

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Zavedení helminta jako modelového organismu do kultury a
charakterizace imunitní odpovědi hostitele**

Bakalářská práce

Oldřiška Hložková

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

Školitel-specialista: Mgr. Kateřina Sobotková, Ph.D.

České Budějovice 2017

Hložková O. (2017): Zavedení helminta jako modelového organismu do kultury a charakterizace imunitní odpovědi hostitele. [Introduction of helminth as a model organism into the culture and characterization of the host immune response. Bc. Thesis, in Czech] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main goals of the present thesis were (i) to introduce a model commensal tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, to the culture and (ii) characterization of a mucosal immune response in the host gut. Primarily, I focused on the establishment of a culture of *H. diminuta* under laboratory conditions based on its natural life cycle - grain beetles (*Tenebrio molitor*) as an intermediate host and outbred Wistar rats as definitive hosts. Infected beetles were bred at 28°C and due to this specific condition we were able to get infectious larvae three weeks after the first infection. To meet the second aim of this study, I examined a production of IgA antibodies against *H. diminuta* in the intestine of definitive host in the fecal samples using an indirect ELISA method. First, I performed several experiments focused on the optimization of *H. diminuta* antigen suitable for detection of IgA antibodies against *H. diminuta* in ELISA. Subsequently, I performed two experiments for detection of IgA fluctuation during *H. diminuta* infection in the rat model system. The strong production of IgA antibodies started always in the patent period of infection (i.e., when adult tapeworm is developed). In summary, my results suggest that *H. diminuta* has a strong immunomodulatory effect on the host organism.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ:

Touto cestou bych ráda poděkovala především své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D., nejen za odbornou pomoc a rady při psaní této bakalářské práce, ale především za její skvělé vedení. Velké poděkování za pomoc se psaním mé práce patří Mgr. Kateřině Sobotkové, Ph.D. Dále patří můj velký dík PharmDr. Ivanovi Vokřálovi Ph.D. za poskytnutí prvních infekčních dávek *Hymenolepis diminuta*. Chtěla bych také poděkovat RNDr. Romanu Kuchtovi Ph.D. za pomoc při zavádění kultury helminta v laboratoři a Mgr. Miroslavě Soldánové Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat. Zároveň bych chtěla poděkovat celému našemu kolektivu za jejich pozitivní přístup a ochotu pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také rodině a příteli za jejich trpělivost a oporu v průběhu celého mého studia.

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1. Helmintoterapie	1
1.1.1. „Old Friends“ hypotéza	2
1.2. Princip helmintoterapie.....	3
1.3. Helminti v helmintoterapii.....	4
1.4. Kritéria výběru helminta pro použití v helmintoterapii.....	9
1.5. <i>Hymenolepis diminuta</i>	9
1.5.1. Morfologický popis životních stádií	10
1.5.2. Životní cyklus.....	11
1.6. Slizniční imunita.....	11
1.6.1. Slizniční imunita versus infekce helminty	12
1.6.2. Humorální imunitní odpověď.....	14
1.7. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	14
2. CÍLE PRÁCE	15
3. MATERIÁL A METODY	16
3.1. Kultivace <i>Hymenolepis diminuta</i>	16
3.1.1. Mezihostitel – potěmník moučný (<i>Tenebrio molitor</i>)	16
3.1.2. Definitivní hostitel – laboratorní potkan (<i>Rattus norvegicus</i>).....	17
3.2. Optimalizace metody ELISA pro detekci IgA protilátek produkovaných při infekci <i>Hymenolepis diminuta</i>	18
3.2.1. Příprava celkového antigenu <i>Hymenolepis diminuta</i>	18
3.2.2. ELISA.....	20
3.3. Design experimentů při sledování fluktuace IgA protilátek.....	20
3.3.1. Experiment A	21

3.3.2. Experiment B.....	21
3.4. Zpracování dat	21
3.4.1. STATISTICA 12	22
3.4.2. SigmaPlot 13	22
4. VÝSLEDKY	23
4.1. Zavedení kultury <i>Hymenolepis diminuta</i>	23
4.2. Optimalizace získávání celkového antigenu <i>Hymenolepis diminuta</i> pro účely nepřímé metody ELISA	23
4.2.1. Použití antigenu izolovaného z dospělce <i>Hymenolepis diminuta</i>	23
4.2.2. Získávání antigenu z larvocyst <i>Hymenolepis diminuta</i>	23
4.3. Stanovení fluktuační IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů.....	24
5. DISKUSE	27
6. ZÁVĚR.....	32
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	33

1. ÚVOD

Helminti jsou různorodá skupina nepříbuzných mnohobuněčných organismů, symbiotických i volně žijících. Tradičně je zastoupena kmeny hlístic [*Nematoda*], vrtejšů [*Acanthocephala*] a několika třídami z kmene plathelminthů [*Trematoda*, *Cestoda*, *Monogenea*]; dále také do této skupiny patří vířníci [*Rotifera*], parazitické ploštěnky [*Turbellaria*], pijavky [*Hirudinea*], pásnice [*Nemerthea*] a strunovci [*Nematomorpha*] (Volf & Horák, 2007). Helminti mohou být zastoupeni v různých biologických interakcích mezi dvěma a více organismy, mezi ty hlavní patří parazitismus a komenzálismus (Roberts *et al.*, 2012). Parazitismus je vztah, ve kterém jeden z účastníků má z tohoto vztahu prospěch na úkor druhého, zatímco ten druhý je poškozován (Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Naopak v případě komenzálismu se jedná o interakci, kdy jeden organismus má prospěch z toho druhého, zatímco ten druhý není poškozován, ale nemá z tohoto vztahu žádný užitek (Jurášek & Dubinský, 1993; Roberts *et al.*, 2012).

Helminti žijící ve vztahu s lidmi se adaptovali na lidský organismus mnoho stovek až miliónů let v průběhu evoluce člověka. Během této koevoluce se helminti stali efektivními modulátory imunitního systému člověka s cílem imunitní systém obejít, a tak přežít v hostiteli co nejdéle (Rook, 2012). Tato schopnost helmintů byla nedávno přijata vědeckou i lékařskou komunitou jako možnost léčby či prevence imunitně zprostředkovaných onemocnění (Helmbly, 2015; Weinstock & Elliott, 2014). V současné době již probíhá intenzivní výzkum různých kandidátů helmintů a jejich působení na pro-zánětlivou imunitní reakci hostitele. Těmito studii jsou například Fleming & Weinstock (2015), Lukeš *et al.* (2014) a Weinstock & Elliott (2014).

1.1. Helminoterapie

Helminti doprovázejí člověka v průběhu celé jeho historie, což umožnilo dlouhodobou evoluční adaptaci helmintů na lidský organismus (Bundy & Medley, 1992; Hoespli, 1956).

Klíčem k této adaptaci byl vývoj polarizace imunitní reakce hostitele, při které dochází k přepnutí typu imunitní odpovědi hostitele, a vývoj regulačních procesů, které vedou k dlouhodobému přežívání helmintů v hostiteli (Allen & Wynn, 2011). Helminti tak měli důležitý vliv na vývoj imunitního systému, což vyvolalo otázku, zda absence helmintů může způsobit vyšší predispozici ke vzniku imunitně zprostředkovaných chorob, jako jsou různé druhy alergií nebo autoimunitních onemocnění (Rook, 2012; Rook *et al.*, 2003).

Následně bylo během epidemiologických studií srovnávajících prevalence helmintů v populaci lidí žijících v západní civilizaci a v zemích třetího světa zjištěno, že lidé infikovaní helminty mají nižší výskyt imunitně zprostředkovaných onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění a také mohou mít sníženou hladinu cholesterolu (Wiria *et al.*, 2012; Wiria *et al.*, 2013). Tento jev je vysvětlován takzvanou „Old Friends“ hypotézou.

1.1.1. „Old Friends“ hypotéza

Dle „Old Friends“ hypotézy došlo během evoluce člověka k vytvoření blízkého vztahu mezi lidským organizmem a mnoha dalšími (např. bakterie, jednobuněčná eukaryota, helminti), kteří přispívají k vývoji imunitního systému a imunoregulaci (Rook, 2010; Rook, 2012; Rook *et al.*, 2014).

Nárůst prevalence imunitně zprostředkovaných onemocnění je pak dle této hypotézy spojen s moderním stylem života, který je charakterizován vysokými hygienickými standardy, nadměrným užíváním antibiotik a eliminací parazitů, zejména helmintů (Rook, 2012).

„Old Friends“ hypotéza je rozšířením takzvané Hygienické hypotézy, která byla formulována ve studii Strachan (1989), který již pozoroval, že zvyšující se hygienické návyky jsou pravděpodobně příčinou zvýšeného výskytu alergických reakcí. Později byla tato hypotéza přeformulována tak, aby byla v souladu s Darwinovskou medicínou (evoluční medicína-porozumění některým lidským onemocněním za pomoci evoluční teorie) a zavedli označení „Old Friends“ hypotéza (Rook, 2012; Rook *et al.*, 2003; Rook *et al.*, 2014).

Významné změny ve vztazích lidské populace s jinými druhy organismů (epidemiologické transmise) jsou vysvětlovány změnami v historii lidstva (Rook, 2012; Rook *et al.*, 2014). Během první epidemiologické transmise, kterou představuje neolitická revoluce

(přibližně před 10 000 lety) došlo k vytvoření části lidského mikrobiomu díky změně stylu života způsobené domestikací zvířat a počátkům zemědělství (Armelagos *et al.*, 2005). Tato situace se změnila během průmyslové revoluce v 19. století, kdy dochází ke shlukování lidí do měst a některé populace prochází druhou epidemiologickou transmisí. Se změnou způsobu života dochází ke změnám v hygienických standardech, vývoji desinfekčních prostředků, s tímto spojené dezinfekci vody a potravy, vývoj a (nad)užívání antibiotik. Jako důsledek všech uvedených okolností došlo k omezení styku lidské populace s mnoha organismy, kterým jsme byli do té doby vystavováni [tzn. ztráta „starých přátel“-„Old Friends“] (Rook, 2012).

1.2. Princip helmintoterapie

Helminti ovlivňují imunitní systém hostitele s cílem zabránit vlastnímu poškozování či vypuzení. Existuje několik mechanismů, kterými tělo hostitele reaguje na parazitární infekci (McSorley & Maizels, 2012). Např. dochází k aktivaci dendritických buněk, makrofágů a B buněk. Dále pak dochází k aktivaci CD4+ T buněk a k indukci Th2 imunitní odpovědi s charakteristickou expresí příslušných cytokinů jako jsou IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13 (Fleming & Weinstock, 2015; Helmbly, 2015; Howitt *et al.*, 2016; McSorley & Maizels, 2012; Weinstock, 2012). Důsledkem těchto procesů (a převážně Th2 odpovědi) je proti-zánětlivá reakce, která inhibuje pro-zánětlivé procesy a tím zmírňuje průběh autoimunitních onemocnění, jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (hlavní představitelé IBDs - Inflammatory Bowel Diseases), astma, diabetes 1. typu a roztroušená skleróza (Elliott & Weinstock, 2012; Hunter *et al.*, 2005; Weinstock & Elliott, 2013).

Helmintoterapie tedy vychází z výše uvedených poznatků a je založena na principu řízené infekce helminty vedoucí k modulaci imunitní odpovědi u pacientů trpících některými imunitně zprostředkovanými onemocněními, a tím ke zlepšení klinického průběhu těchto onemocnění (Weinstock, 2012).

1.3. Helminti v helmintoterapii

V rámci helmintoterapie je testováno několik kandidátů helmintů a sleduje se jejich vliv, případně vliv jejich exkrečních/sekrečních produktů na imunitní systém hostitele, resp. člověka.

