Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

Victoria Klosse

Interakce mezi hostitelem a patogenní amébou *Acanthamoeba castellanii*

Interaction between a host and pathogenic amoeba *Acanthamoeba castellanii*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Machovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a odborné rady, které mi pomohly k vypracování této práce.

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,

Victoria Klosse

Abstrakt

Acanthamoeba castellanii je volně žijící prvok, který může způsobovat závažná lidská onemocnění. Mezi tato onemocnění patří acanthamoebová keratitida a granulomatózní acanthamoebová encefalitida. V případě acanthamoebové keratitidy améba způsobuje zánětlivé onemocnění rohovky, které může v krajních případech končit oslepnutím. Granulomatózní acanthamoebová encefalitida, která postihuje hlavně imunodeficientní jedince, vede k zánětlivému onemocnění mozku a často končí smrtí. Cílem práce je objasnit interakce mezi touto patogenní amébou a hostitelem při těchto chorobách. Zvláštní pozornost bude věnována enzymatické výbavě *A. castellanii* přispívající k její patogenezi, interakcím améby s hostitelskou tkání a složkám hostitelského imunitního sytému, které se podílejí na obraně proti amébovým infekcím.

Klíčová slova: *Acanthamoeba castellanii,* acanthamoebová keratitida, granulomatózní acanthamoebová encefalitida, imunitní odpověď

Abstract

Acanthamoeba castellanii is a free-living protozoa that can cause serious human illnesses. These illnesses include *Acanthamoeba* keratitis and granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis. In the case of *Acanthamoeba* keratitis, the amoeba can cause an inflammatory disease of the cornea, which can, in extreme cases, cause blindness. Granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis, which mainly affects immunodeficient individuals, leads to an inflammatory disease of the brain and is often fatal. The goal of this work is to elucidate the interaction between this pathogenic amoeba and the host of these diseases. Special attention will be paid to the enzymes of A. castellanii contributing to its pathogenesis, by way of interaction between the amoeba and the hosts tissue and components of the hosts immune system, which are involved in the defence against amoebic infections.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba* keratitis, granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis, immune response

Obsah

1 Úvod 1

2 Lidský imunitní systém 2

2.1 Vrozená imunita 2

2.1.1 Buněčná složka vrozené imunity 2

2.1.2 Humorální složka vrozené imunity 4

2.2 Specifická imunita 4

3 Acanthamoeba 5

3.1 Enzimatická výbava A. castellanii spojená s její patogenezí 7

3.2 cytopatický efekt A. castellanii 8

4 Acanthamoebová keratitida 9

4.1 Rizikové faktory pro vznik onemocnění 10

4.2 Přichycení acanthamoeby na rohovku 10

4.2.1 Vazba A. castellanii na manózu glykoproteinů 10

4.2.2 Vazba acanthamoeby na proteiny extracelulární matrix 11

4.2.3 Vazba acanthamoeby na glykolipidy 11

4.3 Vniknutí acanthamoeby do oka 11

5 Granulomatózní acanthamoebová encefalitida 12

5.1 Vniknutí améb do organismu hostitele 14

5.2 Průnik acanthamoeby epitely pomocí modulace poměrů claudinů 14

5.3 Interakce acanthamoeby s hematoencefalickou bariérou 15

6 Imunitní odpověď 16

6.1 Nespecifická imunita 16

6.1.1 Interakce trofozoitů s makrofágy 16

6.1.2 Neutrofily 17

6.2 Role komplementu 17

6.3 Imunitní odpověď u acanthamoebové keratitidy 18
6.3.1 Vrozená imunitní odpověď při Acanthamoebové karatitidě 18
6.3.2 Specifická imunitní odpověď při acanthamoebové keratitidě 19
6.4 Imunitní odpověď při acanthamoebové granulomatózní encefalitidě 20
6.4.1 Toll-like receptory (TLR2 a TLR4) 20
6.4.2 Mikroglie 20
7 Závěr 21
8 Seznam použité literatury 23

1 Úvod

Acanthamoeba castellanii je běžný prvok ze superskupiny Amoebozoa. Vyskytuje se ve dvou životních stádiích: cysty a trofozoiti. Trofozoiti jsou charakterističtí svými akantopodii. Za nepříznivých podmínek tento organismus tvoří cysty. Cysty jsou dvoustěnné a jejich vnitřní stěna je pozitivní na celulózu (Page, 1967). *A. castellanii* může způsobovat řadu chorob nejen u lidí. V mé bakalářské práci se budu zabývat acanthamoebovou keratitidou a granulomatózní acanthamoebovou encefalitidou. Zaměřím se právě na tyto dvě choroby, protože acanthamoebová keratitida patří mezi nejobvyklejší nemoci způsobované touto amébou a granulomatózní acanthamoebová encefalitida je sice velmi vzácná, ale pro pacienta mívá většinou fatální následky.

Acanthamoebová keratitida je onemocnění rohovky způsobované touto amébou. Projevuje se podrážděnými víčky, překrvenými spojivkami a zakaleným stromatem (Van Klink et al., 1993). Rizikovými faktory pro vznik keratitidy jsou historie očního traumatu, používání kontaktních čoček či jejich špatná dezinfekce a kontakt s kontaminovanou vodou (Stehr-Green ez al., 1989; Carnt et al. 2018). Acanthamoebové keratitidě předchází navázaní améby na rohovkový epitel, poté se patogen šíří do dalších vrstev rohovky, které poškozuje (Moore et al., 1991; Niederkorn et al., 1992).

Acanthamoebová granulomatózní encefalitida je onemocnění způsobující poškození centrální nervové soustavy. Onemocnění se nejčastěji objevuje u lidí s poškozenou imunitou. Mezi příznaky patří například bolest hlavy, závratě nebo zvýšená teplota (Damhorst et al. 2022; Zamora et al., 2014). Vstup améby do organismu je umožněn hned několika způsoby, jako je vstup do centrální nervové soustavy přes nosní mukózu, přes plicní tkáň a přes kožní léze (Culbertson et al., 1959; Gullett et al., 1979). Při přenosu patogenu krví musí améba před vstupem do centrální nervové soustavy překonat překážku ve formě hematoencefalické bariéry (Alsam et al., 2003; Culbertson et al., 1959).

Pro správnou diagnostiku a léčbu acanthamoebové keratitidy a granulomatózní acanthamoebové encefalitidy je důležitá znalost interakcí mezi hostitelem a *A. castellanii*. Cílem této práce bude nastínit mechanismus vniku améby do hostitele, interakce mezi patogenem a hostitelskou tkání a imunitní odpověď hostitele na infekci.

2 Lidský imunitní systém

Lidské tělo se brání vstupu patogenů anatomickými a fyziologickými bariérami, vrozenou imunitou a specifickou imunitou. Všechny imunitní buňky se vyvíjejí z pluripotentních kmenových buněk v játrech u embrya a po narození se vývoj přesune do kostní dřeně. T lymfocyty dokončují svůj vývoj v brzlíku (Delves & Roitt, 2000).

2.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita má limitovaný počet receptorů pro rozpoznávání patogenů. Proto tyto receptory rozeznávají konzervované mikrobiální komponenty, které jsou společné pro řadu skupin mikroorganismů. Imunologická paměť zde není přítomna, proto jsou charakteristiky imunitní odpovědi na mikroorganismus stále stejné, nehledě na to, kolikrát se imunitní systém hostitele s patogenem setkal. Hlavní výhoda vrozené imunity oproti specifické je její rychlost při odpovědi na patogen. Vrozená imunita se skládá ze dvou složek: buněčné a humorální (Delves & Roitt, 2000).

2.1.1 Buněčná složka vrozené imunity

Mezi buněčné složky vrozené imunity patří fagocyty, jako jsou neutrofily, monocyty a makrofágy, buňky uvolňující prozánětlivé mediátory (bazofilní granulocyty a eozinofilní granulocyty) a žírné buňky (Delves & Roitt, 2000)

Eozinofilní granulocyty mohou být aktivovány pomocí komplementu, cytokinů nebo imunoglobulinů (Ig). Po aktivaci se z krevního řečiště stahují do místa infekce a produkují prozánětlivé cytokininy. Eozinofilní granulocyty jsou pouze slabě fagocytující, zneškodňují patogeny uvolňováním eozinofilních kationických proteinů a metabolitů s reaktivním kyslíkem do svého okolí. Účastní se také degranulace bazofilních granulocytů a mohou fungovat jako antigen prezentující buňky (Delves, Roitt 2000; Rothenberg, Hogan 2006).

Bazofilní granulocyty a žírné buňky mají na svém povrchu receptory pro IgE, díky kterým se tyto Ig mohou vázat na povrch bazofilního granulocytu a aktivovat ho. Po aktivaci tyto buňky produkují prozánětlivé faktory (Delves & Roitt, 2000).

Makrofágy patří mezi antigen prezentující buňky. Produkují celou řadu cytokininů, jako jsou interleukin (IL) 1, 6, 8 a 12, faktor nádorové nekrózy α (TNFα), interferon (IFN) α, β a další.

Jsou vybaveny receptory pro sacharidy, jako je manóza, které se většinou nevyskytují na povrchu buněk obratlovců, díky tomu jsou makrofágy schopny rozeznat cizí buňky od buněk vlastního organismu. U makrofágů i neutrofilů se také objevují receptory pro protilátky a komplement. Protilátky a proteiny komplementu se vážou na povrchy patogenů. Patogeny jsou po odhalení zneškodněny fagocytózou. Aktivované makrofágy fungují jako antigen prezentující buňky (Delves, Roitt 2000; Cavaillon 1994).

Neutrofily jsou nejpočetnější buňky imunitního sytému, mají na svém povrchu receptory rozpoznávající cukry a proteiny patogenních organismů. Ty poté zneškodňují pomocí fagocytózy, nebo pomocí toxických látek jako je myeloperoxidáza (MPO) a reaktivních forem kyslíku (Delves & Roitt, 2000).

