROS. Jeho spotřeba roste s rostoucím množstvím fagocytovaných částic. Kyslík ale není podmínkou k průběhu samotné fagocytózy (Sbarra a Karnovsky 1959). Vznikající ROS jsou mnohem reaktivnější než molekulární kyslík a společně s mikrobicidními látkami pomáhají zničit patogena uvnitř fagosomu. Primární produkt respiračního vzplanutí je superoxidový radikál (O_2^-)¹ (Makino et al. 1986). U měkkýšů, stejně jako u mnoha dalších organismů (i savců), je jeho vznik umožněn membránově vázaným enzymem NADPH-oxidázou (Adema et al. 1993). Enzym katalyzuje produkci

¹Pro jednoduchost je superoxidový radikál (O_2^-) dále označován jako superoxid (O_2^-).

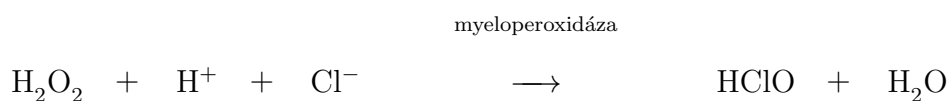
O_2^- přenosem jednoho elektronu z NADPH, který se tímto oxiduje.



Z O_2^- vzniká H_2O_2 . Reakce je katalyzována enzymem superoxid dismutáza (SOD).



Mnoha reakcemi v buňkách vzniká řada vysoce reaktivních oxidantů (O_2^- , hydroxylový radikál (OH^\cdot), singletový kyslík (1O_2), kyselina chlorná (HClO) a $ONOO^-$) i méně reaktivních produktů s poměrně dlouhým poločasem rozpadu (NO, H_2O_2). Většina O_2^- je přeměněna na H_2O_2 a většina H_2O_2 je dále přeměněna myeloperoxidázou² na HClO.



K efektivnímu zabití patogena je třeba produkovat správné oxidanty ve správnou dobu a na správném místě.

2.6.1 Chemiluminiscence

Měření chemiluminiscenční aktivity fagocytů je metoda pro kvantitativní sledování oxidačního vzplanutí fagocytů. Luminofor (světélkující látka) nejprve přijme energii a přejde tak do excitovaného stavu. Excitovaný stav je však nestabilní a proto přechází zpět do základního stavu, přitom se uvolňuje energie ve formě světla. Budící energie je v případě chemiluminiscence energie chemické reakce.

Během respiračního vzplanutí uvnitř fagosomu dochází ke vzniku O_2^- , který reaguje s dalšími částicemi za vzniku nových volných radikálů. Zároveň se při reakcích uvolňuje

²Pro jednoduchost je dále používán termín peroxidáza.

část energie ve formě fotonů. Chemiluminiscence se zesiluje pomocí luminolu (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) nebo lucigeninu (9,9'-bi(10-methylakridinium)dinitrát)). Díky tomu je možné výrazně snížit množství buněk k získání signifikantního výsledku. Produkce kyslíkových radikálů (a tím i chemiluminiscence) se vyvolává vnějšími stimuly. Používají se chemické látky (phorbol myristát acetát(PMA)), které stimulují všechny hemocyty najednou, nebo se mohou použít i částice (bakterie, zymosan).

Chemiluminiscence zesílená luminolem je metoda, kterou můžeme nepřímo zjistit přítomnost O_2^- . Je závislá na přítomnosti myeloperoxidázového systému, samotný O_2^- chemiluminiscenci nezpůsobí (Dahlgren a Stendahl 1983). Spontánní dismutací O_2^- vzniká H_2O_2 , ze kterého pak peroxidáza tvoří $HClO$, která difunduje z buňky a reaguje s luminolem (DeChatelet et al. 1982). Metoda detekuje jak intracelulární, tak extracelulární aktivitu (Dahlgren a Stendahl 1983). Luminol musí projít dvou-elektronovou oxidací, tím se vytvoří nestabilní endoperoxid. Ten se rozkládá na excitovanou kyselinu 3-aminoftalovou, která během relaxace emituje fotony (Merényi et al. 1990). Peroxidáza nemusí být přítomna ve všech případech, a může tedy dojít k falešně negativnímu výsledku.