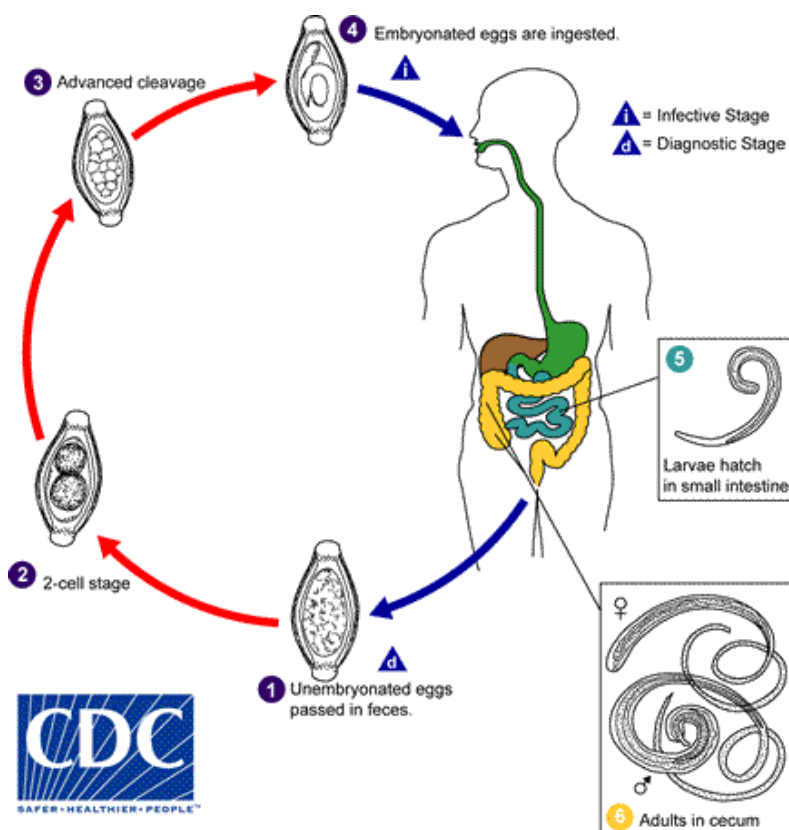
Trichuris suis a *Necator americanus* byly testovány v klinických studiích, *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni* a *Hymenolepis diminuta* pouze na zvířecích modelech (Elliott & Weinstock, 2012; Wang *et al.*, 2017). Tasemnici *Hymenolepis diminuta* je věnována samostatná kapitola 1.5.

Trichuris suis

Trichuris suis (Nematoda, Enoplida) je helmint s přímým vývojovým cyklem. Přírodním hostitelem *T. suis* je prase, člověk je jen náhodným hostitelem (Beer, 1976). Dospělci jsou lokalizováni v tlustém střevě hostitele. Zde produkují vajíčka, která odcházejí spolu s trusem hostitele do vnějšího prostředí. Během tří až sedmi týdnů se ve vajíčku vyvine infekční larva L1. Pozřením tohoto infekčního stádia dochází k nakažení dalšího hostitele. V žaludku dochází k narušení pólových zátek vajíčka a následně se v tenkém střevě z vajíčka uvolňuje larva L1. Ta se somatickou migrací dostává do sliznice tlustého střeva, kde se přeměňuje až do stádia L4, které se pak uvolní do lumen. Tam dospěje a dospělec *T. suis* se přední částí těla opět zavrtává do sliznice tlustého střeva. (Jíra, 1998; Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Schéma životního cyklu *T. suis* je znázorněno na Obrázku 1.

V rámci helmintoterapie byl *T. suis* testován v klinických studiích na pacientech s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou (IBDs). U většiny pacientů došlo k výraznému zmírnění klinických projevů, přičemž část z nich zaznamenala dokonce remisi onemocnění (Summers *et al.*, 2005).

Na IBD pacientech byl také klinicky testován komerční přípravek TSO® (*Trichuris suis* ova, <http://www.ovamed.de>), který obsahoval upravená vajíčka *T. suis*. Tento přípravek však prokázal oproti neupraveným vajíčkům výrazně sníženou terapeutickou účinnost (Helmbly, 2015).



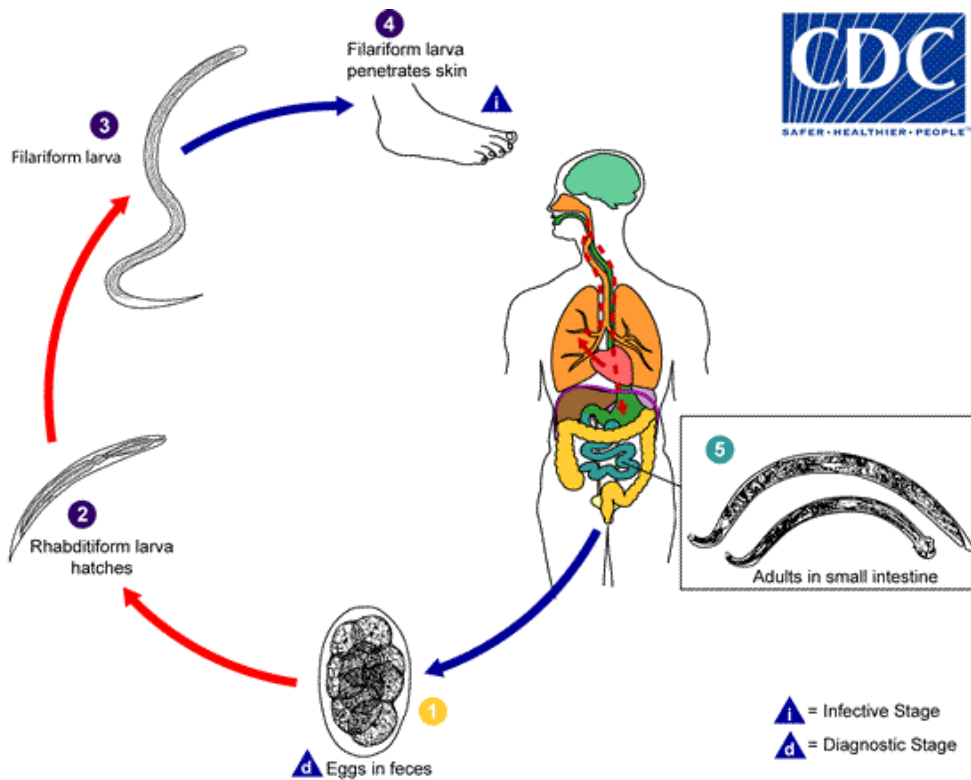
Obr. 1. Životní cyklus *Trichuris suis* (<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/biology.html>).

Necator americanus

Necator americanus (Nematoda, Strongylida) je helmint s přímým vývojovým cyklem. Jeho přirozeným hostitelem je člověk. Dospělci jsou lokalizováni v tenkém střevě a vylučují vajíčka, která odcházejí spolu s trusem do vnějšího prostředí. Ve vajíčku se zde začne rýhovat larva L1, která opouští vajíčko, mění se na larvu L2 a dále na infekční stádium L3. K infekci hostitele dochází perorálně nebo perkutánně. Larvy se krví dostávají do plic hostitele, kde se dále vyvíjí do stádia L5. Toto stádium je dále vykašláno a spolknuto. Trávicí soustavou se dostávají do tenkého střeva, kde dochází k vývoji dospělců (Jíra, 1998; Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Schéma životního cyklu *N. americanus* je znázorněno na Obrázku 2.

Necator americanus byl testován v klinických studiích na pacientech s astmatem, celiakií a Crohnovou chorobou. U pacientů s celiakií došlo pouze k nárůstu eozinofilů ve sliznici střeva, ale ne k zmírnění klinických příznaků (Daverson *et al.*, 2011; McSorley *et al.*, 2011). V případě pacientů s astmatem nedošlo k žádné změně jejich zdravotního stavu

(Feary *et al.*, 2009). Naopak u některých pacientů s Crohnovou chorobou došlo ke zlepšení jejich zdravotního stavu (Croese *et al.*, 2006).

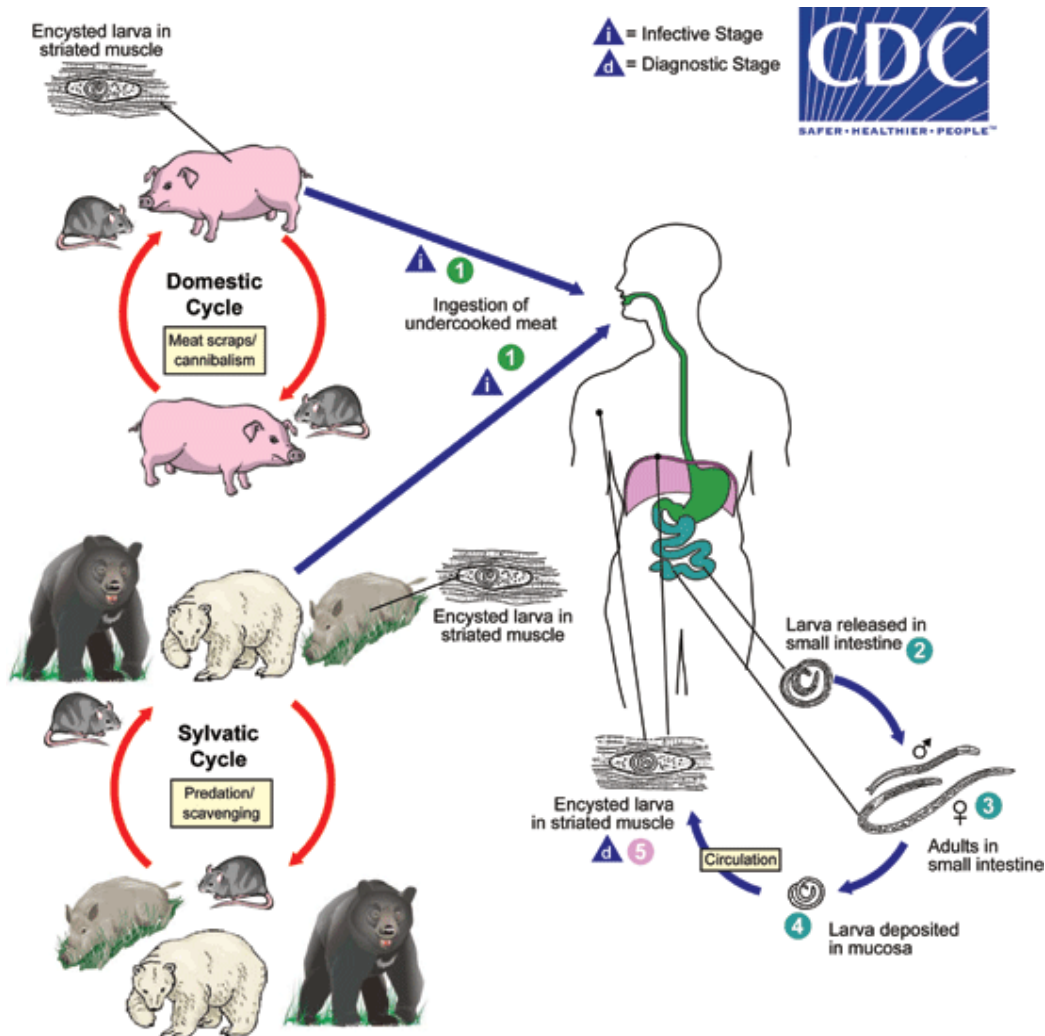


Obr. 2. Životní cyklus *Necator americanus* (<https://www.cdc.gov/parasites/hookworm/biology.html>).

Trichinella spiralis

Trichinella spiralis (Nematoda, Enoplida) je helmint se zvláštním typem životního cyklu bez stádií žijících ve vnějším prostředí. Jeho hostiteli jsou především savci včetně člověka. Larvy a dospělci se zde vyskytují v různých tkáních definitivního hostitele, který je tak zároveň i mezihostitelem. Dospělci jsou zanořeni ve sliznici tenkého střeva hostitele. Samičky *T. spiralis* kladou v tenkém střevě larvy L1, které se skrze stěnu střeva dostávají do lymfatického a následně do krevního oběhu. Tudy putují do příčně pruhovaného svalstva do celého těla hostitele, kde larvy rostou a zapouzdřují se. Takto zapouzdřené larvy (cysty) jsou po mnoho let infekce schopné. Nový hostitel se infikuje perorálně pozřením svalstva se zapouzdřenými larvami L1, které se ve střevě uvolňují z cyst a po čtyřech svlékáních

dospívají (Jíra, 1998; Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Schéma životního cyklu *T. spiralis* je znázorněno na Obrázku 3.