Langerhansovy buňky patří k buňkám dendritickým. Mohou být aktivovány, pokud jejich receptory přijdou do kontaktu s PAMPs (konzervované molekulární struktury, které se objevují na povrchu mikroorganismů), IFN α, nebo s proteiny tepelného šoku. Molekuly fungující jako receptory pro PAMP mohou být manosové receptory a receptory pro lipopolysacharidy (LPS). Po aktivaci fungují jako antigen prezentující buňky, dochází k navýšení exprese CD80 a CD86. Jedná se o povrchové molekuly, které jsou schopny aktivace lymfocytů. Aktivované dendritické buňky putují do lokálních lymfatických uzlin, kde je antigen rozštěpen na jednotlivé peptidy, které jsou prezentovány na MHCII molekulách T buňkám pomocí T pomocných buněk (Delves & Roitt, 2000).

Natural killers (přirození zabijáci neboli NK buňky) mají na svém povrchu receptory pro IgG. Tyto Ig se váží na infikované nebo maligní buňky. Po navázání IgG na receptor jsou patogeny NK buňkami zlikvidovány pomocí procesu buněčné cytotoxicity závislé na protilátce. Mohou také zneškodňovat buňky, které na svém povrchu nemají MHC I molekuly (buňky poškozené nebo infikované). NK buňky uvolňují do svého okolí perforiny (molekuly tvořící póry v plazmatické membráně cílových buněk), do poškozených buněk poté vpraví cytotoxické látky granzymy. Granzymy jsou serinové proteázy, které v cílových buňkách spouští apoptózu. MHC I molekuly se objevují na všech tělních buňkách s jádrem, při navázání těchto molekul na inhibiční receptor NK buněk nedochází k aktivaci cytopatického efektu (Delves & Roitt, 2000).

2.1.2 Humorální složka vrozené imunity

Součástí humorální vrozené imunity jsou proteiny komplementu, cytokiny a bílkoviny akutní fáze. K aktivaci komplementu dochází pomocí enzymatické kaskády, která je spuštěna třemi různými cestami. Po aktivaci je komplement C3 rozštěpen proteázou a její fragment C3b se váže na povrch mikroorganismu. Fagocytující imunitní buňky mají na svém povrchu receptor pro molekulu C3b a po spojení tohoto receptoru s ligandem C3b dochází k fagocytóze patogenu. Ostatní fragmenty (C3a, C4a a C5a) interagují s bazofilními granulocyty a ty poté do svého okolí uvolňují zánětlivé mediátory. C5 je chemický atraktant pro neutrofily. C5b, C6, C7, C8 a C9 indukují smrt cílové buňky narušením její plazmatické membrány. Cytokiny přenáší informaci mezi jednotlivými složkami imunitního systému, mezi imunitním systémem a ostatními systémy organizmu a také se přímo účastní obrany organismu (Delves & Roitt, 2000).

2.2 Specifická imunita

Adaptivní imunita je evolučně novější a nachází se u obratlovců. Buňky adaptivní imunity jsou schopné rozpoznávat specifický patogen, na rozdíl od imunity vrozené. Tato schopnost je dána vznikem specifických receptorů pro patogen procesem somatické rekombinace. Buňky s těmito receptory v těle organismu mohou přetrvávat a tvořit tak imunologickou paměť. Složkami adaptivní imunity jsou T a B lymfocyty. Lymfocyty vznikají v brzlíku nebo kostní dřeni a poté se přesouvají do sekundárních lymfatických orgánů, jako jsou lymfatické uzliny nebo slezina. Zde se buňky adaptivní imunity setkávají s patogenem, čímž dochází k vytvoření adaptivní imunitní odpovědi. Poté lymfocyty cestují po těle a stávají se imunokompetentními (Bonilla & Oettgen, 2010).

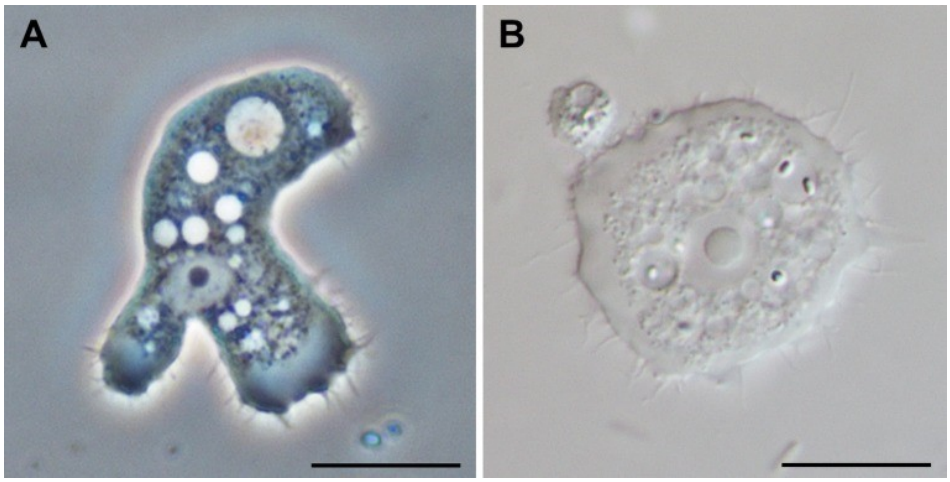
B lymfocyty produkují Ig, které mohou být volné, nebo vázané v cytoplazmatické membráně, kde fungují jako receptory. Jsou tvořeny glykoproteiny a dělí se do pěti tříd: IgA, IgB, IgM, IgD a IgE. V ontogenezi vznikají postupně dva typy B lymfocytů. B1 lymfocyty, vznikají jako první, jsou zdrojem IgM. Jako druhé vznikají B2 buňky, které mají na svém povrchu IgM a IgD protilátky. Po setkání s antigenem produkují již všechny typy protilátek. Ig zneškodňují patogen pomocí aktivace komplementu, inhibice vazby mikroorganismu na hostitelskou buňku, shlukování mikroorganismů procesem aglutinace, aktivace bazofilních granulocytů a indukce fagocytózy (Bonilla, Oettgen 2010; Delves, Roitt 2000).

Na membráně T lymfocytů jsou CD3, CD4 a CD8 molekuly, které jsou součástí T receptorového komplexu. CD4 se vážou na MHC II a buňky s touto molekulou fungují jako T pomocné buňky. T pomocné buňky produkují celou řadu cytokininů, jako jsou IFN γ, IL 4, 5, 12 a další. Tyto cytokininy se účastní aktivace mononukleárních fagocytů a zvyšují míru odpovědi T a B buněk na patogen. T lymfocyty s CD8 molekulou jsou cytotoxické; zneškodňují buňky napadené patogeny pomocí svých cytotoxických granulí, které splývají s membránou cílové buňky a zničí ji. Mezi cytotoxické látky obsažené v granulích patří granzymy (Bonilla & Oettgen, 2010).

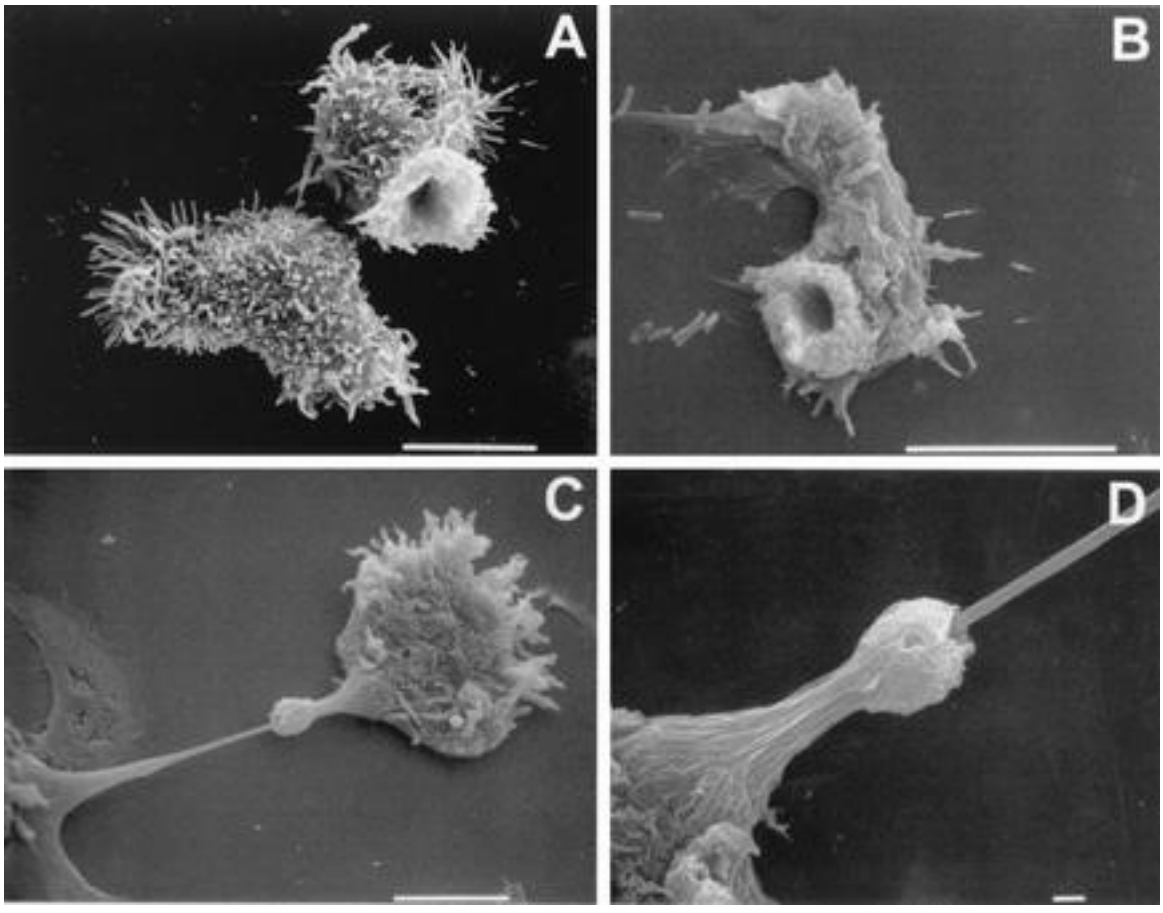
3 *Acanthamoeba*

Acantahamoeba je celosvětově rozšířený eukaryotický organismus patřící do superskupiny Amoebozoa (Adl et al., 2005). V přírodě se objevuje ve vodě a v půdě. Živí se bakteriemi, kvasinkami a řasami. Mohou se objevovat v nazální mukóze jako komenzálové (Badenoch et al., 1988), ale i jako parazité způsobující granulomatózní amébovou encefalitidu a amébovou keratitidu.