Chemiluminiscence zesílená lucigeninem je způsobena O_2^- , a je tudíž inhibovatelná SOD (Yazdanbakhsh et al. 1987). Molekuly O_2^- reagují s radikálovou redukovanou formou lucigeninu. Produktem reakce jsou dvě molekuly akridonu, jedna z nich je excitovaná a může emitovat fotony (Faulkner a Fridovich 1993). V poslední době se však ukazuje, že metoda není zcela spolehlivá (Barbacanne et al. 2000). Problém je, že lucigenin může být redukován různými enzymy (např. glukóza-oxidáza, NADPH-oxidáza) a následně je schopný autooxidace a produkce O_2^- . Pak se tedy O_2^- objevuje i na místech, kde normálně nevzniká (Liochev a Fridovich 1997).

2.6.2 Redukce cytochromu C

Produkcí kyslíkových radikálů můžeme zjišťovat pomocí spektrofotometrie. Reakcí sledovaného radikálu s dodaným substrátem vzniká produkt, který mění absorpční roztoku.

Pomocí cytochromu C můžeme detekovat přítomnost O_2^- . Během inkubace hemocytů s cytochromem C a vhodným stimulem dochází superoxidem k redukci ferri-cytochromu na ferrocycyochrom. Množství ferrocycyochromu se měří pomocí absorbance (Babior et al. 1973). Reakce je inhibovatelná SOD, což dokazuje, že redukci způsobuje O_2^- (McCord a Fridovich 1969). Metoda je poměrně citlivá, protože reakce probíhá pomalu.

Navíc extinkční koeficient ferri- a ferrocytochromu se při 550 nm výrazně liší (Butler et al. 1982).

2.6.3 Oxidace fenolové červeně

Metoda slouží k měření koncentrace H_2O_2 . Princip je založený na oxidaci fenolové červeně během reakce křenové peroxidázy s endogenním H_2O_2 . Fenolová červen, neboli fenol sulfonftalein, slouží mj. i jako indikátor pH. Oxidovaná a neoxidovaná forma mají při 610 nm maximální rozdílnou absorbanci, čehož se používá v diagnostice. V koncentracích $1\text{--}60\text{ nmolml}^{-1}$ H_2O_2 je závislost absorbance na koncentraci lineární. Výhoda je, že se produkce H_2O_2 může sledovat až po dobu 1 hod, protože fenolová červen je netoxická látka. Je možné detekovat až 1 nmolml^{-1} H_2O_2 (Pick a Keisari 1980).

2.6.4 Fluorescence kyseliny homovanilové

Další metody k měření respiračního vzplanutí pracují s fluorescenčními sondami. Jsou to chemické látky, které jsou ve své redukované formě nefluorescenční. Oxidace dané látky vede k velkému nárůstu intenzity fluorescence.

Pomocí kyseliny homovanilové (HVA) je možné detekovat přítomnost H_2O_2 . Reakcí peroxidázy s kyselinou homovanilovou za přítomnosti H_2O_2 vzniká kyselina 2,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybiphenyl-5,5'-dioctová, která je fluorescenční. Metoda je přesná, navíc roztok HVA je stabilní. Fluorescence je excitovaná při 315 nm a maximum emise je při 425 nm. Je možné detekovat až $10^{-11}\text{ molml}^{-1}$ peroxidu nebo až 10^{-3} jednotek peroxidázy na 1 ml (Guilbualt et al. 1967).

2.6.5 Fluorescence Amplex Red

Další možností, jak detekovat přítomnost H_2O_2 nebo míru aktivity peroxidázy, je použití Amplex Red. Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) je bezbarvý nefluorescenční derivát dihydroresorufinu. Má vysokou specifitu k H_2O_2 , dovoluje detekci až 50nM koncentrace. V reakci s peroxidázou a H_2O_2 v stechiometrickém poměru 1 H_2O_2 :1 Amplex Red se vytváří vysoce fluorescenční produkt resorufin. Resorufin může být dále oxidován, vzniká již nefluorescenční produkt. K tomu ale nedochází, dokud se v reakční směsi nachází víc Amplex Red než resorufinu (Zhou et al. 1997). Resorufin se také používá jako substrát,

měření má pak ale opačný charakter. Měří se úbytek fluorescence. Tato metoda není tak přesná jako použití Amplex Red (Brotea et al. 1989). Amplex Red je stabilní látka, která dovoluje i dlouhotrvající reakce. Maximum emise je 587 nm, excitace při 536 nm (Zhou et al. 1997).