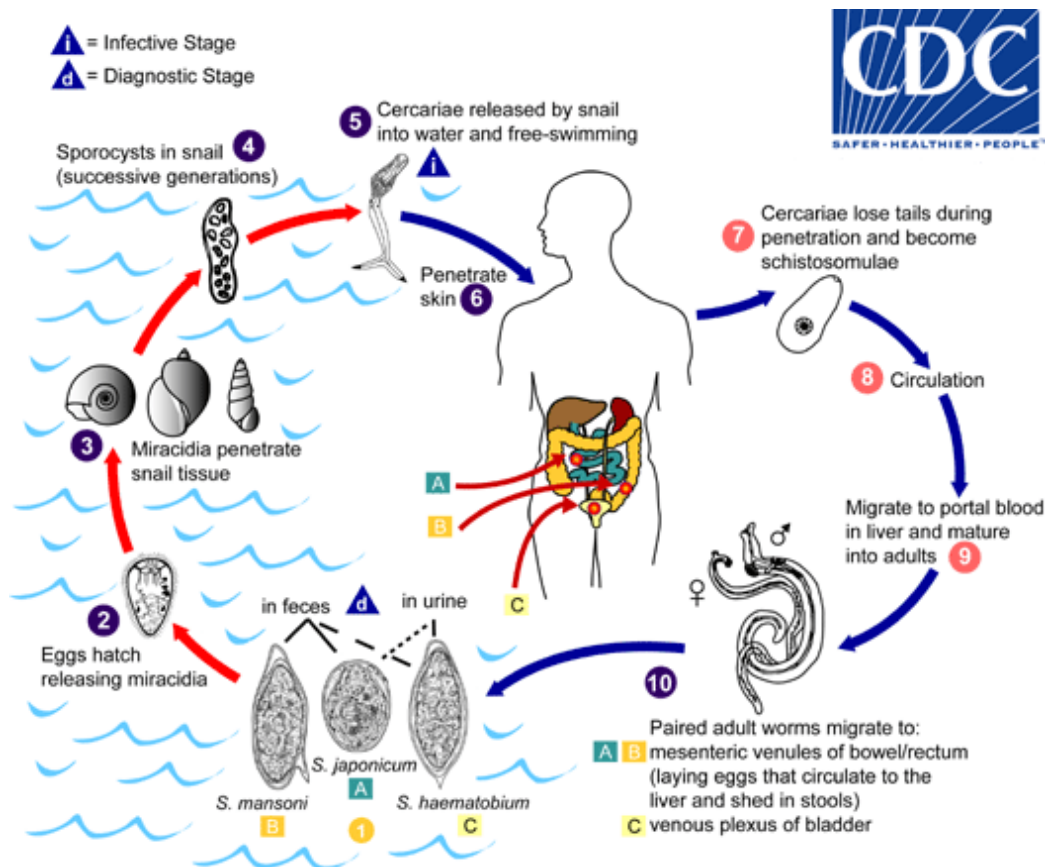


Obr. 3. Životní cyklus *Trichinella spiralis* (<https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html>).

Terapeutický potenciál *T. spiralis* byl testován pouze na zvířecích modelech. Jak přímá infekce helmintem, tak i aplikace jeho produktů měly na vývoj studovaných chorob pozitivní účinek. Konkrétně byl zaznamenán pozitivní vliv infekce *T. spiralis* na diabetes 1. typu (Saunders *et al.*, 2007) a exkreční/sekreční produkty různých stádií vývoje tohoto helminta měly pozitivní vliv na klinický průběh chemicky vyvolané kolitidy u myší (Yang *et al.*, 2014).

Schistosoma mansoni

Schistosoma mansoni (Trematoda, Schistomatidae) je motolice s nepřímým vývojovým cyklem, jejímž definitivním hostitelem jsou primáti včetně člověka, a mezihostitelem jsou plži. Dospělci jsou lokalizováni ve střevním mezenteriu. Vajíčka odcházejí spolu s trusem do vnějšího prostředí. Z vajíčka se ve vhodném vlhkém prostředí vylíhne tzv. miracidium, které vyhledává vhodného plže a infikuje jej (Gryseels *et al.*, 2006). V plži dochází k nepohlavnímu rozmnožování a vývoji sporocyst a cercárií, které dále opouštějí mezihostitele a perkutánně infikují definitivního hostitele. Z kůže hostitele putují cévním systémem do mezenteria, kde dospívají (Jíra, 1998; Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Schéma životního cyklu *S. mansoni* je znázorněno na Obrázku 4.



Obr. 4. Životní cyklus *Schistosoma mansoni*

(<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>).

V souvislosti s helmintoterapií byla *S. mansoni* testována pouze na zvířecích modelech, a to v souvislosti s diabetem 1. typu. Zde bylo prokázáno, že exkreční a sekreční produkty z dospělce a larválních stadií mají na průběh této choroby velmi pozitivní vliv (Zacccone *et al.*, 2003).

1.4. Kritéria výběru helminta pro použití v helmintoterapii

Při výběru vhodného kandidáta pro použití v helmintoterapii musí být naplněna tato základní kritéria, jak byla navržena v rámci studie Lukeš *et al.* (2014):

- a) životní cyklus s minimální nebo lépe úplně bez somatické migrace;
- b) průběh infekce s minimálními nebo zcela bez patogenních projevů u člověka;
- c) lokalizace dospělce v zažívacím traktu;
- d) minimální možnost šíření helminta do prostředí z infikovaných pacientů (nepřímý vývojový cyklus, neschopnost množit se v lidském těle);
- e) možnost získání dostatečně čistých až sterilních infekčních dávek (laboratorní zpracování dávek a použití gnotobiotických zvířat);
- f) dostatečná znalost biologie, epidemiologie, hostitelského spektra a patogenity helminta;
- g) možnost případného vymýcení helminta pomocí antihelmintik;
- h) schopnost helminta ovlivnit diverzitu střevního mikrobiomu.

1.5. *Hymenolepis diminuta*

Tasemnice *Hymenolepis diminuta* byla vybrána jako jeden z možných kandidátů pro účely výzkumu helmintoterapie na základě výše uvedených kritérií (kapitola 1.4.). Výhodou je také relativně snadný chov mezihostitelů a definitivního hostitele, díky čemuž sloužila jako experimentální model i v minulosti. *Hymenolepis diminuta* je kosmopolitně rozšířený helmint patřící do třídy *Cestoda*, řádu *Cyclophyllidea* a čeledi *Hymenolepididea* (Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007).

1.5.1. Morfologický popis životních stádií

Dospělá tasemnice má dorzálně zploštělé tělo, které je 20-60 cm dlouhé, v cervikální části má šířku 0,5 mm a v distální části až 3,5 mm. Skolex nese čtyři přísavky se zakrnělým rostelem bez háčků. Strobila je obvykle složena z 600-1000 proglotidů a koncové články obsahují zralá vajíčka (Jíra, 1998). *Hymenolepis diminuta* je hermafroditní, nemá trávicí soustavu a živiny jsou přijímány celým povrchem těla. Všechna vývojová stádia jsou zobrazena na Obrázku 5.

Vajíčka jsou kulatá nebo mírně oválná s příčně pruhovanou silnou stěnou. Uvnitř vajíčka je onkosféra se zřetelným hexakantem. Celková velikost vajíčka je 60-80 μm (Jíra, 1998).

V mezihostiteli se vyvíjí larvocysta, což je morfologicky měchýřek s uschovaným skolexem, obklopený průsvitnou blankou a opatřený buněčným ocáskem (cerkomerou) s celkovou velikostí přibližně 150-200 μm (Jurášek & Dubinský, 1993).



Obr. 5. Vývojová stádia *Hymenolepis diminuta*: 1) dospělci v tenkém střevě potkana; 2) dospělec o délce cca 50 cm; 3) larvocysty a mezihostitel; 4) vajíčko s onkosférou a hexakantem (měřítko 25 μm).

1.5.2. Životní cyklus

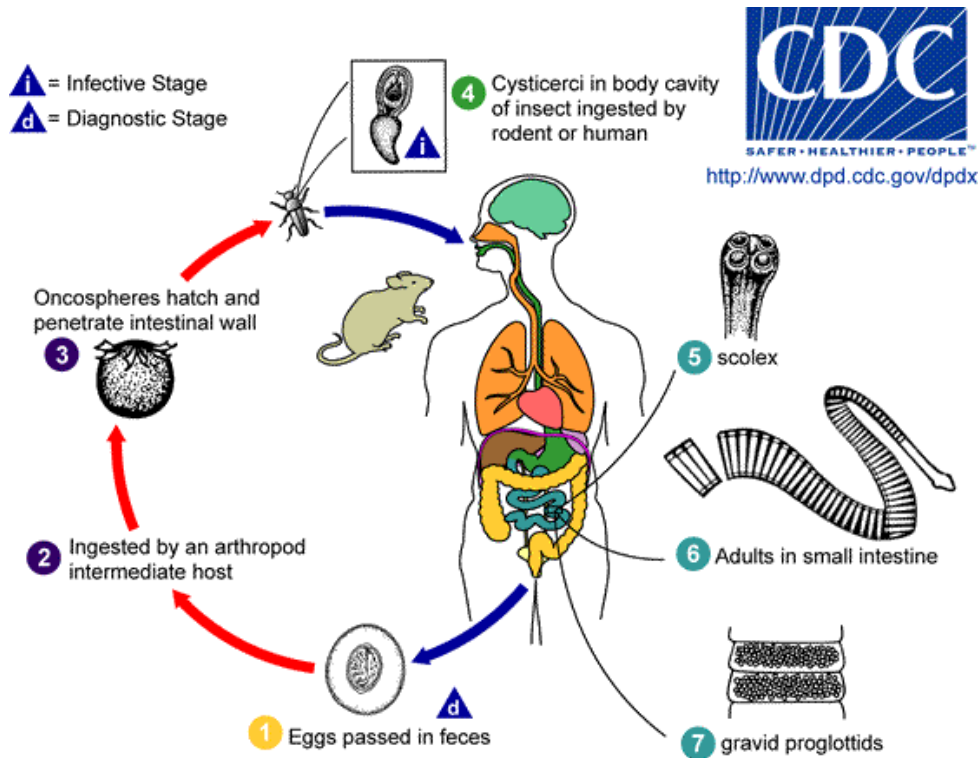
Hymenolepis diminuta má nepřímý vývojový cyklus, který zahrnuje mezihostitele (některé druhy bezobratlých, nejčastěji z řádu potěmnikovití) a definitivního hostitele (hlodavci, zejména potkani). Člověk není běžným definitivním hostitelem, ale spíše příležitostným (Andreassen *et al.*, 1999; McKay, 2010; Volf & Horák, 2007). U člověka se většinou jedná o asymptomatickou infekci, která je často odhalena jen náhodně (Kalaivani *et al.*, 2014; Nkouawa *et al.*, 2016).

Vajíčka *H. diminuta* odcházejí spolu s trusem definitivního hostitele do vnějšího prostředí, kde jsou požřeny mezihostitelem. V jeho střevě pak dojde k uvolnění onkosféry, která dále migruje pomocí lymfatického a krevního řečiště do tělních dutin a vyvíjí se v larvocystu (Andreassen *et al.*, 1999; McKay, 2010). Definitivní hostitel se infikuje požitím mezihostitele s infekce schopnými larvocystami v tělní dutině. V zažívacím ústrojí definitivního hostitele dochází k uvolnění larvocyst z těla mezihostitele. V tenkém střevě hostitele se dále larvocysta uchycuje na stěnu tenkého střeva a postupně dospívá (prepatentní perioda). Po 18-21 dnech je dospělá tasemnice schopna uvolňovat články se zralými vajíčky [patentní perioda] (Andreassen *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2012; Volf & Horák, 2007). Kompletní životní cyklus *H. diminuta* je znázorněn na Obrázku 6.