Acanthamoeby mají dvě stádia, kterými je dormantní cysta a aktivní trofozoit. Velikost trofoziota v pohybu je 20,7 do 45,5 μm a v jeho buňkách se nachází jedno jádro o průměru 4,1-7,6 μm. Jako zásobní látky tyto organismy využívají lipidy i polysacharidy. Příjem potravy je umožněn pomocí formace food cup, jedná se o způsob pohlcení potravy endocytózou, nejčastěji sinic nebo bakterií. Při procesu tvoření food cup se nejprve formují dvě lobopodia, které se poté střetávají a vytvářejí potravní vakuolu. Tato vakuola v místě střetu panožek komunikuje s okolním prostředím pomocí malého otvoru, který slouží k vypuzení přebytečné vody. Pohyb trofozoita je neeruptivní, na anteriorní straně buněk se při něm vytvářejí panožky z hyalinní cytoplazmy a na posterioru je uropod. Uropod je stejně jako celý povrch trofoziota pokryt acanthopodii. Organismy udržují svůj nitrobuněčný tlak pomocí několika menších kontraktilních vakuol, které ústí na posteriorním konci améb. Cysty se formují za nepříznivých podmínek. Jsou dvoustěnné a jejich průměr se pohybuje od 12 do 21 μm. U *A. castellanii* je vnitřní stěna cysty kulovitá s častými nepravidelně rozmístěnými výběžky, které tvoří kontakt s vnější stěnou cysty. Vnější stěna je nepravidelná s mnohými záhyby a prohlubněmi. Tyto dvě stěny se svým složením od sebe liší, v obou stěnách se nachází lipidy a vnitřní stěna cysty je pozitivní na celulózu a proteiny (Page, 1967).

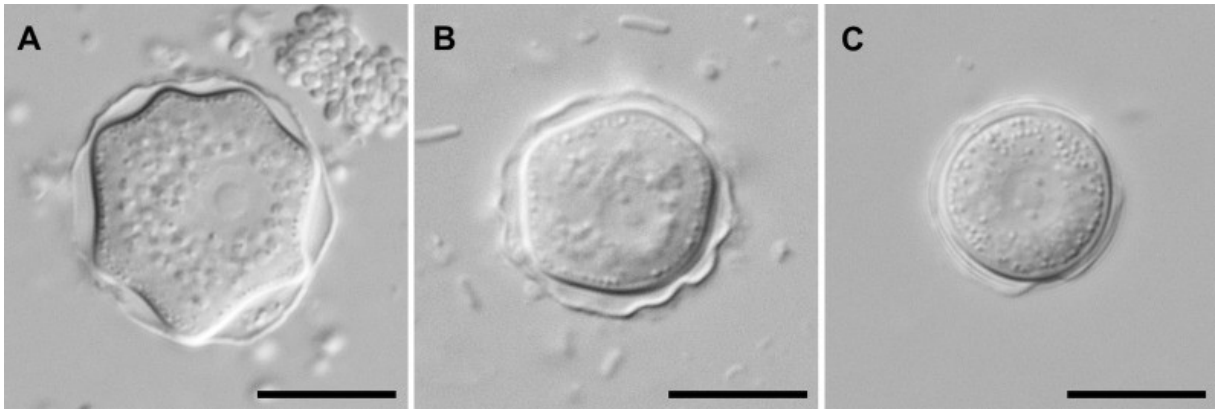


Obrázek 1: Trofozoiti s charakteristickými akantopodii (A) kontrastní mikroskopie, (B) bright field mikroskopie (Lorenzo-Morales et al., 2015)



Obrázek 2: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu zobrazující formaci food cup. (A) food cup u *A. culbertsoni*, (B) food cup u *A. astronyxis*, (C) food cup u *A. castellanii* v procesu pozření nervové buňky, (D) přiblížení formace food cup z obrázku C (Clarke, Niederkorn 2006)

Podle tvaru a velikosti cyst se acanthamoeby dříve dělily do tří morfologických skupin (Page 1967). Dnes se pro určení taxonomie těchto améb používá kombinace dělení podle morfologie cyst (skupiny I-III) a dělení podle genetické sekvence jaderné 18S rDNA (genotypy T1-T12) (Stothard et al., 1998). *A. castellanii* patří do skupiny II genotypu T4. Z genotypů je právě skupina T4 nejčastěji zodpovědná za amébové keratitidy, což jak bylo ukázáno, není způsobeno početností tohoto genotypu v ekosystémech, ale jeho virulencí (Maghsood et al., 2005).



Obrázek 3: Cysty acanthamoeby (A) morfologická skupina I, (B) morfologická skupina II, (C) morfologická skupina III (Lorenzo-Morales et al., 2015)

3.1 Enzymatická výbava *A. castellanii* spojená s její patogenezí

Acanthamoeby si vyvinuly pro svůj parazitický způsob života řadu proteáz. Tyto enzymy narušují vazby mezi peptidy proteinů a díky tomu je trofozoit jednak schopen invaze do hostitelských tkání a dále pomocí proteáz tyto tkáně narušuje. Štěpení hostitelských proteinů amébou je umožněno nejméně devíti proteázami (zejména serinovými) o hmotnosti 34-144 kDa. Největší aktivita těchto enzymů byla pozorována při pH 7 a některé měly zvýšenou aktivitu při 35 °C (Serrano-Luna et al., 2006).

Jednou z těchto serinových proteáz je elastáza, která byla zkoumána u *A. clubertsoni*. Tento enzym se pravděpodobně účastní rozrušení hostitelských obranných bariér, jako jsou například sliznice (Ferrante et al., 1988).

Další ze serinových proteáz je plasminogenový aktivátor. Tento enzym je schopen přeměnit plasminogen na plasmin. Díky takto aktivovanému hostitelskému plasminogenu je améba schopna narušit extracelulární matrix v hostitelské tkáni (Mitra et al., 1995).

He et al. (1990) zkoumal kolagenolytickou aktivitu na třech kolagenových plátech. První kolagenový plát byl inkubován s čistou kolagenázou, druhý s kondiciovaným médiem s obsahem parazitů, třetí s kondiciovaným médiem bez parazitů. Kondiciované médium bylo připraveno inkubací média s amébami po dobu 4 týdnů. Množství parazitů bylo $3x10^6$ na 1 mililitr média. Po osmi hodinách došlo k úplnému rozkladu všech tří kolagenních plátů. Přidáním inhibitoru kolagenázy (sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové) bylo zcela zamezeno rozkladu kolagenního plátu, což dokazuje, že hlavním proteolytickým enzymem améb je kolagenáza. To, že kolagenáza je zodpovědná za patogenitu parazita, bylo dokázáno injikováním stromatu potkanů kondiciovaným médiem bez parazita, nebo čistou kolagenázou o koncentraci 25 jednotek/ml. V obou případech bylo docíleno stejných klinických příznaků, kterými byl otok, infiltrace neutrofilů do tkáně a narušení stromální lamely. Tyto příznaky jsou shodné s příznaky amébové keratitidy. Pokud bylo kondiciované médium před vpravením do stromatu zbaveno kolagenázy, došlo u pokusných subjektů pouze k mírnému otoku.

3.2 cytopatický efekt *A. castellanii*

A. castellanii je schopna indukovat apoptózu hostitelských buněk. Tento efekt byl zkoumán na nádorových buňkách. Při inkubaci hostitelských buněk po dobu 16 hodin za teploty 35 °C s amébovým lyzátem prošlo apoptózou 70 % cílových buněk, při inkubaci nádorových buněk pouze s čistým médiem prošlo apoptózou pouze 7 %. Nádorové buňky byly poté inkubovány s lyzátem parazita, nebo s živými trofozioty. U těchto buněk byly pozorovány morfologické změny jako kondenzace jádra, zmenšení buněčného objemu, výstupky na cytoplazmatické membráně a také byla v cytoplazmě zřetelná apoptotická tělíska. Tyto změny odpovídají změnám u apoptotických buněk. V této studii bylo zjištěno, že míra apoptózy cílových buněk je dependentní na koncentraci živých parazitů, nebo amébového lyzátu a pro vyvolání apoptózy není potřeba přímý kontakt trofozoita s buňkou (Alizadeh et al., 1994).

Indukovaná apoptóza hostitelských buněk byla zkoumána podrobněji. Bylo zjištěno, že parazit vypouští do svého okolí rozpustné termostabilní molekuly o molekulární hmotnosti 97-16,4 kDa. Tyto látky způsobují nárůst koncentrace volného vápníku v cytoplazmě hostitelských buněk, to má za následek deformace cytoskeletu, morfologické změny, snížení buněčné vitality a cytolýzu (Mattana et al., 1997).

Mattana et al. (2001) blíže zkoumal vliv nízkomolekulárních látek zvyšujících koncentraci vápníkových iontů v cytosolu hostitelských buněk z kondiciovaného média *A. castellanii*.