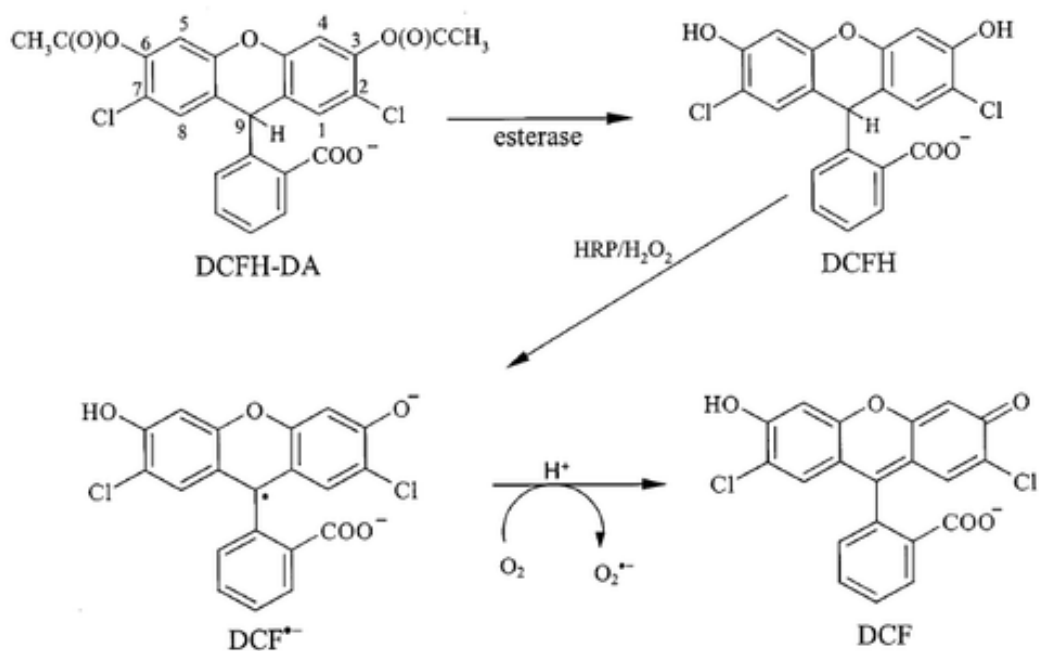
2.6.6 Fluorescence DCFH

Dříve se hodně využívala fluorescenční sonda 2',7'-dichlorofluorescein diacetát (DCFHDA). Molekula DCFHDA je stabilní, nefluorescenční a nepolární, prochází tedy přes membránu. Uvnitř buňky je DCFHDA hydrolyzován esterázami, tím vzniká nefluorescenční polární 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), který už přes membránu neprojde. Je stabilní několik hodin, ale v přítomnosti H_2O_2 a peroxidázy je rychle oxidován na fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), který může být kvantifikován (LeBel et al. 1992). Sonda se dá použít i k detekci pomocí průtokové cytometrie, protože DCFH je uvězněn uvnitř buňky.

V poslední době se ale zjistilo, že tato metoda je pro měření respiračního vzplanutí nevhodná. Kataláza inhibuje reakci, ikdyž se v systému nevyskytuje žádný H_2O_2 . To naznačuje, že nějaké množství H_2O_2 musí přesto během reakcí vznikat. Molekula DCFH je oxidována dvoustupňově, viz obr. 3. Nejprve proběhne za přítomnosti peroxidázy a H_2O_2 oxidace na radikál $DCF^{\cdot-}$. Druhá oxidace probíhá za přítomnosti kyslíku. Vzniká DCF a deprotonací kyslíku O_2^- . Z O_2^- pak může vzniknout H_2O_2 . Reakce je autokatalytická a pro měření H_2O_2 nebo O_2^- nevhodná (Rota et al. 1999).