1.6. Slizniční imunita

Nejvíce citlivým místem organismu jsou sliznice, které jsou v přímém styku s vnějším prostředím. Proto zde došlo k vytvoření slizničního imunitního systému, který se skládá z tzv. indukčních a efektorových oblastí (McGhee & Fujihashi, 2012). Indukční oblasti jsou souhrnně nazývány jako MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) a zahrnují střevní lymfatický systém (GALT - Gut-Associated Lymphoid Tissue) a respirační lymfatický systém (BALT - Bronchus-Associated Lymphoid Tissue a NALT - Nasal-Associated Lymphoid Tissue). Mezi efektorové oblasti patří lamina propria (tkáň nacházející se pod vrstvou epitelu) střevního, respiračního a ženského rozmnožovacího ústrojí a žlázy s vnější sekrecí (slinné, slzné nebo prsní). Tyto oblasti obsahují antigenně specifické efektorové buňky, jako jsou plazmatické buňky produkující IgA protilátky,

dendritické buňky, paměťové B a T lymfocyty a makrofágy (McGhee & Fujihashi, 2012; Murphy & Weaver, 2016).

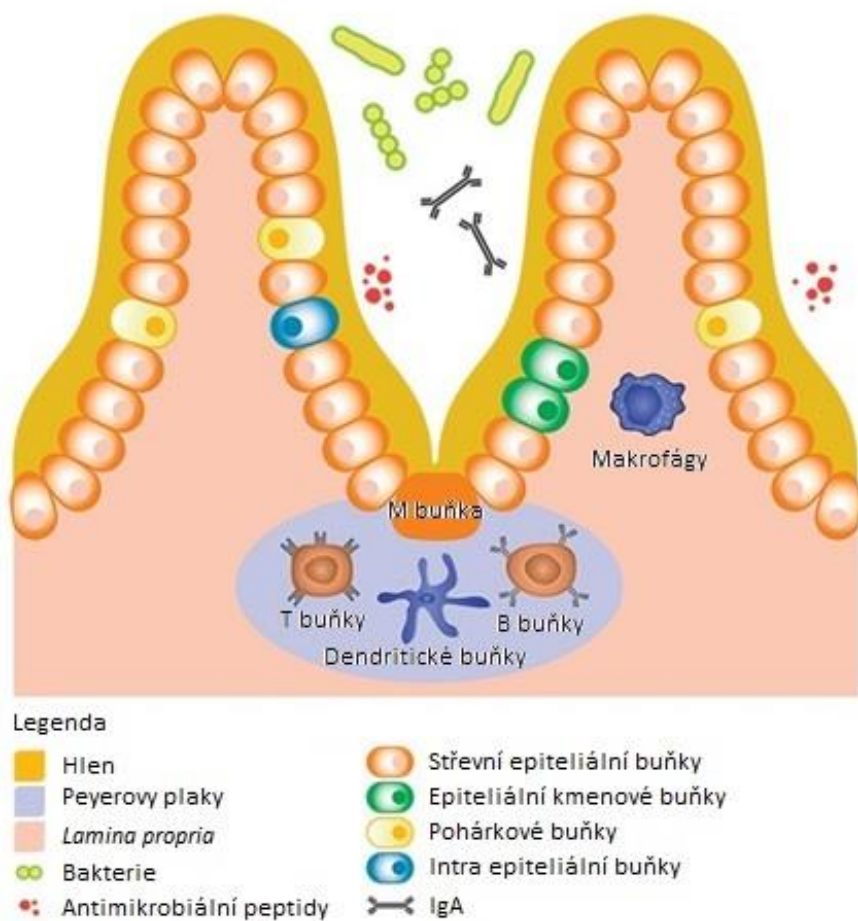


Obr. 6. Životní cyklus *Hymenolepis diminuta* (<https://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html>).

1.6.1. Slizniční imunita versus infekce helminty

Při infekci střevními helminty dochází k aktivaci GALT, jehož součástí jsou Peyerovy plaky, mezenterické lymfatické uzliny a pohárkové buňky. Pohárkové buňky jsou jedny ze sloupcových epiteliálních buněk (Obr. 7), které jsou po aktivaci střevní sliznice stimulovány k produkci hlenu (McGhee & Fujihashi, 2012). V submukózní vrstvě tenkého střeva se nachází Peyerovy plaky (Murphy & Weaver, 2016). Mají strukturu lymfoidních folikul a jejich úkolem je koordinace imunitní odpovědi na patogenní infekce, ale také udržení tolerance vůči komenzálním organismům. Obsahují množství T a B lymfocytů, dendritických buněk, makrofágy a specifické fagocytární buňky M (microfold). Tyto M buňky transportují antigeny přes epiteliální bariéru do Peyerových plaků a dále do dendritických buněk.

Z Peyerových plaků i lamina propria je lympfa odváděna do mezenterických lymfatických uzlin, které jsou umístěny v mezenteriu. Jsou důležité pro zahájení humorální imunitní odpovědi na patogeny i pro udržení tolerance vůči nepatogenním organismům/antigenům (McGhee & Fujihashi, 2012; Murphy & Weaver, 2016) .



Obr. 7. Schéma střevní stěny a jejího imunitního systému. Převzato z <https://www.bio-rad-antibodies.com/mucosal-immunology-minireview.html>.

1.6.2. Humorální imunitní odpověď

Humorální odpověď je jedním z typů imunitní reakce organismu (druhým typem je buněčná imunitní odpověď). Fyziologickou funkcí humorální odpovědi je obrana mimobuněčných prostor proti patogenním mikroorganismům a jejich šíření (Murphy & Weaver, 2016). Tato obrana spočívá v aktivaci B lymfocytů, které se pak diferencují v plazmatické nebo paměťové buňky. Plazmatické buňky produkují různé druhy protilátek mající různé funkce. Protilátky (imunoglobuliny) můžeme zařadit do pěti různých tříd (izotypů) podle specifických oblastí ve struktuře (C-region), které aktivují různé efektorové mechanismy (tj. mají různé funkce): IgA, IgG, IgM, IgE a IgD. Paměťové buňky mají oproti plazmatickým buňkám delší životnost a hrají důležitou roli při opakovaném setkání s již známým patogenem (Abbas *et al.*, 2014).

Důležitou roli v reakci na střevní parazity hrají IgA protilátky, které jsou dominantními protilátkami ve všech slizničních imunitních systémech. Jsou produkovány místními plazmatickými B buňkami, které se nacházejí v lamina propria (Lamb, 2012).

1.7. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Pro detekci i kvantifikaci množství antigenu a protilátek se ve výzkumu i v klinické praxi nejčastěji využívá metoda ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Existuje několik variant metody ELISA a to přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní. Ve své práci jsem použila nepřímou variantu metody ELISA.

Prvním krokem nepřímé metody ELISA je ukotvení specifického antigenu na mikrotitrační destičku. Na tento antigen je dále navázána primární protilátka obsažená ve studovaném materiálu. Tato protilátka je dále detekována pomocí sekundární protilátky, která je spojena s peroxidázou. Po přidání substrátu pak dochází ke změně zabarvení vzorku, které je úměrné množství peroxidázy – tj. navázané sekundární protilátky v vzorku a je následně měřeno pomocí spektrofotometru (Lukas *et al.*, 1997).

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené práce je zjistit produkci střevní slizniční imunity definitivního hostitele v průběhu infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta* a to v prepatentní a patentní periodě. Práce je součástí větší studie zaměřené na studium vlivu tasemnice *H. diminuta* v prevenci a terapii IBD onemocnění.

Dále byly pro účely této bakalářské práce vytyčeny tři dílčí cíle:

- ustanovení kultury *H. diminuta* v laboratorních podmínkách;
- optimalizace nepřímé metody ELISA pro detekci IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů;
- sledování fluktuace IgA protilátek v potkaním modelu během infekce *H. diminuta*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Kultivace *Hymenolepis diminuta*

Životní cyklus *Hymenolepis diminuta* je založen na dvou hostitelích, a to na mezihostiteli (bezobratlí), v kterém se vyvíjí larvální stádia - larvocysty (tzv. cysticerkoidy), a definitivním hostiteli (potkan), v němž se vyvíjí dospělci. Definitivní hostitel se nakazí požitím larvocyst z mezihostitele. Po uplynutí prepatentní periody (tj. období od infekce po vyvinutí dospělců) definitivní hostitel vylučuje vajíčka trusem, jimiž se dále infikují mezihostitelé.

Pro účely kultivace *H. diminuta* v laboratorních podmínkách jsme zvolili jako mezihostitele potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a jako definitivní hostitele outbrední potkany Wistar. První infekční dávky jsme získali od spolupracující laboratoře z Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

3.1.1. Mezihostitel – potemník moučný (*Tenebrio molitor*)

Chov: Potemníci byli chováni ve vyhřívaném teráriu, které bylo rozděleno na chovnou a infekční část. Vyhřívání bylo zajištěno žárovkou ovládanou termostatem nastaveným na teplotu 28°C. Jako podestýlka byly použity piliny. Brouci byli krmeni ovocem, zeleninou a suchým pečivem. Voda byla podávána v Petriho misce s vatou.

Kultivace *H. diminuta*: Infekce potemníků byla prováděna trusem od potkanů infikovaných *H. diminuta*, ve kterém se nacházejí vajíčka tasemnice. Trus byl rozmělněn ve vodě na homogenní hmotu. Broukům byla tato směs podávána po dobu pěti dnů bez přidání další potravy. Po uplynutí tří týdnů byla vždy kontrolována přítomnost živých a infekce schopných larvocyst v tělní dutině brouků.

Larvocysty *H. diminuta* byly získávány z tělní dutiny brouků pitvou za tři týdny po infekci potemníků. Nejdříve byla odstrážena hlava brouka, dále se rozstříhla mediálně tělní dutina a pomocí stříčky se sterilním fosfátovým fyziologickým roztokem (Phosphate Buffered Saline – PBS) byly larvocysty vypláchnuty na Petriho misku. Zde byly posbírány pomocí mikropipety a propláchnuty ještě jednou ve sterilním PBS. Získané larvocysty byly následně použity buď pro infekci definitivního hostitele, nebo uskladněny v -80°C pro přípravu celkového antigenu pro účely metody ELISA.

3.1.2. Definitivní hostitel – laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

Chov: Jako definitivní hostitel byli použiti SPF (Specific Pathogen Free) outbrední potkani Wistar, kteří byli nakupováni z komerčního chovu Envigo (distributor Anlab Praha) a dále chováni v akreditovaném zvěřinci Parazitologického ústavu (Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice). Zvířata byla chována ve standardních podmínkách v chovných boxech a dostávala vodu a granule *ad libitum*. Granule obsahovaly kompletní krmnou směs. Světelný režim byl v místnosti bez denního světla upraven na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Optimální teplota se pohybovala mezi 20 až 24°C.

Kultivace *H. diminuta*: Potkani byli infikováni perorálně dvěma dávkami 10-15 larvocyst získaných pitvou potměnků s použitím jícnové sondy. Infekce byly potvrzeny po uplynutí prepatentní periody (16-21 dní) pomocí koprologické Sheatherovy flotační metody (Sheather, 1923). Vajíčka *H. diminuta* byla identifikována na základě charakteristických morfologických znaků: velikost mezi 60-70µm, kulatý nebo mírně oválný tvar s příčně pruhovanou silnou stěnou, uvnitř vajíčka onkosféra se zřetelným hexakantem.

Modifikovaná Sheatherova flotační metoda: Připravit Sheatherův roztok tak, že v 259 ml vody rozmícháme 405 g krystalového cukru. Trus od potkanů byl homogenizován v třecí misce s malým množstvím vody. Roztok byl dále přefiltrován přes sítko do 10 ml skleněných zkumavek. Zkumavky byly následně odstředěny při 600 rcf (relative centrifugal force) po dobu 3 minut. Supernatant byl odstraněn, pelet byl rozmíchán v Sheatherově roztoku a znovu odstředěn při stejných podmínkách. Povrchová blanka byla přenesena pomocí mikrobiologické kličky na podložní sklíčko, překryta krycím sklíčkem a vzorek byl vyšetřen pod světelným mikroskopem (Olympus CX22LED).