Kondiciované médium bylo připraveno inkubací améb v médiu po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C, následně byly améby od média odděleny centrifugací, kondiciované médium bylo poté teplotně ošetřeno. Analýzou bylo zjištěno, že kondiciované médium obsahovalo značné množství adenosindifosfátu (ADP) Při inkubaci hostitelských buněk s kondiciovaným médiem, nebo s čistým ADP došlo v obou případech k výraznému nárůstu vápníku v cytosolu hostitelských buněk. Suramin inhiboval efekt ADP a kondiciovaného média, množství vápníku v cytosolu cílových buněk se po přidání ADP, a ani po přidání kondiciovaného média nezměnil. Suramin kompetuje s ADP o vazebné místo na membránovém receptoru P_{2y2}. Z této studie plyne, že améba indukuje apoptózu hostitelských buněk vylučováním ADP do svého okolí, ADP se váže na P_{2y2} (membránový receptor cílových buněk), což má za následek navýšení množství cytosolického vápníku u hostitelských buněk a cytolýzu.

Fagocytóza acanthamoeby byla zkoumána pomocí fluorescenčně značených *Escherichia coli* a inhibitorů. Bylo zjištěno, že fagocytóza je proces závislý na aktinu. Dále se procesu fagocytózy účastní Rho GTPásy a kinázový enzym P13K a signalizace se účastní tyrozin kináza (Alsam et al., 2005). U *A. castellanii* bylo pozorováno, že fagocytóza je doprovázena zvýšením koncentrace AMP v médiu a navýšením spotřeby kyslíku amébou (Edwards & Doulah, 1982).Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

4 Acanthamoebová keratitida

Acanthamoebová keratitida je zánětlivé onemocnění rohovky způsobené *A. castellanii*. Mezi příznaky patří podrážděná víčka, překrvené spojivky nebo zakalené rohovkové stroma (Van Klink et al., 1993).

Průběh infekce byl popsán na potkanech. Ti byli injekcí do stromatu nakaženi trofozoity ve fázi exponenciálního růstu. Pro vyvolání onemocnění u pokusných zvířat se často používá metoda, kdy jsou zvířatům aplikovány kontaktní čočky kontaminované určitým množstvím trofozoitů. V tomto případě tato metoda použít nelze, protože pro vznik onemocnění je klíčové přichycení parazita na rohovku. *A. castellanii* je v tomto procesu vysoce druhově specifická, není schopna se na rohovky potkanů vázat a ke vzniku amébové keratitidy by nedošlo (Niederkorn et al., 1992). Třetí den od infekce byly zaznamenány defekty na rohovce a její otok u 62,5 % jedinců. Po 35 dnech se u 45,8 % vytvořila neovaskularizace (novotvorba cév). Při histologickém zkoumání očí bylo zjištěno, že epitel byl stále přítomen, ale jeho buňky byly nejspíše vlivem otoku od sebe oddáleny. Endotel byl v centru infiltrován makrofágy, neutrofily a

mononukleárními buňkami. U některých jedinců se vytvořil hypopyon (nahromadění hnisu v přední komoře oka). Ve stromatu se objevily neutrofily, makrofágy a eozinofily. Časté byly i abscesy v posteriorní oblasti stromatu (Polat et al., 2007).

4.1 Rizikové faktory pro vznik onemocnění

I přes častý výskyt *A. castellanii* v prostředí, je prevalence onemocnění v populaci velmi malá, protože jsou pro vznik keratitidy rozhodující další faktory. Nejčastěji se tento zánět objevuje u pacientů, kteří používají kontaktní čočky a zároveň nedodržují jejich správnou dezinfekci (Carnt et al., 2018). Mezi další rizikové faktory patří i historie očního traumatu nebo kontakt s kontaminovanou vodou (Stehr-Green et al. 1989; Carnt et al. 2018).

4.2 Přichycení acanthamoeby na rohovku

Tento proces je rozhodující pro vznik onemocnění. Při pokusných infekcích se zjistilo, že *Acanthamoeba castellanii* je v tomto procesu vysoce hostitelsky specifická (Niederkorn et al., 1992).

Améba se pojí konci svých pseudopodií k rohovkovému epitelu většinou poblíž spojení dvou rohovkových buněk. Parazité jsou také schopni pojit se k sobě navzájem, čímž je docíleno toho, že zóna spojení améb s rohovkou je větší a silnější. Spojení mezi trofozoity a rohovkovými buňkami připomínají desmozomy, což jsou typy mezibuněčných spojů, kterých se účastní cytoplazmatická intermediální filamenta (Ubelaker et al. 1991; Holthöfer et al. 2007).

4.2.1 Vazba *A. castellanii* na manózu glykoproteinů

Jeden z procesů, pomocí kterého se parazit váže na rohovku, je závislý na interakci mezi glykoproteiny, které obsahují manózu a jsou vylučované buňkami rohovkového epitelu a amébovým manózu vázajícím proteinem (MBP) (Yang et al., 1997). MBP má hmotnost 400 kDa, součástí tohoto proteinu je několik podjednotek o molekulární hmotnosti 130 kDa. Tyto podjednotky vážou manózu i po jejich extrakci z MBP (Garate *et al.* 2004). Poškozený rohovkový epitel exprimuje 5,2krát více manózových glykoproteinů než rohovka bez traumatu. Proto je poškození epitelu jedním z hlavních faktorů pro vývoj onemocnění (Jaison et al., 1998).

4.2.2 Vazba acanthamoeby na proteiny extracelulární matrix

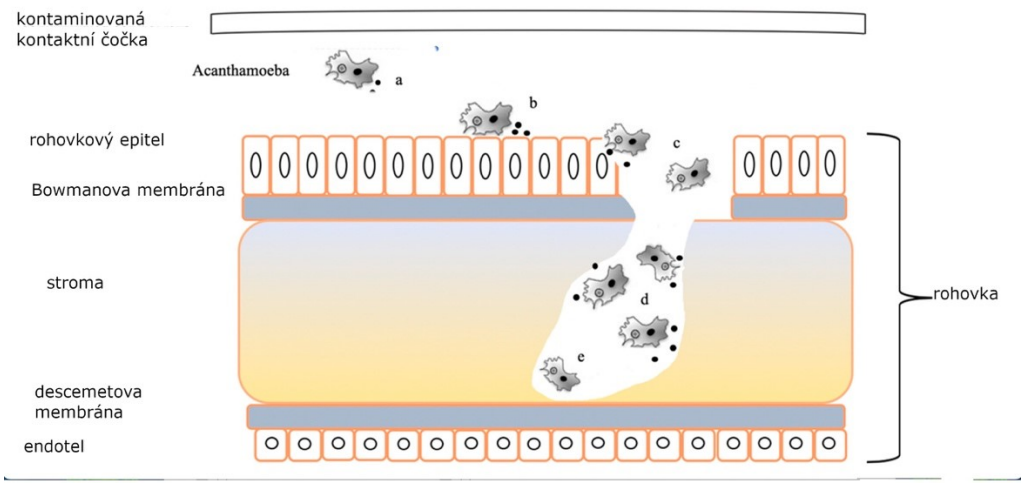
Trofozoit je schopen se vázat na kolagen IV, laminin a fibronektin. Tyto proteiny jsou součástí extracelulární matrix a bazální laminy. Vazbě lze zabránit alfa methyl-mannopyranosidem. Améba váže alfa methyl-mannopyranosid na své povrchové vazebné molekuly a tím je zamezeno navázaní kolagenu, lamininu, anebo fibronektinu. Interakce je tedy nejspíše závislá na glykosilacích postranních řetězců těchto sloučenin. Tato vlastnost byla pozorována u *A. polyphaga*, ale dá se předpokládat, že se objevuje i u jiných druhů améb (Gordon et al., 1993).

4.2.3 Vazba acanthamoeby na glykolipidy

Trofozoit je schopný se vázat na některé komponenty glykolipidů, ty jsou obsaženy v savčích buněčných membránách a jsou složkami rohovkového epitelu (Panjwani et al., 1992).

4.3 Vniknutí acanthamoeby do oka

Moore et al. (1991) sledoval proces pronikání améb do lidské oční rohovky. Rohovky byly inkubovány s trofozoity po dobu 12 hodin při teplotě 35 °C a poté byly zkoumány pod rastrovacím elektronovým a transmisním elektronovým mikroskopem. Největší poškození se tvořilo na okrajích rohovky; blízko skléry byly zřetelné důlky, na jejichž laterálních okrajích se objevovali trofozoiti. Po penetraci se parazité pohybovali v tkáni laterálně, tvořili tunely, následkem čehož vznikaly povrchové nerovnosti na rohovce. Parazitičtí trofozoiti se lišili od těch chovaných v kultuře tím, že v jejich cytoplazmě blízko povrchu plazmatické membrány se nacházely vakuoly s elektron denzními granuly. Při průchodu patogenu tkání se denzní granula uvolňovala intercelulárně do okolních buněk. Na bazální lamině epitelu se mezi buňkami hostitele a parazitem tvořila těsná spojení a docházelo k fagocytóze.