2.6.7 Oxidace diaminobenzidinu

Oxidací 3,3-diaminobenzidinu (DAB) vzniká elektron-denzní sraženina. Metoda byla poprvé použita k detekci přítomnosti peroxidázy. Exogenně se dodal substrát – H_2O_2 . Peroxidáza uvolňuje z H_2O_2 kyslík, který oxiduje benzidin za tvorby azobarviva (Graham a Karnovsky 1966). Metoda se dá použít i pro detekci endogenního H_2O_2 . Peroxid vodíku lehce difunduje, a nachází se proto na více místech buňky. S peroxidázou a DAB se potkává ve fagosomech. Peroxidáza je do fagosomů nesena aktivně, DAB se tam dostává fagocytózou stimulačních částic. Nedozvíme se tedy nic o místě vzniku H_2O_2 . Použitím inhibitorů peroxidázy se žádný produkt reakce nevytvoří. Touto metodou se tedy dá měřit přímo přítomnost H_2O_2 (Briggs et al. 1975).



Obr. 3: Autooxidace DCFH; dle Rota et al. 1999.

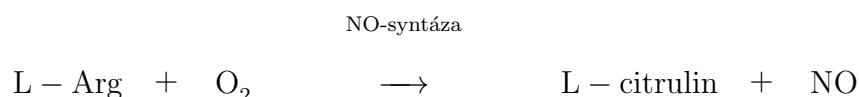
2.6.8 Redukce NBT

Tetrazoliová modř (nitroblue tetrazolium, NBT) je za přítomnosti O_2^- redukována. Z rozpustné látky vzniká nerozpustná modrá sraženina – formazan (Gordon et al. 1973). Přidáním SOD se reakce neinhibuje, vlivem kompetice o O_2^- dochází jen ke zpomalení reakce (Gulyaeva et al. 1987). Formazan se v buňkách nachází ve dvou formách, a to jako velký černý depozit ve fagosomu nebo jako mnoho černých skvrnek rozestých po cytoplazmě. V druhém případě se někdy výsledek nepovažuje za pozitivní (Freeman a King 1972).

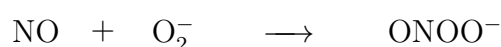
2.7 Metody měření produkce oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je vysoce reaktivní a nestabilní plynný volný radikál. Je produkován oxidací L-argininu za vzniku L-citrulinu a NO enzymem NO-syntázou (NOS). První potvrzení přítomnosti NOS u měkkýšů pochází ze sladkovodního plže *V. ater* (Conte a Ottaviani

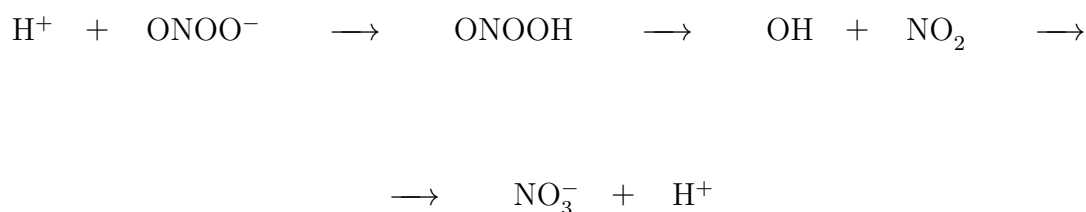
1995).



Funkce NOS je závislá na přítomnosti L-Arg, ale pouze za jeho nedostatku se spustí tvorba i druhého důležitého produktu – superoxidu. Jen v případě, že dochází jak k produkci NO, tak O_2^- , vzniká vysoce reaktivní ONOO^- (Xia a Zweier 1997). Existují tedy dvě nezávislé cesty tvorby O_2^- , přes NADPH-oxidázu a NOS.