Sběr a zpracování trusu: Během experimentů byly od potkanů vždy odebrány dva vzorky čerstvého trusu. Jeden byl zpracován pro detekci IgA protilátek pomocí metody ELISA a druhý byl uschován jako rezervní.

Vzorky trusu určené pro detekci IgA protilátek byly vždy váženy na analytických vahách a hmotnost s přesností na čtyři desetinná místa byla zaznamenána pro další ředění. Trus byl smíchán s 1 ml 1 % roztoku Fetálního bovinního séra (FBS) v PBS a odstředěn při 1 100 rcf po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán do nové eppendorfy a zamrazen na -20°C.

Nejdříve bylo potřeba sjednotit váhu všech vzorků trusu. Váha každého vzorku trusu byla přepočtena na násobek vzorku s nejnižší hmotností tak, abychom dosáhli srovnatelné hladiny protilátek u všech vzorků. Každý vzorek byl takto naředěn pomocí 1 % FBS v PBS.

3.2. Optimalizace metody ELISA pro detekci IgA protilátek produkovaných při infekci *Hymenolepis diminuta*

Pro diagnostiku IgA protilátek jsem použila nepřímou metodu ELISA. Protilátky jsme stanovovali ve vzorcích potkaního trusu (viz výše).

3.2.1. Příprava celkového antigenu *Hymenolepis diminuta*

Pro účely detekce specifických IgA protilátek produkovaných při infekci *H. diminuta* bylo zapotřebí zoptimalizovat přípravu celkového antigenu. Zabývali jsme se přípravou celkového antigenu z dospělců a z larvocyst *H. diminuta*.

Příprava antigenu z dospělého: Dospělec *H. diminuta* byl získán při pitvě potkana. Dospělec byl vypreparován z tenkého střeva a přenesen do sterilního PBS se směsí antibiotik a antimykotik [Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA; 10 000 jednotek (Units-U) penicilin, 10 000 U streptomycin a 10 mg amfotericin B; ředěno 100-krát, dle pokynů výrobce] a dále několikrát propláchnut ve sterilním PBS. Celá tkáň tasemnic byla poté sonikována (sonikátor Hielscher UP 200S, jehla S3-microtip 3) při nastavení 0,5 impuls s 20 % amplitudou. Koncentrace proteinů byla změřena pomocí Bradfordovy metody, viz níže.

Příprava antigenu z larvocyst: Pro přípravu celkového antigenu z larvocyst *H. diminuta* byla nutná optimalizace metody pro narušení jejich stěny. Larvocysty získané z tělní dutiny brouků byly přeneseny do sterilního PBS a následně bylo odpočítáno čtyři krát 935 larvocyst, které byly rozbíjeny čtyřmi různými kombinacemi metod. V těchto experimentech jsme porovnávali účinnost různých druhů zmrazování s mechanickým narušením larvocyst za různých podmínek.

Experiment 1: K mechanickému narušení larvocyst byly použity skleněné střepey a 2 zirkonové kuličky v přístroji „mini-bead beater“ (FastPrep®- 24 Instrument). Následovalo rychlé střídání teplot pomocí suchého ledu a termobloku nastaveného na 40°C, a nakonec sonikace za podmínek 0,5 impuls s 20 % amplitudou.

Experiment 2: V tomto experimentu byly opět použity skleněné střepy a 2 zirkonové kuličky v přístroji „mini-bead beater“. Následovalo rychlé střídání teplot, tentokrát za pomoci tekutého dusíku a termobloku nastaveného na 40°C a nakonec opět sonikace za stejných podmínek.

Experiment 3: V tomto případě byla použita třecí miska s tloučkem za přítomnosti Tritonu X, jako detergentu, a nakonec opět sonikace za stejných podmínek.

Experiment 4: V posledním experimentu byla k mechanickému narušení larvocyst použita třecí miska s tloučkem. Následovalo rychlé střídání teplot za pomoci tekutého dusíku a termobloku nastaveného na 40°C a nakonec sonikace za podmínek 0,5 impuls s 20 % amplitudou.

Získaný extrakt byl vždy zakoncentrován na centrifugačních kolonách Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter 10 kDa (Merck Millipore, Massachusetts, USA) dle návodu: odstředění při 14,000 rcf po dobu 15 minut, otočení filtru a odstředění při 1 000 rcf po dobu 2 minut. Výsledná koncentrace proteinů v extraktu byla změřena pomocí Bradfordovy metody a vzorky byly uchovávány při -80°C.

Bradfordova metoda měření koncentrace proteinů: Tato metoda slouží k měření celkové koncentrace proteinů ve vzorku. Je založena na změně zabarvení roztoku barviva Coomasie blue po jeho vazbě na proteiny. Míra modrého zabarvení je pak přímo úměrná koncentraci proteinů a absorbance vzorků je porovnávána s absorbancí standardů tvořících kalibrační křivku.

Příprava Bradfordova činidla - zásobní roztok:

- 50 ml 96 % ethanolu
- 100 ml 85 % H₃PO₄
- 175 ml Coomasie Brilliant blue G 250

Z tohoto roztoku byl připravován pracovní roztok:

- 425 ml destilované H₂O
- 15 ml 96 % ethanolu
- 30 ml H₃PO₄
- 30 ml zásobního roztoku Bradfordova činidla

Nejdříve byla vytvořena kalibrační řada se známou koncentrací proteinu BSA (bovinní sérový albumin) v rozmezí od 2,5-20 µg/ml. Vzorčky se známou koncentrací i testované vzorky byly napipetovány ve stejném množství do mikrotitrační destičky a ke všem vzorkům byl přidán Bradfordův pracovní roztok. Následně byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinitive při vlnové délce 595 nm.

3.2.2. ELISA

V prvním kroku byl na mikrotitrační destičku navázán celkový antigen *H. diminuta* (viz výše) v pufru obsahujícím NaCl + NaHCO₃, pH=9,6; v koncentraci 10 µg/jamku. Poté byla destička uložena do vlhké komůrky na 24 hodin při teplotě 4°C. Poté byla destička vysušena, antigen v jamkách byl fixován aceton-methanolovým pufrem (1:1) po dobu 10 minut a poté byl použit tzv. blokovací pufr (10 % FBS v PBS) pro vyblokování nespecifických vazeb (1 hodinu při teplotě 37°C ve vlhké komůrce). Následně byly jamky promyty promývacím pufrem (0,05 % Tween 20 v PBS) a byl přidán extrakt z trusu (viz výše). Vše bylo inkubováno při 37°C po dobu jedné hodiny ve vlhké komůrce a promyto promývacím pufrem (0,05 % Tween 20/PBS) pro odstranění nenařezaných protilátek. Poté byla do jamek přidána naředěná sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou (secondary anti-rat IgA antibody – peroxidase; ředění 1:2 000) a vše bylo inkubováno po dobu jedné hodiny při 37°C ve vlhké komůrce. Po posledním promytí byla vyvolána reakce přidáním substrátového pufru (0,1 M fosfocitrátový pufr, pH=5,5) a za tři minuty byla zastavena přidáním 2 M kyseliny sírové. Signál byl vyhodnocen změřením absorbance na spektrofotometru Tecan Infinitive při vlnové délce 490 nm.

3.3. Design experimentů při sledování fluktuace IgA protilátek

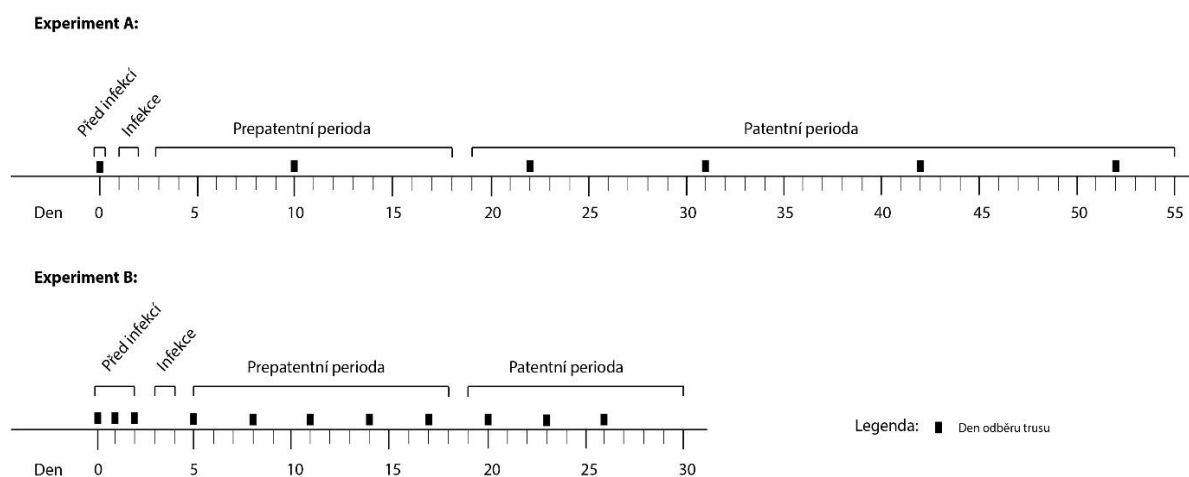
Po optimalizaci metody ELISA jsme připravili dva experimenty pro sledování fluktuace IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů. V experimentu A jsme zjišťovali, zda dochází ke změnám v produkci IgA protilátek během infekce *H. diminuta*. Na to navazoval experiment B, kde jsme se snažili zjistit zlomový den nárůstu protilátek a přesněji mapovali nárůst IgA protilátek v trusu potkanů infikovaných *H. diminuta* během prepatentní a patentní periody.

3.3.1. Experiment A

Byly použity dvě skupiny potkanů a to experimentální (infikovaní *H. diminuta*) a kontrolní (neinfikovaní) po čtyřech zvířatech. Vzorky trusu byly odebírány v období před infekcí, v prepatentní a v patentní periodě. Během tohoto experimentu jsme zároveň otestovali oba typy celkového antigenu *H. diminuta* (izolovaného z dospělého a z larvocyst). Dny odběru jsou znázorněny na Obrázku 8.

3.3.2. Experiment B

Pro účely tohoto experimentu byla opět vytvořena experimentální (infikovaná *H. diminuta*) a kontrolní (neinfikovaná) skupina potkanů po pěti zvířatech. Bylo sledováno období před infekcí, v prepatentní a v patentní periodě a trus byl odebírán v pravidelných intervalech třech dnů. Dny odběru jsou znázorněny na Obrázku 8.



Obr. 8. Grafické znázornění experimentu A a experimentu B, kde jsou vyznačena období vývoje *H. diminuta* v experimentálních potkanech a přesně zaznamenány dny odběru vzorků trusu od všech potkanů.

3.4. Zpracování dat

Získaná data byla dále zpracována v programu STATISTICA 12 a graficky znázorněna v programu SigmaPlot 13.0.

3.4.1. STATISTICA 12

Data byla zlogaritmována a podrobena t-testu s parametry nezávislých skupin (experimentální a kontrolní skupina). Hladiny významnosti byly rozděleny do tří skupin označených různým počtem hvězdiček: (*) $0,01 \leq p < 0,05$; (**) $0,001 < p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

3.4.2. SigmaPlot 13

Výsledná data, směrodatné odchylky a hladiny významnosti byly dále graficky znázorněny sloupcovým grafem.

4. VÝSLEDKY

4.1. Zavedení kultury *Hymenolepis diminuta*

Kulturu tasemnice *H. diminuta* v laboratorních podmínkách se nám podařilo zavést dle schématu jejího přirozeného vývojového cyklu. Zde bylo nezbytné zoptimalizovat teplotu pro odchov potemníků. Postupnou úpravou teploty na 28°C jsme docílili vývinu infekceschopných larvocyst za tři týdny po infekci potemníků.