Obrázek 4: acanthamoebová keratitida, (a) uvolnění améby z kontaminované čočky, (b) navázání améby na rohovkový epitel pomocí MBP, (c) narušení rohovkového epitelu a Bowmanovy membrány pomocí proteáz, (d) invaze améby do stroma, (e) pohyb trofozoitů ve stroma laterálně podél rohovkových nervů, upraveno podle Hasni et al. (2020)

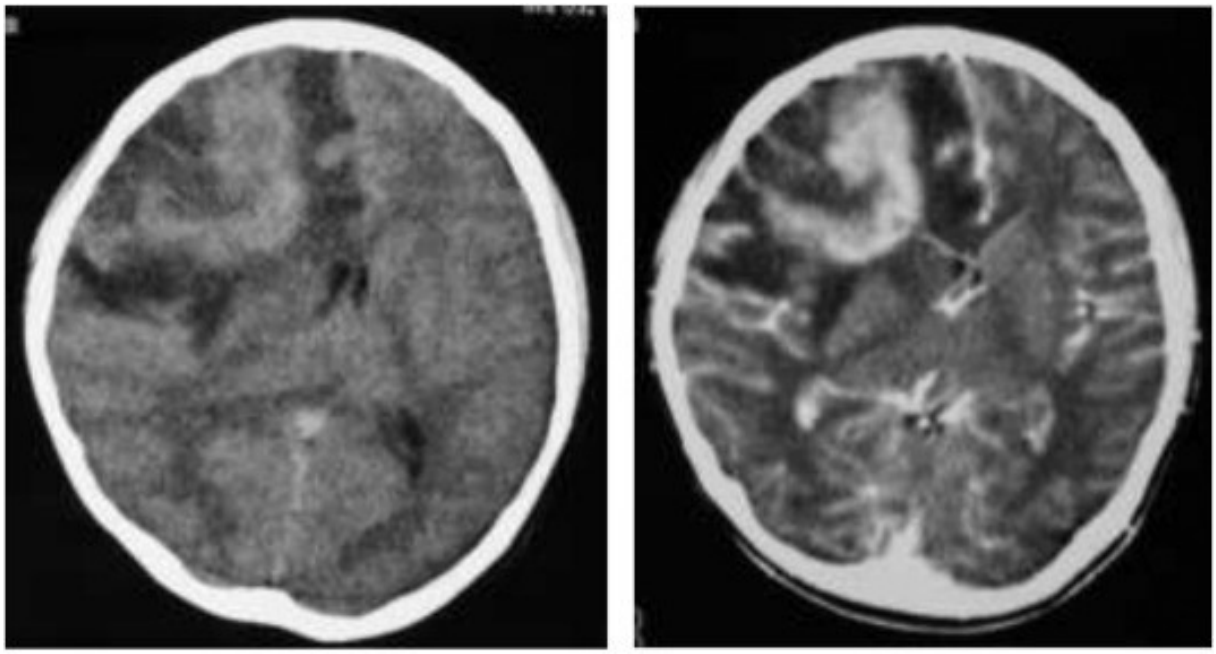
5 Granulomatózní acanthamoebová encefalitida

Granulomatózní acanthamoebová encefalitida je onemocnění centrální nervové soustavy způsobované druhy acanthamoeb. Poprvé bylo uvažováno o acanthamoebách jako o možnému patogenu poté, co byly tyto organismy pozorovány v buněčných kulturách ledvinné tkáně (Jahnes et al. 1957).

Culbertson et al. (1959) testoval patogenezi těchto améb na pokusných myších. Při experimentální nákaze myší acanthamoebou pomocí intramuskulární, intraspinální a intracerebrální injekce média s parazity, byly pozorovány změny v tkáni centrální nervové soustavy, jako byla choriomeningitida nebo destruktivní léze v místě inokulace média s amébami. Parazité z místa nákazy migrovali a byli pozorováni v exsudátu i v normálně vypadající tkáni.

Toto onemocnění nejčastěji postihuje pacienty s narušenou imunitou. Encefalitidy způsobené touto amébou se objevily u lidí po transplantaci (Zamora et al., 2014), s diagnózou lupusu (Alkhunaizi et al., 2013) i u lidí s HIV (Damhorst et al., 2022). Byly ale i zaznamenány případy, kdy toto onemocnění postihlo pacienty se suficientní imunitou (Lackner et al., 2010). Mezi klinické příznaky patří bolest hlavy, teplota, záchvaty, afázie, halucinace či koma (Alkhunaizi et al. 2013; Damhorst et al. 2022; Zamora et al., 2014).

Martinez et al. (1980) popisoval změny v tkáni centrální nervové soustavy a průběh onemocnění u šesti pacientů s prokázanou granulomatózní acanthamoebovou encefalitidou. Onemocnění předcházely u dvou pacientů chronické dermatologické obtíže. Délka nemoci se u lidí výrazně lišila (18-120 dní). V blízkosti léze se objevovala leptomeningitida (hnisavý zánět mozkových plen). Při histologickém zkoumání mozku a mozkového kmenu bylo zjištěno, že mezi subjekty jsou rozdíly v poloze a objemu lézí. Samotné léze se v jiných aspektech shodovaly. Pozorované parenchymatické léze byly nekrotické a granulomatózní. Pro granulomatózní tkáň jsou typické shluky makrofágů a T lymfocytů, tyto buňky tvoří v tkáni granuly. V parenchymu se též objevovaly mikrogliální noduly, což jsou léze, které obsahují buňky vrozené imunity, mikroglie a T lymfocyty. U všech pacientů se objevovali záněty stěn žil a arterií s krevními sraženinami. Trofozoiti byli nalezeni v trombotických cévách, v okolí cév se objevovaly i cysty. Ve tkáni byly nalezeny klastry améb bez zánětlivé odpovědi.



Obrázek 5: CT sken hlavy, v pravé části frontálního laloku (v levé horní části obrázku) patrná rozsáhlá léze. (A) V pravém frontálním laloku se objevuje hypertenzní hmota (B) v centru léze patrná nekróza, v okolí nekrózy se nachází otok (Fu et al., 2020).

5.1 Vniknutí améb do organismu hostitele

Jedna z možných cest, kterou *A. castellanii* využívá pro vstup do centrální nervové soustavy hostitele, je infekce přes nazální mukózu. Culbertson et al. (1959) popsal tento proces na myších. Po intranazální inokulaci bylo pozorováno narušení nosní mukózy a olfaktorického bulbu. Takto se může parazit dostat přímo do centrální nervové soustavy. Améba je také schopna invadovat oběhový systém hostitele přes cévy nosní sliznice. O přenosu parazita krví nasvědčují nálezy cyst a trofozoitů v renálních glomerulech, slinivce a srdci u myší po intranazální inokulaci a také to, že infekce centrální nervové soustavy vznikla i po aplikaci *A. castellanii* přímo do krevního řečiště. K infekci centrální nervové soustavy může dojít i vniknutím parazita do plic. Trofozoiti tvoří v plicní tkáni léze a poté vnikají do krevního řečiště, odkud se dostávají do centrální nervové soustavy.

Místem vstupu trofozoitů do organismu může být i kůže. U 24leté ženy se objevila rok před projevem encefalitidy kožní léze. Pitva u ženy odhalila granulomatózní léze i v nadledvinách, v prsní tkáni a v plicích. Jelikož kožní léze byla prvním příznakem infekce amébou, je možné, že se trofozoiti dostali do krevního oběhu přes kožní lézi a poté došlo k infekci dalších orgánů, včetně centrální nervové soustavy (Gullett et al., 1979).

Průběh vzniku kožních lézí, migrace trofozoitů do kožního vaziva, svalu a posléze vnik améb do centrální nervové soustavy byl pozorován na myších. Pokožka myší byla poškozena UVB zářením. Do místa poškození byli aplikováni trofozoiti. Po 24, 48 a 72 hodinách byly poškozené tkáně pozorovány pomocí imunohistochemických metod. Bylo zjištěno, že *A. castellanii* byla schopna prostoupit pokožkou, škárou a podkožním vazivem. Ve škáře se trofozoiti objevovali okolo cév, což poukazuje na to, že paraziti cestují tkání do míst s vyšším obsahem kyslíku a dále může být infekce přenášena po těle krví. U jedné z pokusných myší byla pozorována migrace améb do jater, slinivky a centrální nervové soustavy (Hernández et al. 2020).

5.2 Průnik acanthamoeby epitely pomocí modulace poměrů claudinů

Claudin (Cldn) je jedním z hlavních složek pevných spojení. Kombinace a modulace poměrů claudinů v těchto spojeních ovlivňuje jejich propustnost (Furuse et al., 2001).

Flores-Maldonado et al. (2017) zkoumal průnik acanthamoeby z genotypu T4 skrz epitel psích ledvinných buněk (MDCK). Bylo dokázáno, že améby dokážou zvýšit propustnost těsných

buněčných spojení mezi epiteliálními buňkami a tímto epitelem procházet bez porušení buněk. Elektronovou mikroskopií a imunofluorescencí bylo zjištěno, že ke zvýšení propustnosti dochází již po jedné hodině inkubace parazita s ledvinnými buňkami, zvýšená propustnost přetrvává i po 24 hodinách. Buňky epitelu zůstávají neporušené a struktura aktinového skeletu je shodná se strukturou u kontroly. V tomto mechanismu dochází ke snížení množství Cldn2 v pevných spojích i v obsahu epiteliálních buněk. Zároveň bylo pozorováno zvýšení Cldn4 v buněčných spojích. Z tohoto experimentu vyplývá, že trofozoiti jsou schopni kontaktně závislým mechanismem pronikat skrz hostitelské epitely změnou propustnosti pevných buněčných spojů.

5.3 Interakce acanthamoeby s hematoencefalickou bariérou

Aby mohl parazit vniknout do centrální nervové soustavy, musí překonat překážku ve formě hematoencefalické bariéry. Alsam et al. (2003) zkoumal tento proces na *in vitro* připravené hematoencefalické bariéře. Bylo zjištěno, že cytopatickému efektu buněk této bariéry předchází přichycení trofozoita na buňky pomocí MBP. Navázání améb na manózu obsahující glykoproteiny indukuje apoptózu hostitelských buněk.

Tento fenomén byl poprvé potvrzen ve studii, kde byl cytopatický efekt u parazita porovnáván s pozitivní kontrolou etoposidem. Etoposid je látka schopná indukovat apoptózu u buněk, jeho účinnost byla v této studii stanovena jako 100 %. Apoptotický efekt acanthamoeby byl po 15 minutách 70%. Po přidání inhibitoru LY29400 (selektivní inhibitor fosfatidylinositol 3 kinázy) k hostitelským buňkám s parazity nebyl pozorován cytopatický efekt. Z těchto zjištění vyplívá, že apoptóza vyvolaná acanthamoebou je závislá na hostitelské fosfatidylinositol 3 kinázové signální dráze (Sissons et al., 2005). Fosfatidylinositol 3 kináza je enzym, který se účastní mnoha buněčných procesů, mezi kterými je i apoptóza.

Hematoencefalická bariéra může být parazitem narušena pomocí cytopatického efektu. Améba uvolňuje do svého okolí ADP a tím indukuje navýšení množství vápníku a cytolýzu hostitelských buněk (Mattana et al., 2001).