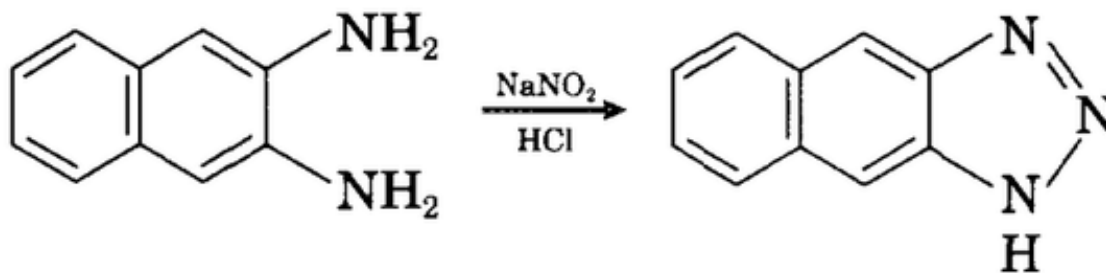
Oxid dusnatý je velice nestabilní, má krátký poločas rozpadu. Reaguje s volným kyslíkem za tvorby nitrátů a nitritů. Peroxynitrit je v alkalických roztocích poměrně stabilní. Ale jakmile je jednou protonovaný, také se rychle rozpadá (Beckman et al. 1990).



Peroxynitrit je coby silné nitratační činidlo schopný modifikovat proteiny, lipidy a DNA a vyčerpává antioxidační obranu (Virág et al. 2003). Přímé měření NO je poměrně složité kvůli jeho malé stabilitě. Vzniklé nitráty a nitrity se však už dají stanovit. Tvorba NO se tedy měří nepřímo přes jeho produkty.

2.7.1 Griessova reakce

Griessova reakce byla poprvé použita na konci 19. století. Slouží ke stanovení koncentrace nitritu. Princip spočívá v diazotaci (produktem jsou diazoniové soli) kyseliny sulfanylové nitritem. Vzniklý produkt se propojí s etylendiaminem a vzniká růžový metabolit (viz obr. 4), který se stanovuje spektrofotometricky (Griess 1879; cit. dle Guevara et al. 1998). Dá se měřit pouze koncentrace nitritu. Proto se při stanovování musí přidat nitrátoreduktáza, která veškerý nitrát přemění na nitrit.



Obr. 4: Griessova reakce; dle Misko et al. 1993.

2.7.2 Reakce s diaminonaftalenem

Reakce s diaminonaftalenem slouží také ke stanovení nitritu. Za přítomnosti nitritu se 2,3-diaminonaftalen přemění na 1-(H)-naftotriazol. Výsledný produkt je fluorescenční. Tato metoda je až 100krát citlivější než Griessova reakce, detekuje až 10 nM nitritu. Limit Griessovy reakce je 1–2 μM . Nitrát musí být opět převeden na nitrit (Misko et al. 1993).

2.7.3 Chemiluminiscence

Ke stanovení přítomnosti ONOO^- se dá použít chemiluminiscence. Vzniklý ONOO^- způsobuje (stejně jako kyslíkové radikály) oxidaci luminolu. Míra chemiluminiscence je závislá na jeho koncentraci a je zesílena za přítomnosti hydrogenuhličitanu (HCO_3^-). Reakce je inhibovatelná SOD, takže O_2^- je klíčový během chemiexcitace. Během reakce ONOO^- s HCO_3^- a luminolem vzniká luminolový radikál a O_2^- . Luminol reaguje s tímto O_2^- za vzniku endoperoxidu. Samotný NO ani O_2^- chemiluminiscenci nezpůsobí, ONOO^- je nezbytně nutný (Radi et al. 1993).

2.7.4 Radioaktivní značení

Aktivita NOS se dá měřit pomocí přeměny radioaktivně značeného argininu ($[^3\text{H}]\text{L-Arg}$ nebo $[^{14}\text{C}]\text{L-Arg}$) na citrulin ($[^3\text{H}]\text{L-citrulin}$ nebo $[^{14}\text{C}]\text{L-citrulin}$). Po oddělení argininu od citrulinu se množství radioaktivního produktu změří pomocí kapalinové scintilace (Conte a Ottaviani 1995). To je metoda založená na měření radiace beta-záření z nuklidu.

