

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Sledování imunomodulačních účinků extraktů z helminta
na makrofágové buněčné kultuře**

Diplomová práce

Bc. Lucie Řežábková, DiS.

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2019

Řežábková L. (2019). Sledování imunomodulačních účinků extraktů z helminta na makrofágové buněčné kultuře. [Monitoring of immunomodulatory effects of helminth extracts on macrophage cell culture. Mgr. Thesis, in Czech] – 54 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main aim of the present study was to determine the immunomodulatory effects of extracts obtained from the commensal helminth, *Hymenolepis diminuta*, on *in vitro* rat macrophages. Here, I tested two types of crude extracts derived from various tapeworm`s life stages (larval stages, adults) and excretory/secretory products (ES-products). The *in vitro* inflammatory model was induced by bacterial lipopolysaccharides (LPS) to compare the results with normal state of macrophages. To monitoring immune response, I analysed the relative gene expressions of several cytokines TNF α , IL-10, IL-1 β ; signal transducer and activator of transcription STAT6 as well as IL-17re using by qPCR. The presence of adult extracts caused no obvious immune response of macrophages. The larval extract and ES-products induced an inflammatory response. All three types of compounds derived from *H. diminuta* reduced the inflammation of macrophages influenced by LPS.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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

Ráda bych zde poděkovala především své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D. za věcné rady a připomínky při psaní této diplomové práce, za její ochotu a trpělivost. Taktéž bych chtěla poděkovat svému školiteli specialistovi RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za odborné rady a asistenci při experimentech. Mé díky patří také RNDr. Milanovi Jirků za rady a pomoc při zpracovávání vzorků. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celému týmu Laboratoře parazitární terapie, jmenovitě naší laborantce Bc. Oldřišce Hložkové za asistenci při experimentech a ochotu kdykoli pomoci.

OBSAH

1 Úvod	1
1.1 Helminti	1
1.2 „Biome Depletion“ teorie	2
1.3 Chronická se zánětem spojená onemocnění	2
1.4 Helminto-terapie	3
1.4.1 Imunomodulační mechanismy helmintů	3
1.4.2 Helminto-terapie v praxi.....	3
1.4.3 Tasemnice <i>Hymenolepis diminuta</i>	4
1.4.4 Použití <i>Hymenolepis diminuta</i> v helminto-terapii	6
1.4.5 Použití extraktů a exkrečních/sekrečních produktů získaných z helminta	6
1.5 Makrofágy a helminto-terapie	7
1.5.1 Cytokiny analyzovány v této studii	7
2 Cíle práce	9
3 Materiál a metody	10
3.1 Materiál.....	10
3.2 Kultura tasemnice v laboratorních podmínkách	11
3.2.1 Chov potemníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>)	12
3.2.2 Chov potkana (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
3.2.3 Infikování hostitelů tasemnicí	12
3.3 Příprava hrubých extraktů a exkreční/sekrečních produktů z tasemnice.....	13
3.3.1 Příprava hrubých extraktů z larválních stádií tasemnice (HdL)	13
3.3.2 Příprava hrubého extraktu z dospělé tasemnice (HdA)	14
3.3.3 Příprava ES-produktů z dospělé (HdES)	14
3.3.4 Měření celkové koncentrace proteinů.....	15
3.4 Příprava buněčné kultury	16
3.4.1 Izolace monocytů z kostní dřeně potkana.....	16

3.4.2	Derivace a kultivace makrofágů	17
3.5	Příprava buněk na experiment	17
3.5.1	Sklizeň buněk z kultivačních lahví.....	17
3.5.2	Počítání buněk	18
3.6	Postup práce s buněčnou kulturou	18
3.7	Design experimentů	19
3.7.1	Experiment I	19
3.7.2	Experiment II.....	20
3.7.3	Experiment III.....	21
3.8	Analýza genové exprese vybraných cytokinů.....	22
3.8.1	Izolace RNA	22
3.8.2	Reverzní transkripce	22
3.8.3	Real-time PCR reakce	22
3.9	Statistická analýza dat.....	23
4	Výsledky	24
4.1	Výsledky experimentu I.....	24
4.2	Výsledky experimentu II	25
4.3	Výsledky experimentu III	26
4.3.1	Tumor necrosis factor α	26
4.3.2	Interleukin 10.....	28
4.3.3	Interleukin 1 β	30
4.3.4	STAT protein 6.....	32
4.3.5	Interleukin 17re.....	34
5	Diskuze	37
6	Závěr.....	46
7	Seznam použité literatury.....	47