Acanthamoeba narušuje hematoencefalickou bariéru i svými serinovými proteázami. Alsam et al. (2005) zkoumal tento fenomén pomocí *in vitro* modelu hematoencefalické bariéry. Při inkubaci améb s *in vitro* modelem se propustnost hematoencefalické bariéry zvýšila o 45 %. Pokud byla bariéra inkubovaná se supernatantem, který byl získán inkubací améb v médiu po

dobu 24 hodin, propustnost *in vitro* modelu se zvýšila o 80 %. Tato část pokusu dokazuje, že změny v propustnosti nejsou závislé na kontaktu trofozoitů s tkání. V druhé části pokusu byl ke supernatantu, před inkubací s hematoencefalickou bariérou, přidán inhibitor serinových proteáz. Při inkubaci s takto ošetřeným supernatantem nedošlo ke změnám v propustnosti, což dokazuje, že za změny permeability hematoencefalické jsou zodpovědné vylučované serinové proteázy trofozoitů.

6 Imunitní odpověď

6.1 Nespecifická imunita

Hlavní buňky vrozené imunity jsou neutrofily a makrofágy. Jako první odpovídají na potenciální hrozby z vnějšího prostředí. Tato odpověď je umožněna jejich reakcí na PAMPs.

Hurt et al. (2003) zkoumal schopnost myších neutrofilů a makrofágů eliminovat cysty *A. castellanii.* Chemotaxe k cystám nebyla pozorována ani u jednoho z typů buněk vrozené imunity, ale chemotaxe k lyzátu z cyst byla přítomna. Na chemotaxi neměla vliv aktivace buněk pomocí lipopolysacharidů a IFNγ. Přesto makrofágy do 48 hodin eliminovaly 50 % cyst a neutrofily usmrtily za 24 hodin dokonce 100 % cyst. V druhé části pokusu bylo zkoumáno, jakým způsobem neutrofily a makrofágy zneškodňují cysty. Pro účely tohoto experimentu bylo použito kondiciované médium, což je médium, ve kterém byly inkubovány imunitní buňky a améby po dobu 24 hodin. Při inkubaci cyst s makrofágovým kondiciovaným médiem po dobu 24 hodin se počet cyst nezměnil. Makrofágy tedy nejspíše zneškodňují cysty pomocí fagocytózy. Neutrofilové kondiciované médium usmrtilo 27 % cyst. Eliminace parazita neutrofily byla umožněna nejspíše pomocí antimikrobiálních molekul, fagocytóza neutrofily není možná kvůli velkému objemu cyst.

6.1.1 Interakce trofozoitů s makrofágy

A. castellanii je schopna zneškodnit makrofágy, a to buď fagocytózou, nebo formuje prstovité výběžky, které po kontaktu naruší jejich plazmatickou membránu a poté makrofágy lyzuje. Tato schopnost je výrazně omezena, pokud jsou makrofágy předem aktivovány pomocí bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) a IFN γ. Při zkoumání efektu makrofágů na parazity bylo zjištěno, že makrofágy jsou schopny fagocytovat trofozoity. Makrofágy aktivované pouze LPS a IFN γ nebyly tak účinné při poškozování buněk parazita nejspíše proto, že neprodukovaly dostatečné

množství cytolytických faktorů. Pokud byly makrofágy aktivovány *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin (takto aktivované makrofágy produkují velké množství cytolytických faktorů, jako oxid dusnatý) zvýšil se počet zabitých trofozoitů makrofágy. Cytokininy produkované makrofágy (TNF, IL 1α a IL 1β) *A. castellanii* nezabíjí (Marciano-Cabral et al., 1998).

6.1.2 Neutrofily

Stewart et al. (1994) zkoumal amébocidní efekt neutrofilů a závislost tohoto jevu na protilátkách proti *A. castellanii*. Neutrofily z imunizovaných a neimunizovaných myší lyzovaly pouze malé množství améb. Cytolytický efekt neutrofilů výrazně narostl po přidání séra z imunizovaných myší. Z této studie vyplývá, že pro lýzu améb neutrofily je esenciální přítomnost protilátek proti *A. castellanii*.

6.2 Role komplementu

Toney a Marciano-Cabral (1998) zkoumali schopnost acanthamoeby částečně odolávat komplementové lýze. Pokus byl prováděn s lidských sérem od čtyř dárců, množství lyzovaných améb se napříč séry lišilo. Byla také zkoumána interakce mezi trofozoity a klasickou, nebo alternativní dráhou komplementu. Inaktivací alternativní dráhy komplementu sérum ztratilo amébocidní aktivitu. To dokazuje, že za lýzu améb komplementem zodpovídá alternativní dráha komplementu. *A. castellanii* byla více náchylná k lýze než *A. culbertsoni* a *A. polyphaga*. Při inkubaci améb se sérem tvořili živí parazité kompaktní hmotu na dně inkubačních nádob (pelet). Pelet se tvořil pouze pokud byla aktivní jak alternativní, tak klasická cesta komplementu. Kolem améb, které byly rezistentní vůči komplementu a tvořily pelet, se objevovala elektron denzní oblast. Dále byly zkoumány faktory podílející se na rezistenci améb proti lýze komplementem. Role proteinové syntézy při rezistenci proti lýze byla dokázána pomocí cytochalasinu D, což je inhibitor polymerace aktinu. Pokud byli parazité před inkubací se sérem ošetřeni tímto toxinem, lýza komplementem se výrazně zvýšila a bylo zamezeno vzniku peletu. To prokazuje, že *A. castellanii* dokáže částečně uniknout lýze komplementem, a to nejspíš vylučováním protektivní matrix a tvořením peletu.

6.3 Imunitní odpověď u acanthamoebové keratitidy

Více než 85 % populace má v séru protilátky proti acanthamoebám. I přes tento fakt se u pacientů nevyvíjí protektivní imunita proti onemocnění a často hrozí i reinfekce (Brindley et al., 2009).

6.3.1 Vrozená imunitní odpověď při Acanthamoebové karatitidě

Imunizace křečíků čínských před infekcí pomocí proteinu izolovaného z acanthamoeb neměla vliv na průběh infekce. Zvířata po prodělaném onemocnění nebyla před reinfekcí chráněna a průběh onemocnění se nelišil od první infekce. Přecitlivělost oddáleného typu (reakce organismu způsobená makrofágy, Th lymfocyty a monocyty) se u pokusných zvířat po prodělání infekce neobjevovala, ale u zvířat, která byla injikována intramuskulárně proteinem z parazita, se objevila výrazná reakce. Acanthamoebová keratitida není schopna indukovat anti-acanthamoebové IgG protilátky. U intramuskulárně injikovaných jedinců proteinem z améby protilátka vznikla (Van Klink et al., 1997).

Tvrzení, že při keratitidě způsobené *A. castellanii* nevznikají IgG proti *A. castellanii* vyvrací studie, která porovnávala množství IgG u zdravých jedinců a u lidí, kteří trpěli amébovou keratitidou. Bylo zjištěno, že u nemocných jedinců bylo množství IgG výrazně vyšší než u skupiny druhé (Alizadeh et al., 2001).

I přesto, že rohovka za normálního stavu obsahuje Langerhansovy buňky, měla jejich indukovaná migrace do centrální rohovky pozitivní vliv na průběh infekce (Curson et al., 1980).

Van Klink et al. (1993) testoval tento fenomén na křečících čínských. Přesunu Langerhansových buněk na místo budoucí infekce bylo docíleno pomocí latexových kuliček, které byly aplikovány do mělkých zářezů na rohovkovém epitelu deset dní před aplikací kontaktních čoček s trofozoity. Druhou metodou byla aplikace IL1 do nitra rohovky 2 až 7 dní před infekcí. Bylo zjištěno, že u zvířat ošetřených latexovými kuličkami došlo k nákaze u 14 % jedinců, zatímco v kontrolní skupině se nakazilo 60 % jedinců. Při použití injekce IL1 sedm dní před infekcí byla prevalence onemocnění 28 % u takto ošetřených křečíků a 70 % u křečíků neošetřených. Amébová keratitida není schopna indukovat buněčně mediovanou ani humorální imunitu. Část experimentu zkoumající vliv migrace Langerhansových buněk do centrální rohovky naznačuje, že tento fenomén může být způsoben malým množstvím antigen prezentujících buněk v centrální rohovce.

Hurt et al. (2001) zkoumal vliv neutrofilů na průběh amébové keratitidy na křečících. Při tomto pokusu bylo odhaleno, že makrofágový zánětlivý protein (MIP-2) je výrazným chemoatraktantem pro neutrofily a navýšením jeho koncentrace je docíleno infiltrování neutrofilů do rohovky. Vliv absence neutrofilů na průběh keratitidy byl zkoumán aplikací protilátky proti MIP-2 do rohovky. Protilátka neutralizovala protein MIP-2, což u takto ošetřených zvířat vedlo ke snížení infiltrace neutrofilů do tkáně. U křečíků ošetřených touto protilátkou byly příznaky onemocnění závažnější a nemoc trvala déle. U křečíků ošetřených MIP-2 byly sice průvodní příznaky horší než u kontrolních skupin, ale došlo k brzkému uzdravení jedinců. Tyto výsledky ukazují na důležitost neutrofilů při obraně organismu proti acanthamoebové keratitidě. Vliv IgG na průběh amébové keratitidy byl zkoumán aplikací IgG na povrch rohovkového epitelu 72 hodin po infekci trofozoity. IgG nemělo vliv na přichycení *A. castellanii* na rohovkový epitel ani na průběh onemocnění.

Důležitost makrofágů při obraně proti amébové keratitidě byla prokázána během pokusu s čínskými křečíky, v němž byly makrofágy zneškodněny injekcí lipozomů s obsahem dichlorometylen difosfonátu do rohovek. Onemocnění u takto ošetřených křečíků se projevilo dříve a bylo chronické, což ukazuje na to, že makrofágy jsou v první linii obrany proti infekci (van Klink et al., 1996).

6.3.2 Specifická imunitní odpověď při acanthamoebové keratitidě

Role IgG je při obraně proti keratitidě jen velmi malá. Hlavní roli hrají IgA.