Závěr

V této práci jsem shrnula různé metody, pomocí kterých se dají studovat funkční i morfologické vlastnosti hemocytů měkkýšů. Takových metod je celá řada. Používají se jak poměrně staré metody, tak i zcela nové. Všechny se však s rozvojem vědy neustále zdokonalují. A i ta nejstarší metoda, mikroskopie, se používá stále velice často. Její počátky spadají až do roku 1590 a používá se primárně ke studiu morfologie buněk. Chceme-li se podívat na větší detaily, můžeme použít monoklonální protilátky nebo lektinové sondy, pomocí kterých detekujeme už jednotlivé povrchové antigeny. Další charakteristické vlastnosti hemocytů, jejich velikost a vnitřní komplexita, se určují pomocí gradientové centrifugace nebo průtokové cytometrie. Ke sledování aktivity hemocytů, produkce kyslíkových radikálů nebo oxidu dusnatého, se využívají různé chemické reakce. Dodaný substrát reaguje s radikálem, a tím mění své vlastnosti. Může začít fluorescenčně zářit, změnit absorbanci roztoku nebo vytvořit viditelnou sraženinu. Kombinací těchto metod lze sledovat interakce hemocytů s patogenem.

Hemocyty jsou hlavní složkou imunitního systému měkkýšů. Díky nim jsou měkkýši schopní odolávat nálezům patogeny z různých taxonomických skupin. V parazitologii jsou známí především coby mezihostitelé motolic, včetně takových, které mohou ohrozit i člověka, a tak je studiu imunitního systému měkkýšů věnována velká pozornost. Přesto stále není mnoho otázek zodpovězeno. Dosud není ani jednotný názor na to, zda existuje pouze jeden typ hemocytů nebo jich je více. Také není známa většina molekulárních faktorů ovlivňujících kompatibilitu dvojice plž–motolice. Přesně se neví, proč jsou někteří jedinci vůči nákaze vnímaví a jiní rezistentní.

Ve své budoucí diplomové práci bych se proto zaměřila na studium buněčné imunitní odpovědi plžů rodu *Radix* experimentálně infikovaných *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia szidati* a *Fascioloides magna*. Chtěla bych se věnovat vlivu parazita na aktivitu hemocytů v imunitní odpovědi.

Použitá literatura

- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P. W., Meuleman, E. A., Sminia, T. Generation of oxygen radicals in haemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(1-2):17–26, 1991.
- Adema, C. M., Harris, R. A., van Deutekom-Mulder, E. C. A comparative study of haemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(1):24–32, 1992.
- Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P. W., Sminia, T. NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(5):379–383, 1993.
- Adema, C. M., Mohandas, A., van der Knaap, W. P. W., Sminia, T. Separation of *Lymnaea stagnalis* haemocytes by density gradient centrifugation. *Developmental and Comparative Immunology*, 18(1):25–31, 1994.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K. A., Ford, S. E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, 13(2):141–158, 2002.
- Ashton-Alcox, K. A., Ford, S. E. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue and Cell*, 30(2):195–204, 1998.
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., Curnutte, J. T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(3):741–744, 1973.
- Barbacanne, M. A., Souchard, J. P., Darblade, B., Iliou, J. P., Nepveu, F., Pipy, B., Bayard, F., Arnal, J. A. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5):388–396, 2000.

- Barron, E. S. G., Dickman, S., Muntz, J. A., Singer, T. P. Studies on the mechanism of action of ionizing radiations, I. inhibition of enzymes by X-rays. *The Journal of General Physiology*, 32:537–552, 1949.
- Bayne, J. C. Molluscan internal defense mechanism: the fate of ^{14}C -labelled bacteria in the land snail *Helix pomatia*. *Journal of Comparative Physiology*, 86:17–25, 1973.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87(4):1620–1624, 1990.
- Bender, R. C., Broderick, E. J., Goodall, C. P., Bayne, C. J. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H_2O_2 than susceptible snails. *Journal of Parasitology*, 91(2):275–279, 2005.
- Bigas, M., Durfort, M., Poquet, M. Cytological response of hemocytes in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, experimentally exposed to mercury. *BioMetals*, 19(6):659–673, 2006.
- Briggs, R. T., Karnovsky, M. L., Karnovsky, M. J. Cytochemical demonstration of hydrogen peroxide in polymorphonuclear leukocyte phagosomes. *The Journal of Cell Biology*, 64(1):254–260, 1975.
- Brotea, G. P., Draisey, T. F., Thibert, R. J. Fluorometric determination of cholesterol using an oxidase-peroxidase-resorufin system. *Microchemical Journal*, 39(1):1–9, 1989.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology*, 142(2):145–156, 2000.
- Butler, J., Koppenol, W. H., Margoliash, E. Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion. *The Journal of Biological Chemistry*, 257:10747–10750, 1982.