1 ÚVOD

Chronická zánětlivá onemocnění bývají ve vyspělých zemích diagnostikována stále častěji. Tato početná skupina onemocnění zahrnuje nejrozličnější formy alergií, astma, neuropsychiatrické poruchy, autoimunitních poruchy a mimo jiné i některá autoimunitní střevní onemocnění (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida), která jsou spojována s nedostatečnou interakcí mezi imunitním systémem, střevním lumen a mikrobiomem. Jednou z možných příčin zvýšeného výskytu těchto chronických zánětlivých nemocí je přerušení dlouholetých koevolučních vztahů mezi člověkem a komezálem/parazitem právě vlivem takzvaného moderního způsobu života. Například helminti se během vývoje souběžně s hostitelem stali specialisty na modulaci imunitního systému hostitele, a proto jsou nyní považováni za vhodnou doplňkovou variantu biologické léčby, tzv. helminto-terapie. Existuje totiž možnost, že kolonizace lidského střeva helmintem pomůže imunitnímu systému v boji proti chronickým zánětlivým onemocněním. Novodobé studie potvrzují, že použití jak živého helminta, tak složek získaných z jeho těla, významně ovlivnilo imunitní odpověď.

V této předkládané práci jsme sledovali vliv extraktů tasemnice *Hymenolepis diminuta* a exkrečních/sekrečních produktů (ES-produkty) na *in vitro* modelu (ovlivněný a neovlivněný zánětem). Pro studii jsme zvolili *in vitro* model z monocytů derivovaných makrofágů izolovaných z kostní dřeně potkana, přičemž jednu skupinu buněk makrofágů jsme pro srovnání ovlivnili pro-zánětlivými bakteriálními lipopolysacharidy (LPS). Pro posouzení imunomodulačních účinků jsme analyzovali genovou expresi TNF α , IL-10, IL-1 β , STAT6 a IL-17re pomocí metody qPCR. Touto studií jsme potvrdili, že použité složky z těla tasemnice *H. diminuta* mají modulační vliv na imunitní odezvu potkaních makrofágů a zdá se tedy, že *H. diminuta* bude vhodným kandidátem pro případnou terapii lidí.

1.1 Helminti

Názvem helminti je označována poměrně početná a různorodá skupina jak parazitických, komezálních i volně žijících organismů, jejichž zástupci se liší morfologií, vývojem i rozdílnou adaptací na prostředí. Některé rysy jsou pro ně ale společné – helminti jsou mnohobuněčné bezobratlí živočichové typičtí svým podlouhlým kruhovým nebo plochým bilaterálně souměrným tělem (Roberts et al., 2013).

Ontogenetický vývoj helmintů může zahrnovat jednoho i několik hostitelů. Helminti s vícehostitelským životním cyklem využívají mezihostitele k vývoji larválního stádia a definitivního hostitele pro pohlavní dozrávání a reprodukci (Roberts et al., 2013).

1.2 „Biome Depletion“ teorie

Ve vyspělých zemích byl za poslední desetiletí pozorován prudký pokles prevalence helmintů, což je způsobeno pravděpodobně přechodem k modernímu způsobu života se zvýšenými hygienickými nároky, sanitací, dezinfekcí vody i lékařskými zásahy (např. Rook, 2012; Weinstock, 2012; Parker & Ollerton, 2013; Filyk et al., 2016). S eliminací helmintů byl zároveň v lidské populaci vyspělých zemí zaznamenán rapidní nárůst onemocnění spojených se zánětlivými procesy zahrnující alergie, autoimunitní choroby, neuropsychiatrické poruchy i onemocnění spojená s trávením (např. El-Gabalawy et al., 2010; Molodecky et al., 2012; Pawankar, 2014). Nárůst chronických zánětlivých onemocnění tedy odráží změny ve způsobu života lidí moderních civilizací oproti populaci v rozvojových zemích, kde je kolonizace helminty stále vysoká a zároveň je zde řídká prevalence zánětlivých imunitních poruch (Rook, 2012).

Hygienickou hypotézou se zabýval David Strachan (Strachan, 1989), který jako první vyslovil domněnku, že nedostatečné vystavení infekčním agens v dětském věku může vést k nežádoucímu vývoji imunitního systému s následnými alergickými projevy. Tato myšlenka se dále rozpracovávala, přičemž dnešní pojetí hovoří o přerušení dlouholetých koevolučních vazeb mezi komenzálními organizmy a člověkem vlivem moderního životního stylu, které velkou měrou přispělo k rozvoji imunitně zprostředkovaných onemocnění (Parker, 2014).