Při pokusu na čínských křečících bylo zjištěno, že při orální imunizaci se tvoří acanthamoeba-specifické IgA. IgA byly přítomny v slzném filmu oka a potlačovaly přichycení parazita na rohovku, což se projevilo na počtech nakažených křečíků, kterých bylo pouze 21 % oproti kontrolní skupině, kde se keratitida projevila u více jak 72 % jedinců (Leher *et al*., 1998).

Množství IgA bylo porovnáváno u zdravých jedinců a u lidí s amébovou keratitidou. U pacientů s amébovou keratitidou bylo množství IgA v slzách výrazně nižší než u kontrolní skupiny. Nízké množství IgA v slzách před infekcí by mohlo být jedním z faktorů pro vznik amébové keratitidy (Alizadeh et al., 2001).

6.4 Imunitní odpověď při acanthamoebové granulomatózní encefalitidě

6.4.1 Toll-like receptory (TLR2 a TLR4)

Při pokusech na myších bylo zjištěno, že zvířata trpící granulomatózní amébovou encefalitidou mají zvýšenou expresy TLR2 a TLR4 oproti skupině kontrolní. Zvýšená exprese byla pozorována na neuronech, gliových buňkách, buňkách endotelu a v neokortexu (Wojtkowiak-Giera et al., 2016). Tyto receptory se nacházejí na povrchu buněk a rozeznávají PAMPs. Po stimulaci receptorů dochází ke kaskádové aktivaci specifické imunity.

6.4.2 Mikroglie

Mikroglie jsou buňky nacházející se v centrální nervové soustavě. Jsou schopny fagocytózy a produkování cytokininů.

Při inkubaci myších mikroglií s *A. castellanii* byla pozorována exprese cytokininů IL 1α, IL 1β, IL 6 a TNF6. Mikroglie v kultuře byly schopny fagocytovat acanthamoeby (Marciano-Cabral et al., 2004). Aktivované mikroglie lipopolysacharidy a INFγ jsou schopné inhibovat růst *A. castellanii*, tato schopnost je nejspíše závislá na endogenních cytokininech, které jsou mikrogliemi produkovány. Protilátky proti IL b, IL 6 nebo TNF inhibovaly cytostatickou aktivitu (Benedetto et al., 2003).

7 Závěr

Acanthamoeba castellanii je prvok často se vyskytující v přírodě, který může způsobovat lidská onemocnění s trvalými následky. Acanthamoeba je dobře uzpůsobena pro svůj parazitický způsob života, například schopností tvořit odolné cysty. Cysty mohou být sice rozpoznávány a likvidovány neutrofily a makrofágy, ale tyto buňky vrozené imunity nejsou k cystám améb chemoatrahovány (Hurt et al., 2003). Tento fakt může být příčinou dlouhotrvajících infekcí, které jsou často pro hostitelský organismus obtížně překonatelné. Na patogenezi těchto améb se také podílí řada proteáz, například plasminogenový aktivátor, díky němuž je parazit schopen aktivovat hostitelský plasminogen a rozrušovat hostitelskou extracelulární matrix (Mitra et al., 1995). Dalšími proteázami jsou elastázy a kolagenázy. Elastáza nejspíše primárně slouží k překonání hostitelských obranných bariér, jako jsou sliznice. Kolagenáza je hlavním enzymem, který je zodpovědný za rozrušování rohovkové tkáně při acanthamoebové keratitidě (Ferrante et al., 1988; He et al., 1990).

Rozhodující pro vznik acanthamoebové keratitidy je vazba *A. castellanii* na rohovkový epitel. To je umožněno vazbou mezi amébovým manózu vázajícím proteinem a hostitelskými glykoproteiny obsahujícími manózu (Yang et al., 1997). Poškozený rohovkový epitel má na svém povrchu značně více manózy než epitel nepoškozený. Proto je poranění rohovky jeden z hlavních rizikových faktorů pro vznik acanthamoebové keratitidy (Jaison et al., 1998). Tento parazit je také schopen vázat se na glykolipidy a proteiny extracelulární matrix (Gordon et al., 1993; Panjwani et al., 1992).

Při granulomatózní acanthamoebové encefalitidě se parazit dostává z nosní mukózy, plicní tkáně nebo kožní léze do centrální nervové soustavy krví (Culbertson et al., 1959; Gullett et al., 1979). Před vstupem do centrální nervové soustavy patogen překonává hematoencefalickou bariéru pomocí svých serinových proteáz, které zvyšují propustnost bariéry (Alsam et al. 2005). Mezi další způsoby narušení hematoencefalické bariéry patří indukce apoptózy buněk bariéry amébou a to dvěma mechanizmy. V prvním případě se patogen nejprve naváže na manózové glykoproteiny v hematoencefalické bariéře a následně indukuje apoptózu buněk této bariéry pomocí fosfatidilinositol 3 kinázové dráhy (Alsam et al. 2005; Sissons et al. 2005). U druhé varianty améba do okolí hostitelských buněk vypouští látky zvyšující koncentraci vápníkových iontů v extracelulárním prostoru (Mattana et al., 1997).

Při obraně proti infekcím způsobovaným *A. castellanii* hrají hlavní roli neutrofily a makrofágy. Ty jsou schopny zneškodňovat jak trofozoity, tak i cysty améb (Hurt et al. 2003; Marciano-Cabral et al., 1998; Stewart et al. 1994). Pro lýzu trofozoitů neutrofily je důležitá přítomnost protilátek proti acanthamoebám v séru. Komplement není v boji proti zmíněným infekcím efektivní. *A. castellanii* je schopna částečně uniknout lýze komplementem, a to tak, že kolem svých buněk tvoří protektivní matrix (Toney & Marciano-Cabral, 1998). Ig A obsažené v slzném filmu oka zabraňují přichycení améby na rohovkový epitel a tím předcházejí vzniku acanthamoebové keratitidy (Leher et al., 1998). Nízké množství IgA v slzném filmu jedinců může být jedním z dalších rizikových faktorů pro vznik acanthamoebové karatitidy (Alizadeh et al., 2001).

9 Seznam použité literatury

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., … Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *52*(5), 399–451. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x

Alizadeh, H., Apte, S., El-Agha, M.-S. H., Li, L., Hurt, M., Howard, K., Cavanagh, H. D., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. (2001). Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, *20*(6), 622–627. https://journals.lww.com/corneajrnl/fulltext/2001/08000/tear_iga_and_serum_igg_antibodies_against.13.aspx

Alizadeh, H., Pidherney, M. S., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. (1994). Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. *Infection and Immunity*, *62*(4), 1298–1303. https://doi.org/10.1128/IAI.62.4.1298-1303.1994

Alkhunaizi, A. M., Dawamneh, M. F., Banda, R. W., Daabil, R. A., Al-Tawfiq, J. A., Akkad, S. A., & Boukhamseen, A. H. (2013). *Acanthamoeba* encephalitis in a patient with systemic lupus treated with rituximab. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *75*(2), 192–194. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.003

Alsam, S., Kim, K. S., Stins, M., Rivas, A. O., Sissons, J., & Khan, N. A. (2003). *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, *35*(6), 235–241. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2003.07.001

Alsam, S., Sissons, J., Dudley, R., & Khan, N. A. (2005). Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitology Research*, *96*(6), 402–409. https://doi.org/10.1007/s00436-005-1401-z

ALSAM, S., SISSONS, J., JAYASEKERA, S., & KHAN, N. (2005). Extracellular proteases of (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Journal of Infection*, *51*(2), 150–156. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.09.001

Badenoch, P. R., Grimmond, T. R., Cadwgan, J., Deayton, S. E., Essery, M. S. L., & Hill, A. B. D. (1988). Nasal carriage of free-living amoebae. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *1*(3), 209–211. https://doi.org/10.3109/08910608809141538

Benedetto, N., Rossano, F., Gorga, F., Folgore, A., Rao, M., & Romano Carratelli, C. (2003). Defense mechanisms of IFN-γ and LPS-primed murine microglia against *Acanthamoeba castellanii* infection. *International Immunopharmacology*, *3*(6), 825–834. https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00047-X

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33–S40. https://doi.org/10.1016/J.JACI.2009.09.017

Brindley, N., Matin, A., & Khan, N. A. (2009). *Acanthamoeba castellanii*: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Experimental Parasitology*, *121*(3), 254–256. https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2008.11.009

Carnt, N., Hoffman, J. J., Verma, S., Hau, S., Radford, C. F., Minassian, D. C., & Dart, J. K. G. (2018). *Acanthamoeba* keratitis: confirmation of the UK outbreak and a prospective case-control study identifying contributing risk factors. *British Journal of Ophthalmology*, *102*(12), 1621–1628. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312544

Cavaillon, J. M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *48*(10), 445–453. https://doi.org/10.1016/0753-3322(94)90005-1

Clarke, D. W., & Niederkorn, J. Y. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis*. *Trends in Parasitology*, *22*(4), 175–180. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.004

Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, H. K., & Minner, J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *The American Journal of Pathology*, *35*(1), 185–197.