- Cajaraville, M. P., Santi, G. P. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Structure and Function*, 20(5):355–367, 1995.
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(2):96–105, 1997a.
- Carballal, M. J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 7:403–416, 1997b.
- Carballal, M. J., López, M. C., Azevedo, C., Villalba, A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29:127–135, 1997c.
- Chang, S.-J., Tseng, S.-M., Chou, H.-Y. Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 44(1):144–153, 2005.
- Cheng, T. C. Aspects of substrate utilization and energy requirement during molluscan phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(2):263–268, 1976.
- Cheng, T. C. Bivalves. V Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F. (Ed.) *Invertebrate Blood Cells*, 1, str. 233-300. London : Academic Press, 1981.
- Cheng, T. C. Internal defense mechanisms of molluscs against invading microorganisms: personal reminiscences. *Transactions of the American Microscopical Society*, 102(3): 185–193, 1983a.
- Cheng, T. C. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoologist*, 23 (1):129–144, 1983b.
- Cheng, T. C., Garrabrant, T. A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 7(6):467–472, 1977.

- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M. G., Ballarin, L. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum*: morphofunctional characterisation. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(8): 677–693, 2000.
- Connors, V. A., Yoshino, T. P. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 76(6):895–902, 1990.
- Conte, A., Ottaviani, E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters*, 365(2-3):120–124, 1995.
- Dahlgren, C., Stendahl, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, 39(2):736–741, 1983.
- Day, E. D., McMillan, P. N., Mickey, D. D., Appel, S. H. Zonal centrifuge profiles of rat brain homogenates: instability in sucrose, stability in iso-osmotic ficoll-sucrose. *Analytical Biochemistry*, 39(1):29–45, 1971.
- de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60(4):604–617, 1955.
- DeChatelet, L. R., Long, G. D., Shirley, P. S., Bass, D. A., Thomas, M. J., Henderson, F. W., Cohen, M. S. Mechanisms of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 129(4):1589–1593, 1982.
- Dyrynda, E. A., Pipe, R. K., Ratcliffe, N. A. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell and Tissue Research*, 289(3):527–536, 1997.
- Faulkner, K., Fridovich, I. Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- . *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4):447–451, 1993.
- Foley, D. A., Cheng, T. C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25(2):189–197, 1975.

- Foley, D. A., Cheng, T. C. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29(3):321–325, 1977.
- Ford, S. E., Ashton-Alcox, K. A., Kanaley, S. A. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(2):114–122, 1994.
- Franchini, A., Fontanili, P., Ottaviani, E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110(2):403–407, 1995.
- Freeman, R., King, B. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test. *Journal of Clinical Pathology*, 25(10):912–914, 1972.
- Friebel, B., Renwranz, L. Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(1):81–90, 1995.
- Gordon, A. M., Rowan, R. M., Brown, T., Carson, H. G. Routine application of the nitroblue tetrazolium test in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Pathology*, 26(1):52–56, 1973.
- Graham, R. C., Karnovsky, M. J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 14(4):291–302, 1966.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 274(2):177–188, 1998.
- Guilbualt, G. G., Kramer, D. N., Hackley, E. A new substrate for fluorometric determination of oxidative enzymes. *Analytical Chemistry*, 39(2):271–272, 1967.
- Gulyaeva, N. V., Obidin, A. B., Marinov, B. S. Modulation of superoxide dismutase by electron donors and acceptors. *FEBS letters*, 211(2):211–214, 1987.

- Halliwell, B., Aruoma, O. I. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 281(1-2):9–19, 1991.
- Harris, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266:446–464, 1970.
- Harris, R. A., Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C. A comparative study of haemocytes from six different snails: surface staining with lectins and monoclonal antibodies. *Comparative Haematology International*, 2(1):30–34, 1992.
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., Soudant, P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293(2):237–248, 2003.
- Horák, P., van der Knaap, W. P. W. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica*, 44:161–172, 1997.
- Kurokawa, M., Sakamoto, T., Kato, M. Distribution of sodium-plus-potassium-stimulated adenosine-triphosphatase activity in isolated nerve-ending particles. *Biochemical Journal*, 97(3):833–844, 1965.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2):227–231, 1992.
- Liochev, S. I., Fridovich, I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337(1):115–120, 1997.
- Loker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M., Kruse, K. T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 68(1):84–94, 1982.
- López, C., Villalba, A., Bachére, E. Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of the clam, *Ruditapes desussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(3):188–192, 1994.