Dále jsme optimalizovali přípravu, množství a způsob podání larvocyst v infekčních dávkách pro potkany. Infekce byla 100 % úspěšná po aplikaci infekčních dávek obsahujících cca 15 larvocyst dva po sobě jdoucí dny.

4.2. Optimalizace získávání celkového antigenu *Hymenolepis diminuta* pro účely nepřímé metody ELISA

Antigen jsme připravovali z dospělé tasemnice a z larvocyst *H. diminuta*.

4.2.1. Použití antigenu izolovaného z dospělé *Hymenolepis diminuta*

Antigen jsme izolovali z dospělé *H. diminuta* vyjmutého ze střeva infikovaného potkana. Ani po opakovaném provedení metody ELISA nebyl detekován významný rozdíl v množství IgA protilátek mezi infikovanými a kontrolními potkany. Na základě těchto výsledků jsme pokračovali v optimalizaci metody ELISA s použitím celkového antigenu získaného z larvocyst.

4.2.2. Získávání antigenu z larvocyst *Hymenolepis diminuta*

V rámci přípravy celkového antigenu z larvocyst proběhla série experimentů pro stanovení nejefektivnější metody narušení jejich stěny. Pro srovnatelnost metod bylo vždy použito stejné množství larvocyst a po izolaci antigenu změřena koncentrace proteinů ve vzorku. Níže popsané výsledky jsou uváděny dle experimentů 1-4 popsaných v kapitole 3.2.1.

Experiment 1: Výsledná koncentrace proteinů v tomto vzorku byla změřena na 2,8 µg/ 100 µl.

Experiment 2: Výsledná koncentrace proteinů v tomto vzorku byla 3,9 µg/ 100 µl.

Experiment 3: V tomto případě nebylo možno koncentraci proteinů změřit pomocí Bradfordovy metody.

Experiment 4: Výsledná koncentrace proteinů zde byla 5,4 µg/ 100 µl.

Srovnáním výsledných koncentrací celkového proteinu ve vzorcích podrobených výše popsaným experimentům (Tab. 1) jsme došli k závěru, že optimální způsob izolace celkového antigenu z larvocyst (tzn. s nejvyšší koncentrací proteinů) je metoda popsaná jako Experiment 4.

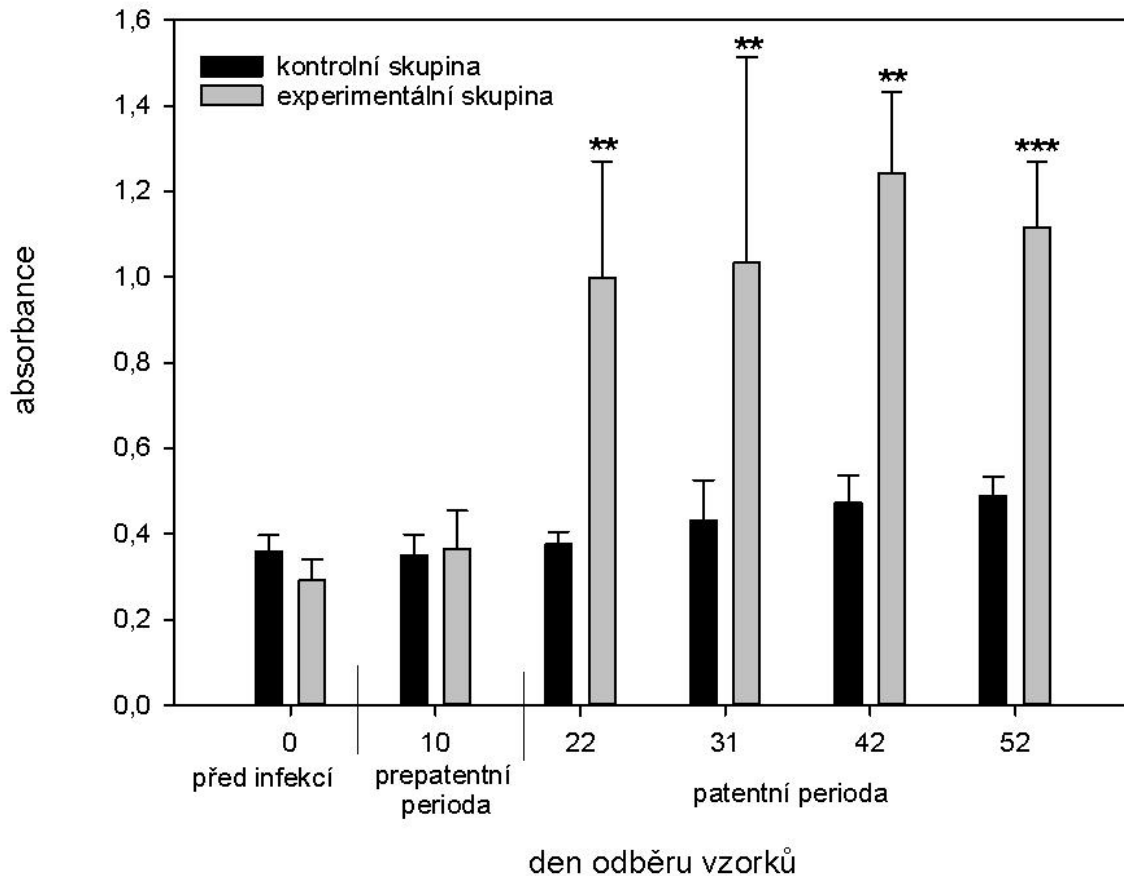
experiment	kombinace metod	koncentrace proteinů
Č. 1.	FastPrep + suchý led/ termostat + sonikátor	2,8 µg/100 µl
Č. 2.	FastPrep + tekutý dusík/ termostat + sonikátor	3,9 µg/100 µl
Č. 3.	detergent + třecí miska + sonikátor	nelze změřit
Č. 4.	třecí miska + tekutý dusík/ termostat + sonikátor	5,4 µg/100 µl

Tabulka 1.: Shrnutí výsledků koncentrace proteinů ve vzorcích po zpracování stejného množství larvocyst v experimentech 1-4 při stanovování nejefektivnější metody pro přípravu celkového antigenu z larvocyst *H. diminuta*.

4.3. Stanovení fluktuace IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů

Izolovaný celkový antigen z larvocyst jsme použili v následujícím experimentu, kde byla sledována fluktuace IgA protilátek v trusu potkanů v průběhu infekce *H. diminuta*.

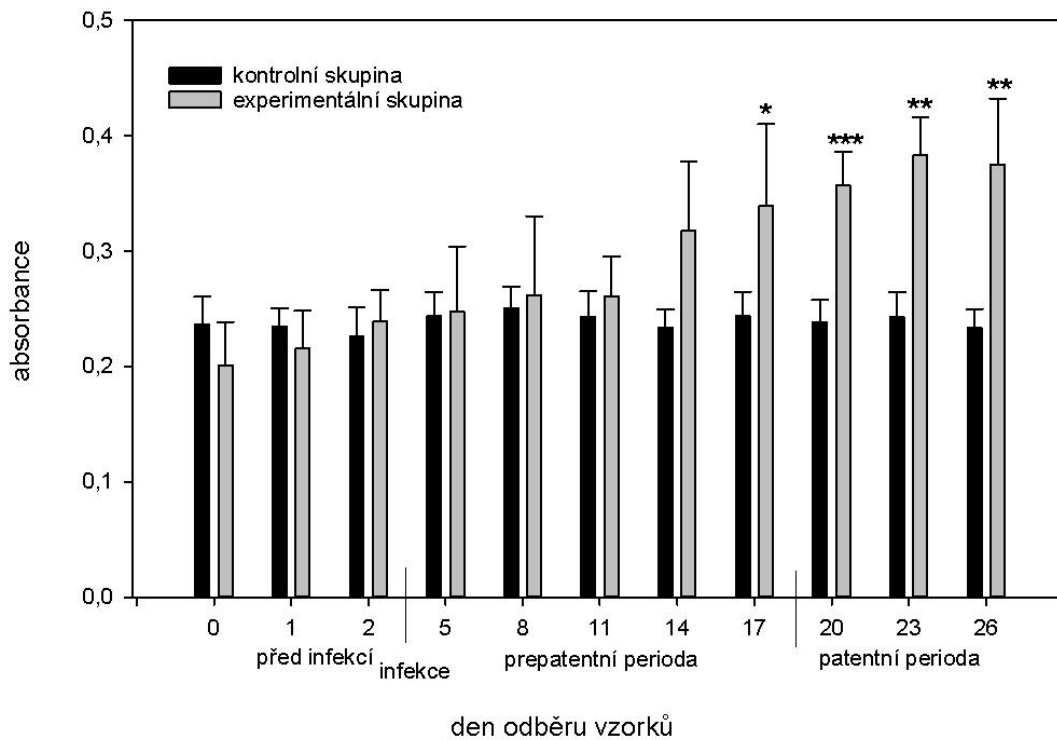
Experiment A: Zjistili jsme, že koncentrace IgA protilátek v trusu infikovaných potkanů je během patentní periody výrazně vyšší než v prepatentní periodě a navíc, že je toto množství během patentní periody minimálně dvojnásobné ve srovnání s potkany kontrolními (Obr. 9). Tyto rozdíly mezi infikovanými a kontrolními zvířaty byly podrobeny t-testu a jejich statistická významnost se prokázala ve dnech 22 ($p=0,001187$), 31 ($p=0,009518$), 42 ($p=0,000182$) a 52 ($p=0,000086$).



Obr. 9. Fluktuace IgA protilátek v trusu potkanů infikovaných *Hymenolepis diminuta*. Střední hodnota absorbance u potkanů infikovaných *H. diminuta* (šedé sloupce) a kontrolních potkanů (černé sloupce). Vzorky byly odebírány před infekcí, v prepatentní a v patentní periodě. Směrodatné odchylky představují 95 % interval spolehlivosti středních hodnot každé skupiny potkanů pro daný den. Hvězdička představuje hladinu významnosti hladinu t-testu provedenou pro každý den odběru. (*) $0,01 \leq p < 0,05$; (**) $0,001 < p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Experiment B: Z Obrázku 10 je patrné, že hladina IgA protilátek se mezi experimentálními a kontrolními potkany významně liší. Zjistili jsme, že koncentrace IgA protilátek v trusu infikovaných potkanů se začíná významněji navyšovat již na konci prepatentní periody na rozdíl od skupiny kontrolní. Rozdíly mezi oběma skupinami byly podrobeny t-testu. Již ke konci prepatentní periody dochází 14. den k hraniční významnosti ($p=0,055787$) a 17. den již k prokazatelně statisticky významnému nárůstu ($p=0,024999$). V

patentní periodě pak dochází k dalšímu nárůstu na vysoké až velmi vysoké hladině významnosti ve dnech 20 ($p=0,000079$), 23 ($p=0,000179$) a 26 ($p=0,003859$).



Obr. 10. Stanovení počátku období nárůstu IgA protilátek v trusu potkanů infikovaných *H. diminuta*. Střední hodnota absorbance u potkanů infikovaných *H. diminuta* (šedé sloupce) a kontrolních potkanů (černé sloupce). Vzorky byly odebírány před infekcí, v prepatentní a v patentní periodě. Chybové úsečky představují 95 % interval spolehlivosti středních hodnot každé skupiny potkanů pro daný den. Hvězdička představuje hladinu významnosti t-testu provedenou pro každý den odběru. (*) $0,01 \leq p < 0,05$; (**) $0,001 < p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

5. DISKUSE

Kulturu tasemnice *Hymenolepis diminuta* v laboratorních podmínkách jsme zavedli dle schématu jejího přirozeného vývojového cyklu (Arai, 1980). Principem kultivace je úspěšná infekce živých hostitelů tasemnicí a její udržení v laboratorních podmínkách. Vzhledem k tomu, že *H. diminuta* má nepřímý životní cyklus, bylo nezbytné zavést chov mezihostitele, potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Tento chov jsme upravili tak, abychom získali infekce schopné larvocysty tři týdny po infekci potemníků.