Damhorst, G. L., Watts, A., Hernandez-Romieu, A., Mel, N., Palmore, M., Ali, I. K. M., Neill, S. G., Kalapila, A., & Cope, J. R. (2022). *Acanthamoeba castellanii* encephalitis in a patient with AIDS: a case report and literature review. *The Lancet Infectious Diseases*, *22*(2), e59–e65. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30933-6

Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The immune system. *New England Journal of Medicine*, *343*(1), 37–49. https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107

Edwards, S. W., & Doulah, F. A. (1982). Elevation of AMP levels during phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of General Microbiology*, *128*(12), 2919–2925. https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-2919/CITE/REFWORKS

Ferrante, A., Bates, E. J., Adelaide, N., & Australia, S. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae Naegleria and *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity*, *56*(12), 3320–3321. https://doi.org/10.1128/IAI.56.12.3320-3321.1988

Flores-Maldonado, C., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Gallardo, J. M., González-Lázaro, M., Hernández-Ramírez, V. I., Talamás-Rohana, P., Lorenzo-Morales, J., & Martínez-Palomo, A. (2017). *Acanthamoeba* (T4) trophozoites cross the MDCK epithelium without cell damage but increase paracellular permeability and transepithelial resistance by modifying tight junction composition. *Experimental Parasitology*, *183*, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.013

Fu, N. X., Song, J., Huang, X., & Lin, G. H. (2020). Granulomatous amoebic encephalitis presenting as a solitary mass lesion. *Radiology of Infectious Diseases*, *7*(4), 204–207. https://doi.org/10.1016/j.jrid.2020.09.001

Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., & Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby Canine kidney I cells. *The Journal of Cell Biology*, *153*(2), 263–272. https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.263

Gordon, V. R., Asem, E. K., Vodkin, M. H., Mclaughlin, G. L., & Mcuiughlin, G. L. (1993). *Acanthamoeba* binds to extracellular matrix proteins in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *34*(3), 658–662.

Gullett, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L., & Gelber, R. (1979). Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *The American Journal of Medicine*, *67*(5), 891–896. https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)90750-2

Hasni, I., Andréani, J., Colson, P., & La Scola, B. (2020). Description of virulent factors and horizontal gene transfers of keratitis-associated Amoeba Acanthamoeba triangularis by genome analysis. *Pathogens*, *9*(3), 217. https://doi.org/10.3390/pathogens9030217

He, Y. G., Niederkorn, J. Y., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Silvany, R., & Dougherty, J. (1990). In vivo and in vitro collagenolytic activity of Acanthamoeba castellanii. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *31*(11), 2235–2240.

Hernández-Jasso, M., Hernández-Martínez, D., Avila-Acevedo, J. G., Benítez-Flores, J. del C., Gallegos-Hernández, I. A., García-Bores, A. M., Espinosa-González, A. M., Villamar-Duque, T. E., Castelan-Ramírez, I., González-Valle, M. del R., & Omaña-Molina, M. (2020). Morphological description of the early events during the invasion of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites in a murine model of skin irradiated under UV-B light. *Pathogens*, *9*(10), 794–809. https://doi.org/10.3390/pathogens9100794

Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., & Leube, R. E. (2007). Structure and function of desmosomes. In *International review of cytology* (pp. 65–163). https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)64003-0

Hurt, M., Apte, S., Leher, H., Howard, K., Niederkorn, J., & Alizadeh, H. (2001). Exacerbation of *Acanthamoeba keratitis* in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infection and Immunity*, *69*(5), 2988–2995. https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2988-2995.2001

Hurt, M., Proy, V., Niederkorn, J. Y., & Alizadeh, H. (2003). The interaction of *Acanthamoeba castellanii* cysts with macrophages and neutrophils. *The Journal of Parasitology*, *89*(3), 565–572. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0565:TIOACC]2.0.CO;2

Jahnes, W. G., Fullmer, H. M., & Li, C. P. (1957). Free living Amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Experimental Biology and Medicine*, *96*(2), 484–488. https://doi.org/10.3181/00379727-96-23515

Jaison, P. L., Cao, Z., & Panjwani, N. (1998a). Binding of *Acanthamoeba* to 23 mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury. *Current Eye Research*, *17*(8), 770–776. https://doi.org/10.1080/02713689808951256

Jaison, P. L., Cao, Z., & Panjwani, N. (1998b). Binding of *Acanthamoeba* to 23 mannose-glycoproteins of corneal epithelium: Effect of injury. *Current Eye Research*, *17*(8), 770–776. https://doi.org/10.1080/02713689808951256

Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis, C., Auer, H., Walochnik, J., & Schmutzhard, E. (2010). Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocritical Care*, *12*(1), 91–94. https://doi.org/10.1007/s12028-009-9291-z

Leher, H. F., Alizadeh, H., Taylor, W. M., Shea, A. S., Silvany, R. S., Van Klink, F., Jager, M. J., & Niederkorn, J. Y. (1998). Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *39*(13), 2666–2673.

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, *22*, 10. https://doi.org/10.1051/parasite/2015010

Maghsood, A. H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D., & Khan, N. A. (2005). *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(8), 755–759. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45970-0

Marciano-Cabral, F., Ludwick, C., Puffenbarger, R. A., & Cabral, G. A. (2004). Differential stimulation of microglial pro-inflammatory cytokines by *Acanthamoeba culbertsoni* versus *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *51*(4), 472–479. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00398.x

Marciano-Cabral, F., & Toney, D. M. (1998). The Interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *45*(4), 452–458. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05099.x

Martinez, A. J., Garcia, C. A., Halks-Miller, M., & Arce-Vela, R. (1980). Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathologica*, *51*(2), 85–91. https://doi.org/10.1007/BF00690448

Mattana, A., Bennardini, F., Usai, S., Fiori, P. L., Franconi, F., & Cappuccinelli, P. (1997). *Acanthamoeba castellanii* metabolites increase the intracellular calcium level and cause

cytotoxicity in Wish cells. *Microbial Pathogenesis*, *23*(2), 85–93. https://doi.org/10.1006/mpat.1997.0138

Mattana, A., Tozzi, M. G., Costa, M., Delogu, G., Fiori, P. L., & Cappuccinelli, P. (2001). By releasing ADP, *Acanthamoeba castellanii* causes an increase in the cytosolic free calcium concentration and apoptosis in Wish cells. *Infection and Immunity*, *69*(6), 4134–4140. https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.4134-4140.2001

Mitra, M. M., Alizadeh, H., Gerard, R. D., & Niederkorn, J. Y. (1995). Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *73*(1–2), 157–164. https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00109-Z

Moore, M. B., Ubelaker, J. E., Martin, J. H., Silvany, R., Dougherty, J. M., Meyer, D. R., & McCulley, J. P. (1991). In vitro penetration of human corneal epithelium by *Acanthamoeba castellanii*: A scanning and transmission electron microscopy study. *Cornea*, *10*(4), 291–298. https://doi.org/10.1097/00003226-199107000-00003

Niederkorn, J. Y., Ubelaker, J. E., Mcculley, J. P., Srewarr4, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J. A., Silvany, R. E., He, Y., Pidherney, M., Martin, J. H., & Alizadeh, H. (1992). Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii* [corrected]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *33*(1), 104–112.

Page, F. C. (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *The Journal of Protozoology*, *14*(4), 709–724. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02066.x

Panjwani, N., Zhao, Z., Baum, J., Pereira, M., & Zaidi, T. (1992). *Acanthamoebae* bind to glycolipids of rabbit corneal epithelium. *Infection and Immunity*, *60*(8), 3460–3463. https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3460-3463.1992

Polat, Z. A., Ozcelik, S., Vural, A., Yıldız, E., & Cetin, A. (2007). Clinical and histologic evaluations of experimental *Acanthamoeba* keratitis. *Parasitology Research*, *101*(6), 1621–1625. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0704-7

Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, *24*(1), 147–174. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720

Serrano-Luna, J. de J., Cervantes-Sandoval, I., Calderón, J., Navarro-García, F., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(1), 16–23. https://doi.org/10.1139/w05-114

Sissons, J., Kim, K. S., Stins, M., Jayasekera, S., Alsam, S., & Khan, N. A. (2005). *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infection and Immunity*, *73*(5), 2704–2708. https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2704-2708.2005

Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M., & Visvesvara, G. S. (1989). The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *American Journal of Ophthalmology*, *107*(4), 331–336. https://doi.org/10.1016/0002-9394(89)90654-5

Stewart, G. L., Shupe, K., Kim, I., Silvany, R. E., Alizadeh, H., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. (1994). Antibody-dependent neutrophil-mediated killing of *Acanthamoeba* castellanii. *International Journal for Parasitology*, *24*(5), 739–742. https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90129-5

Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A., & Byers, T. J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *45*(1), 45–54. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x

Toney, D. M., & Marciano-Cabral, F. (1998). Resistance of Acanthamoeba Species to Complement Lysis. *The Journal of Parasitology*, *84*(2), 338. https://doi.org/10.2307/3284492

Ubelaker, J. E., Moore, M. B., Martin, J. H., Silveny, R., Dougherty, J. M., Meyer, D. R., & McCulley, J. P. (1991). In vitro Intercellular adherence of *Acanthamoeba castellanii*: A scanning and transmission electron microscopy study. *Cornea*, *10*(4), 299–304. https://doi.org/10.1097/00003226-199107000-00004

Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J. A., Silvany, R. E., Mcculley, J. P., & Niederkorn^, J. Y. (1993). The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster

model of *Acanthamoeba keratitis*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *34*(6), 1937–1944.

Van Klink, F., Leher, H., Jager, M. J., Alizadeh, H., Taylor, W., & Niederkorn, J. Y. (1997). Systemic immune response to *Acanthamoeba* keratitis in the Chinese hamster. *Ocular Immunology and Inflammation*, *5*(4), 235–244. https://doi.org/10.3109/09273949709085064

van Klink, F., Taylor, W. M., Alizadeh, H., Jager, M. J., Rooijen, N. van, & Niederkorn, J. Y. (1996). The role of macrophages in *Acanthamoeba keratitis*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *37*(7), 1271–1281.

Wojtkowiak-Giera, A., Derda, M., Kolasa-Wołosiuk, A., Hadaś, E., Kosik-Bogacka, D., Solarczyk, P., Jagodziński, P. P., & Wandurska-Nowak, E. (2016). Toll-like receptors in the brain of mice following infection with *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research*, *115*(11), 4335–4344. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5217-9

Yang, Z., Cao, Z., & Panjwani, N. (1997). Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infection and Immunity*, *65*(2), 439–445. https://doi.org/10.1128/iai.65.2.439-445.1997

Zamora, A., Henderson, H., & Swiatlo, E. (2014). *Acanthamoeba* encephalitis: A case report and review of therapy. *Surgical Neurology International*, *5*(1), 68–73. https://doi.org/10.4103/2152-7806.132239