- López, C., Carballal, M. J., Azevedo, C., Villalba, A. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 30(209-215), 1997.
- Makino, R., Tanaka, T., Iizuka, T., Ishimura, Y., Kanegasaki, S. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 261:11444–11447, 1986.
- Matricón-Gondran, M., Letocart, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3):224–234, 1999.
- McCord, J. M., Fridovich, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049–6055, 1969.
- Merényi, G., Lind, J., Eriksen, T. E. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 5(1):53–56, 1990.
- Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M., Currie, M. G. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 214(1):11–16, 1993.
- Moore, C. A., Gelder, S. R. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Transactions of the American Microscopical Society*, 104(3):242–249, 1985.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, 4(4):423–430, 2000.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J. I. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(3):390–394, 2004.
- Oliver, L. M., Fisher, W. S. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(217-225), 1995.

- Ottaviani, E., Franchini, A., Barbieri, D., Kletsas, D. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: presence of two aging-related hemocyte stages. *Italian Journal of Zoology*, 65(4):349–354, 1998.
- Pampanin, D. M., Marin, M. G., Ballarin, L. Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the venus clam *Chamelea gallina*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49:227–234, 2002.
- Pertoft, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 44(1-2):1–30, 2000.
- Pertoft, H., Rubin, K., Kjellén, L., Laurent, T. C., Klingeborn, B. The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll. *Experimental Cell Research*, 110(2):449–457, 1977.
- Pick, E., Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, 38(1-2):141–170, 1980.
- Pipe, R. K. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Research*, 261(2):261–268, 1990.
- Pipe, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 16(2-3):111–122, 1992.
- Pipe, R. K., Farley, S. R., Coles, J. A. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research*, 289(3):537–545, 1997.
- Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S., Freeman, B. A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochemical Journal*, 290(1):51–57, 1993.
- Renault, T., Xue, Q. G., Chilmonczyk, S. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(3):269–274, 2001.
- Renwantz, L., Daniels, J., Hansen, P.-D. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 9:203–210, 1985.

- Rota, C., Chignell, C. F., Mason, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7-8):873–881, 1999.
- Russel-Pinto, F., Reimao, R., Sousa, M. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 4:383–397, 1994.
- Sbarra, A. J., Karnovsky, M. L. The biochemical basis of phagocytosis: metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 234(6):1355–1362, 1959.
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132(2):423–431, 2002.
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(3):197–205, 2003.
- Torreilles, J., Guérin, M. C. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(7):509–518, 1999.
- Tripp, M. R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *The American Society of Parasitologists*, 47(5):745–751, 1961.
- Virág, L., Szabó, E., Gergely, P., Szabó, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters*, 141:113–124, 2003.
- Wolf, D. A., Pertoft, H. Separation of HeLa cells by colloidal silica density gradient centrifugation. I. Separation and partial synchrony of mitotic cells. *Journal of Cell Biology*, 55(3):579–585, 1972.
- Xia, Y., Zweier, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide

- synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94 (13):6954–6958, 1997.
- Xue, Q., Renault, T. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(3):187–194, 2001.
- Xue, Q., Renault, T., Cochenec, N., Gerard, A. Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(2):155–165, 2000.
- Xue, Q. G., Renault, T., Chilmonczyk, S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(7):557–567, 2001.
- Yazdanbakhsh, M., Eckmann, C. M., Boer, M., Roos, D. Purification of eosinophils from normal human blood, preparation of eosinoplasts and characterization of their functional response to various stimuli. *Immunology*, 60(1):123–129, 1987.
- Yoshino, T. P. Comparison of concanavalin A-reactive determinants on hemocytes of two *Biomphalaria glabrata* snail stocks: receptor binding and redistribution. *Developmental and Comparative Immunology*, 5:229–239, 1981.
- Yoshino, T. P. Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes. *Developmental and Comparative Immunology*, 7:641–644, 1983.
- Yoshino, T. P., Cheng, T. C. Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 95(2):215–220, 1976.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry*, 253(2):162–168, 1997.