V první řadě bylo nutné upravit teplotní podmínky v teráriu potemníků, a to na 28-30°C (Andreassen *et al.*, 1999; Dixon & Arai, 1991; Makki *et al.*, 2011). Toho jsme dosáhli umístěním žárovky ovládané termostatem do horní části terária. Dalším krokem byla optimalizace metody infekce brouků, a to vajíčky vylučovanými s trusem infekčních potkanů. Ve studii Dhakal *et al.*, (2015) popisují filtraci vajíček z trusu infikovaných potkanů a následné podání broukům. My jsme metodu zjednodušili tím, že jsme použili přímo trus, a ne pouze odfiltrovaná vajíčka tasemnice *H. diminuta*. Trus byl rozmíchán ve vodě do podoby homogenní hmoty, která se broukům podávala každý den, a to po dobu pěti dnů. V práci Makki *et al.*, (2011) infikovali brouky tak, že je krmili trusem infikovaných potkanů smíchaným s moukou. Při pitvě pak získali v průměru 10 larvocyst na jednoho brouka. My jsme trus rozmíchávali s vodou, nedocházelo nám tedy k vysychání vajíček a při pitvě jsme pak získávali 0 až přibližně 300 larvocyst na brouka, v průměru přibližně 150 larvocyst na brouka. Námi používaná metoda se tedy ukázala jako účinnější.

Dalším krokem bylo zavedení chovu definitivního hostitele *H. diminuta*. Jako definitivního hostitele pro *H. diminuta* v laboratoři jsme zvolili laboratorního potkana, u kterého je infekce *H. diminuta* celoživotní a díky tomu také dlouhodobě udržitelná v laboratoři. Na základě těchto znalostí jsme ustanovili chov rezervoárových potkanů stabilně infikovaných *H. diminuta* a nepřetržitě produkujících infekční vajíčka. Průměrná délka života potkana se pohybuje okolo dvou až tří let, pak jsou nahrazováni mladšími jedinci (http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html).

Jiným v laboratoři často používaným definitivním hostitelem *H. diminuta* je laboratorní myš (nejčastěji *Mus musculus*). Nicméně myš není původním definitivním

hostitelem *H. diminuta*, nejspíš pouze náhodným, a tak dochází k vyloučení vývojových stádií mezi 8.-14. dnem po infekci hostitele, tj. v prepatentní periodě infekce (Hopkins *et al.*, 1972a). Udržení *H. diminuta* v laboratorní myši je možné po podání imunopresiv (Hopkins *et al.*, 1972b). Z tohoto důvodu je laboratorní myš pro naše účely jako definitivní hostitel nevhodná.

Potkany jsme infikovali larvocystami získanými z infikovaných brouků tak, že každá infekční dávka obsahovala 10-15 larvocyst získaných tři týdny po infekci brouků, tudíž již infekce-schopných. Ve studii Andreassen *et al.* (1999) zjišťovali výsledný počet tasemnic ve střevě potkana po infekci různým počtem larvocyst. Výsledek byl ten, že ať už provedli infekci 20 nebo 100 larvocystami, výsledný počet dospělců *H. diminuta* ve střevě potkana byl vždy menší než 10 kusů. Ve výše uvedené studii také autoři naznačují, že je tomu tak z důvodu prostorových a nutričních možností střeva potkana. Obvykle se ve střevě potkanů nachází okolo tří až pěti jedinců, a to jak na základě našich pozorování, tak i dle dostupné literatury (Arai, 1980; Webb *et al.*, 2007).

Infekce potkanů larvocystami jsme prováděli dva dny za sebou, a to s využitím jícnových sond. Tyto byly zavedeny přes ústní dutinu potkanů do jícnu a poté injekční stříkačkou aplikovány larvocysty v PBS pufru. Tímto způsobem jsme si mohli být jisti, že potkani byli infikováni. V jiných studiích byla potkanům odebrána potrava na dobu 24 hodin, načež byli infikováni prostřednictvím okurky s aplikovanými larvocystami (Andreassen *et al.*, 1999; Makki *et al.*, 2011). Zde dosahovali úspěšnosti infekce 100 %, nicméně experiment byl proveden na malém vzorku zvířat (tj. šest potkanů). V naší laboratoři jsme infikovali již mnoho desítek potkanů pomocí jícnové sondy, s níž dosahujeme 100 % úspěšnosti infekcí.

Druhým cílem této práce byla optimalizace metody ELISA pro detekci IgA protilátek specifických proti infekci *H. diminuta* v trusu laboratorních potkanů. Byly provedeny dva experimenty, jejichž cílem byla optimalizace přípravy antigenu.

Sběr trusu, který jsme prováděli během prvního experimentu, byl součástí komplexní studie v naší laboratoři, kde jsme sledovali vliv *H. diminuta* na organismus definitivního hostitele, a to na jeho imunitní systém a střevní mikroflóru (Parfrey *et al.*, 2017). Druhý experiment navazoval na výsledky prvního experimentu s cílem sledovat produkci IgA protilátek podrobněji.

V prvním kroku optimalizace nepřímé metody ELISA bylo nutné zoptimalizovat přípravu antigenu z tasemnice *H. diminuta*. Na základě informací z literatury jsme připravili celkový antigen z dospělce tasemnice *H. diminuta* (Johnston *et al.*, 2010), kterou jsme získali ze střeva infikovaného potkana. Nicméně při stanovení hladiny IgA protilátek v trusu infikovaných a neinfikovaných potkanů s použitím tohoto antigenu byly výsledky metody ELISA nejasné a to opakovaně (podrobnější informace viz dále). Antigen získaný z dospělce tedy nebylo možné pro naše účely využít.

Na základě informací dostupných z literatury jsme zjistili, že larvocysty a dospělci *H. diminuta* mají srovnatelné antigenní složení využitelné pro sérologické metody (Ito & Onitake, 1987). V průběhu následujících experimentů, kdy jsme optimalizovali přípravu celkového antigenu z larvocyst, jsme zjistili, že jsou to vysoce mechanicky odolná stádia, u kterých se velmi obtížně narušuje jejich stěna. Proto jsme hledali metody, které by jejich stěnu narušily co nejúčinněji.

V první fázi experimentů jsme k mechanickému narušení stěny larvocyst použili přístroj „mini-bead beater“, kde jsme larvocysty rozbíjeli pomocí skleněných střepů a zirkonových kuliček. Efektivnějším způsobem mechanického narušení stěny larvocyst se však ukázalo použití třecí misky s tloučkem. Stádia larvocyst *H. diminuta* jsou také velmi lepkavá, proto jsme testovali efekt přidání detergentu (Triton X) do třecí misky. Při měření koncentrace proteinů jsme však zjistili, že vyšší koncentrace detergentu interaguje s Coomassie Brilliant blue G 250, která je součástí roztoku při použití Bradfordovy metody, a proto nebylo možné koncentraci proteinů pomocí Bradfordovy metody změřit. Do výsledného protokolu jsme tedy použití detergentu nezařadili. V další fázi rozrušování stěny larvocyst jsme přistoupili ke střídání teplot. Srovnávali jsme efekt okamžitého zmrazení larvocyst pomocí suchého ledu oproti tekutému dusíku. Po změření koncentrace proteinů v obou vzorcích jsme zjistili vyšší efektivitu při použití tekutého dusíku. Vhodným posledním krokem při narušování stěny larvocyst *H. diminuta* se ukázala být sonikace za podmínek 0,5 impulsů s 20 % amplitudou.

Ve výsledném protokolu přípravy celkového antigenu larvocyst *H. diminuta* jsme tedy použili mechanické rozrušení larvocyst ve třecí misce, následné střídání zamrazení v tekutém dusíku se zahřátím v termobloku a nakonec sonikací. Tato kombinace se ukázala jako

nejvhodnější pro získání nejvyšší koncentrace celkového antigenu z larvocyst *H. diminuta*. Tento antigen jsme použili pro detekci specifických IgA protilátek přítomných v trusu potkanů infikovaných *H. diminuta* pomocí metody ELISA.

Produkce a fluktuace IgA protilátek při infekci byla detekována ve dvou po sobě následujících experimentech. V Experimentu A (viz Obr. 8, kapitola 3.3.1.) jsme zjišťovali, zda dochází ke změnám produkce IgA protilátek v trusu potkanů během infekce *H. diminuta* a to v prepatentní a patentní periodě. V Experimentu B (viz Obr. 8, kapitola 3.3.2.) jsme pak již vycházeli ze znalostí z předchozího experimentu a sledovali jsme podrobněji počátek infekce, prepatentní periodu a přechod mezi prepatentní a patentní periodou s odběry v kratších časových intervalech (tři dny).

V Experimentu A byli potkani rozděleni do dvou skupin po čtyřech zvířatech, a to na experimentální (infikované *H. diminuta*) a kontrolní (bez infekce). Vzorky trusu byly odebrány jedenkrát před infekcí, jedenkrát v prepatentní periodě a čtyřikrát během patentní periody. Po provedení metody ELISA s použitím antigenu izolovaného z dospělého *H. diminuta* nebyl průkazný rozdíl v množství IgA protilátek mezi infikovanými a kontrolními zvířaty, a to ani v prepatentní, ani v patentní periodě, tudíž jsme tento antigen zhodnotili pro účely metody ELISA jako nevhodný (tyto výsledky nebyly použity). Předpokládáme, že tomu tak bylo, protože antigen obsahoval reziduální množství střevních bakterií potkana. I přes oplachování tasemnice sterilním PBS s příměsí širokospektrých antibiotik jsme nezabránili zjevné kontaminaci bakteriálním proteinem. Tyto bakterie zřejmě není možné odstranit ani důkladným promýváním dospělců v různých roztocích, a to i antibiotik. Je totiž popisováno, že komenzální bakterie u tasemnic jsou přítomny mezi jednotlivými proglotidami (Macpherson & Harris, 2004).

Na základě výše popsaných výsledků jsme se rozhodli připravit antigen z larvocyst izolovaných z tělní dutiny potměnků, a tak zabránit kontaminaci celkového antigenu *H. diminuta* určeného pro metodu ELISA antigeny bakterií ze střev potkanů. Po provedení metody ELISA s použitím antigenu z larvocyst *H. diminuta* jsme zjistili, že koncentrace IgA protilátek v trusu infikovaných a kontrolních potkanů se významně liší. Navíc se tyto hodnoty liší i mezi prepatentní a patentní periodou, přesněji v patentní periodě dochází k radikálnímu nárůstu IgA protilátek oproti prepatentní periodě (Obr. 9). Nakonec nás

zajímalo, ve kterém období infekce k nárůstu IgA protilátek v trusu dochází. To bylo cílem následujícího experimentu (Experiment B). Zde jsme detekovali IgA protilátky několik dní před infekcí, v prepatentní a patentní periodě. Použili jsme k tomuto účelu dvě skupiny potkanů po pěti zvířatech, a to opět experimentální (infikovanou *H. diminuta*) a kontrolní (bez infekce). Odběry trusu jsme prováděli pravidelně po třech dnech. Zjistili jsme, že k nárůstu koncentrace IgA protilátek dochází postupně již během prepatentní periody a tato koncentrace protilátek dále vzrůstá i v patentní periodě (Obr. 10).

Na základě těchto výsledků je zřejmé, že *H. diminuta* stimuluje slizniční imunitu střeva hostitele, a tím má imunomodulační účinek na hostitele. Dále, že larvocysty jsou vhodným materiálem pro izolaci celkového antigenu *H. diminuta* a jeho použití v detekci IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů pomocí metody ELISA. Studie sledující fluktuaci IgA protilátek v trusu potkanů infikovaných *H. diminuta* nebyla dle našich informací publikována. Nicméně, studie Gomez-Priego *et al.* (1991) popisuje nárůst humorální imunitní odpovědi po infekci *Hymenolepis nana* detekovaný ze séra infikovaných myší. Další studie Andreassen *et al.* (1999) prokázala čtyři hlavní třídy imunoglobulinů (IgA, IgE, IgG a IgM) v séru myší infikovaných *H. diminuta*. Střevní slizniční imunita zřejmě hraje významnou roli v imunitní odezvě hostitele na infekci *H. diminuta* a zároveň bude jedním z hlavních mechanismů pro vývoj helmintoterapie (např. Reyes *et al.*, 2016). Celkovou imunitní odpověď na infekci *H. diminuta* v modelu myším i potkaním shrnuje McKay (2010). V posledních letech se k detekci a studiím imunitní odpovědi na *H. diminuta* používá spektrum interleukinů (např. Lopes *et al.*, 2015; Reyes *et al.*, 2016).

6. ZÁVĚR

Prvním cílem mé práce bylo ustanovení kultury *Hymenolepis diminuta* v laboratorních podmínkách. Tuto kulturu se nám podařilo zavést a dlouhodobě udržet za pomoci znalostí o jejím přirozeném životním cyklu s využitím mezihostitele (potemníci) a definitivního hostitele (potkani). Abychom byli schopni získat infekce schopná larvální stádia tři týdny po infekci potemníků, byla nutná optimalizace teploty chovu infikovaných potemníků.

Druhým cílem této práce byla optimalizace nepřímé metody ELISA pro detekci IgA protilátek v trusu laboratorních potkanů. Po důkladné optimalizaci přípravy celkového antigenu *H. diminuta* se nám podařilo úspěšně detekovat změny v produkci IgA protilátek v trusu potkanů, a to za použití antigenu z larvocyst *H. diminuta*.

Třetím cílem bylo sledování fluktuace IgA protilátek v prepatentní i patentní periodě potkanů infikovaných *H. diminuta*. Zjistili jsme, že hladina IgA protilátek je u potkanů infikovaných *H. diminuta* výrazně vyšší než u potkanů kontrolních. K tomuto nárůstu dochází postupně během již během prepatentní periody.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H. and Pillai, S.** (2014). *Cellular and Molecular Immunology E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Allen, J. E. and Wynn, T. A.** (2011). Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog*, **7**. doi: 10.1371/journal.ppat.1002003.
- Andreassen, J., Bennet-Jenkins, E. M. and Bryant, C.** (1999). Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*, Vol 42, **42**, 223-275. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60150-5.
- Arai, H.** (1980). *Biology of the Tapeworm Hymenolepis Diminuta*, Elsevier Science.
- Armelagos, G. J., Brown, P. J. and Turner, B.** (2005). Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. *Social Science & Medicine*, **61**, 755-765.
- Beer, R. J.** (1976). The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. *Research in Veterinary Science*, **20**, 47-54.
- Bundy, D. A. P. and Medley, G. F.** (1992). Immuno-epidemiology of human geohelminthiasis: ecological and immunological determinants of worm burden. *Parasitology*, **104**, S105-S119.
- Croese, J., O'neil, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W. and Pritchard, D.** (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*, **55**. doi: 10.1136/gut.2005.079129.
- Daveson, A. J., Jones, D. M., Gaze, S., McSorley, H., Clouston, A. and Pascoe, A.** (2011). Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease , a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One*, **6**. doi: 10.1371/journal.pone.0017366.
- Dhakal, S., Meyling, N. V., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Fryganas, C., Kapel, C. M. O. and Fredensborg, B. L.** (2015). Efficacy of condensed tannins against larval *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in vitro and in the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera) in vivo. *Veterinary Parasitology*, **207**, 49-55. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.11.006.
- Dixon, B. R. and Arai, H. P.** (1991). Anthelmintic-induced destrobilation and its influence on calculated drug efficacy in *Hymenolepis diminuta* infections in rats. *The Journal of parasitology*, 769-774.
- Elliott, D. E. and Weinstock, J. V.** (2012). Helminth–host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1247**, 83-96.
- Feary, J., Venn, A., Brown, A., Hooi, D., Falcone, F. H. and Mortimer, K.** (2009). Safety of hookworm infection in individuals with measurable airway responsiveness: a randomized placebo-controlled feasibility study. *Clin Exp Allergy*, **39**. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03187.x.
- Fleming, J. O. and Weinstock, J. V.** (2015). Clinical trials of helminth therapy in autoimmune diseases: rationale and findings. *Parasite immunology*, **37**, 277-292.
- Gomez-Priego, A., Godinez-Hana, A. L. and Gutierrez-Quiroz, M.** (1991). Detection of serum antibodies in human *Hymenolepis* infection by enzyme immunoassay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 645-647.

- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. and Kestens, L.** (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, **368**, 1106-1118.
- Helmby, H.** (2015). Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunology*, **16**, 12. doi: 10.1186/s12865-015-0074-3.
- Hoeppli, R.** (1956). The knowledge of parasites and parasitic infections from ancient times to the 17th century. *Experimental Parasitology*, **5**, 398-419.
- Hopkins, C. A., Subramanian, G. and Stallard, H.** (1972a). The development of *Hymenolepis diminuta* in primary and secondary infections in mice. *Parasitology*, **64**, 401-412.
- Hopkins, C. A., Subramanian, G. and Stallard, H.** (1972b). The effect of immunosuppressants on the development of *Hymenolepis diminuta* in mice. *Parasitology*, **65**, 111-120.
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F. and Osborne, L. C.** (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, **351**, 1329-1333.
- Hunter, M. M., Wang, A., Hirota, C. L. and McKay, D. M.** (2005). Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *The Journal of Immunology*, **174**, 7368-7375.
- Ito, A. and Onitake, K.** (1987). Change in surface-antigens of *Hymenolepis nana* during differentiation and maturation in mice. *Journal of Helminthology*, **61**, 129-136.
- Johnston, M. J. G., Wang, A., Catarino, M. E. D., Ball, L., Phan, V. C., MacDonald, J. A. and McKay, D. M.** (2010). Extracts of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, suppress macrophage activation in vitro and alleviate chemically induced colitis in mice. *Infection and Immunity*, **78**, 1364-1375. doi: 10.1128/iai.01349-08.
- Jurášek, V. and Dubinský, P.** (1993). *Veterinárná parazitológia, Příroda*, as.
- Jíra, J.** (1998). *Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci*, Galén.
- Kalaivani, R., Nandhini, L. and Seetha, K. S.** (2014). *Hymenolepis diminuta* infection in a school-going child: A rare case report. *The Australasian medical journal*, **7**, 379.
- Lamb, T.** (2012). *Immunity to parasitic infection*, John Wiley & Sons.
- Lopes, F., Reyes, J. L., Wang, A., Leung, G. and McKay, D. M.** (2015). Enteric epithelial cells support growth of *Hymenolepis diminuta* in vitro and trigger TH2-promoting events in a species-specific manner. *International journal for parasitology*, **45**, 691-696.
- Lukas, Z., Dráberová, E., Feit, J. and Vojtesek, B.** (1997). *Imunohistochemické metody v biologii av biotické diagnostice*, Masarykova Univ Brno.
- Lukeš, J., Kuchta, R., Scholz, T. and Pomajbíková, K.** (2014). (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in parasitology*, **30**, 377-385.
- Macpherson, A. J. and Harris, N. L.** (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **4**, 478-485.
- Makki, M. S., Shahbazi, F., Teimoori, S., Rokni, M. B., Abaei, M. R., Mobedi, I., Hassanpour, G. and Mowlavi, G.** (2011). Establishment of *Hymenolepis diminuta* life cycle to provide parasite mass production. *Iranian Journal of Parasitology*, **6**, 60-63.
- McGhee, J. R. and Fujihashi, K.** (2012). Inside the mucosal immune system. *PLoS biology*, **10**, e1001397.

- McKay, D. M.** (2010). The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, **137**, 385-394. doi: 10.1017/s0031182009990886.
- McSorley, H. J., Gaze, S., Daveson, J., Jones, D., Anderson, R. P. and Clouston, A.** (2011). Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. *PLoS One*, **6**. doi: 10.1371/journal.pone.0024092.
- McSorley, H. J. and Maizels, R. M.** (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical microbiology reviews*, **25**, 585-608.
- Murphy, K. and Weaver, C.** (2016). *Janeway's immunobiology*, Garland Science.
- Nkouawa, A., Haukisalmi, V., Li, T., Nakao, M., Lavikainen, A., Chen, X., Henttonen, H. and Ito, A.** (2016). Cryptic diversity in hymenolepidid tapeworms infecting humans. *Parasitology international*, **65**, 83-86.
- Parfrey, L. W., Jirků, M., Šíma, R., Jalovecká, M., Sak, B., Grigore, K. and Pomajbíková, K. J.** (2017). A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system. *PLoS one*, **12**, e0182205.
- Reyes, J. L., Fernando, M. R., Lopes, F., Leung, G., Mancini, N. L., Matisz, C. E., Wang, A. and McKay, D. M.** (2016). IL-22 restrains tapeworm-mediated protection against experimental colitis via regulation of IL-25 expression. *PLoS pathogens*, **12**, e1005481.
- Roberts, L., Janovy, J. and Nadler, S.** (2012). *Foundations of Parasitology: Ninth Edition*, McGraw-Hill Higher Education.
- Rook, G. A. W.** (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis. *Clinical & Experimental Immunology*, **160**, 70-79.
- Rook, G. A. W.** (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, **42**, 5-15.
- Rook, G. A. W., Martinelli, R. and Brunet, L. R.** (2003). Innate immune responses to mycobacteria and the downregulation of atopic responses. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **3**, 337-342.
- Rook, G. A. W., Raison, C. L. and Lowry, C. A.** (2014). Microbial 'old friends', immunoregulation and socioeconomic status. *Clinical & Experimental Immunology*, **177**, 1-12.
- Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A. and Lawrence, C. E.** (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and immunity*, **75**, 397-407.
- Sheather, A. L.** (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **36**, 266-275.
- Strachan, D. P.** (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, **299**, 1259.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F. J., Thompson, R. and Weinstock, J. V.** (2005). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, **54**. doi: 10.1136/gut.2004.041749.
- Volf, P. and Horák, P.** (2007). *Paraziti a jejich biologie*, Triton.
- Wang, M., Wu, L., Weng, R., Zheng, W., Wu, Z. and Lv, Z.** (2017). Therapeutic potential of helminths in autoimmune diseases: helminth-derived immune-regulators and immune balance. *Parasitology Research*, 1-10.

- Webb, R. A., Hoque, T. and Dimas, S.** (2007). Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite immunology*, **29**, 11-21.
- Weinstock, J. V.** (2012). Autoimmunity: the worm returns. *Nature*, **491**, 183-185.
- Weinstock, J. V. and Elliott, D. E.** (2013). Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. *International Journal for Parasitology*, **43**, 245-251. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.016>.
- Weinstock, J. V. and Elliott, D. E.** (2014). Helminth infections decrease host susceptibility to immune-mediated diseases. *The Journal of Immunology*, **193**, 3239-3247.
- Wiria, A. E., Djuardi, Y., Supali, T., Sartono, E. and Yazdanbakhsh, M.** (2012). Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe? *Seminars in Immunopathology*, **34**, 889-901. doi: 10.1007/s00281-012-0358-0.
- Wiria, A. E., Wammes, L. J., Hamid, F., Dekkers, O. M., Prasetyani, M. A., May, L., Kaisar, M. M. M., Verweij, J. J., Tamsma, J. T., Partono, F., Sartono, E., Supali, T., Yazdanbakhsh, M. and Smit, J. W. A.** (2013). Relationship between carotid intima media thickness and helminth infections on flores island, Indonesia. *PLOS ONE*, **8**, e54855. doi: 10.1371/journal.pone.0054855.
- Yang, X., Yang, Y., Wang, Y., Zhan, B., Gu, Y., Cheng, Y. and Zhu, X.** (2014). Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms ameliorate DSS-induced colitis in mice. *PLoS One*, **9**, e96454.
- Zaccone, P., Fehérvári, Z., Jones, F. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D. W. and Cooke, A.** (2003). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *European journal of immunology*, **33**, 1439-1449.