1.3 Chronická se zánětem spojená onemocnění

Chronická se zánětem spojená onemocnění jsou charakteristická aktivací pro-zánětlivé (Th1) imunitní odpovědi multifaktoriálního původu. Tato skupina onemocnění zahrnuje například různé formy autoimunitních poruch, alergií, neuropsychiatrických poruch i nespecifických střevních zánětů (Kuek et al., 2007; Bauer & Teixeira, 2018). Nespecifické střevní záněty (Inflammatory Bowel Diseases – IBD) zahrnující Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu

mohou ovlivnit celý gastrointestinální trakt i střevní mukózu a jsou dokonce dávána do souvislosti se vznikem rakoviny tlustého střeva (Kaser et al., 2010).

V případě, že standardní moderní léčba selhává, je možné přistoupit k alternativě, a to biologické léčbě. Na základě výše zmíněných poznatků vznikla tzv. helminto-terapie, relativně nová experimentální biologická léčba, která vychází z teorie, že jedním z hlavních faktorů přispívajících k zánětlivým projevům imunitního systému, může být právě zmiňovaná eradikace helmintů (Weinstock, 2012).

1.4 Helminto-terapie

1.4.1 Imunomodulační mechanizmy helmintů

Aby si helminti zajistili přežití v těle hostitele, byli nuceni odolávat působení hostitelova imunitního systému a přizpůsobovat se mu, a tak si souběžně s evolucí hostitele vyvinuli propracované mechanizmy modulující jeho imunitní odpověď ve svůj prospěch. Právě díky těmto koevolučním procesům se z helmintů stali silní modulátoři hostitelského organismu (např. Bilbo et al., 2011; Rook, 2012; Rook et al., 2014; Girgis et al., 2013; Ditgen et al., 2014; Wammes et al., 2014).

Bylo dokázáno, že jeden z hlavních imunomodulačních faktorů helmintů spočívá v indukci proti-zánětlivé (Th2) imunitní odpovědi v těle hostitele (např. Finlay et al., 2015; Harnett & Harnett, 2017). Tato odpověď je zprostředkována indukcí T a B regulačních buněk, makrofágů a produkcí cytokinů zahrnutých v Th2 imunitní odpovědi, zejména interleukinem 10 (IL-10), IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13 (Girgis et al., 2013; Harnett & Harnett, 2017).

Již mnoho experimentů provedených na zvířecích modelech ukázalo, že použití helminta může vézt ke zmírnění projevů zánětu a také na jejich možnou protektivní schopnost (Fleming & Weinstock, 2015; Helmbly, 2015).

1.4.2 Helminto-terapie v praxi

Principem helminto-terapie je přísně kontrolovaná kolonizace nepatogenním či mírně patogenním červem prováděná za účelem aktivace proti-zánětlivé imunitní odpovědi (Lukeš et al., 2014; Maizels et al., 2018). Testování vlivu helminta nebo složek z jeho těla se provádí v laboratořích především na *in vivo* zvířecím modelu (Sobotková et al., 2019), nicméně již

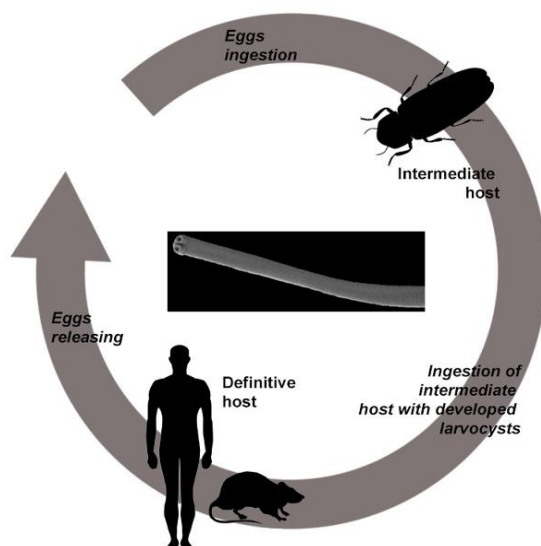
proběhly první klinické studie (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b; Sobotková et al., 2019).

Dokonce se utvořila komunita lidí tzv. „self-treatrů“ čítající dnes již tisíce jedinců trpících různými chronickými a zánětem zprostředkovanými onemocněními, kteří si pořizují infekční stádia červů (vajíčka či larvy) od komerčních firem a užívají je, následně sdílejí poznatky a zkušenosti. I zde byly zaznamenány pozitivní výsledky na široké spektrum onemocnění (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017).

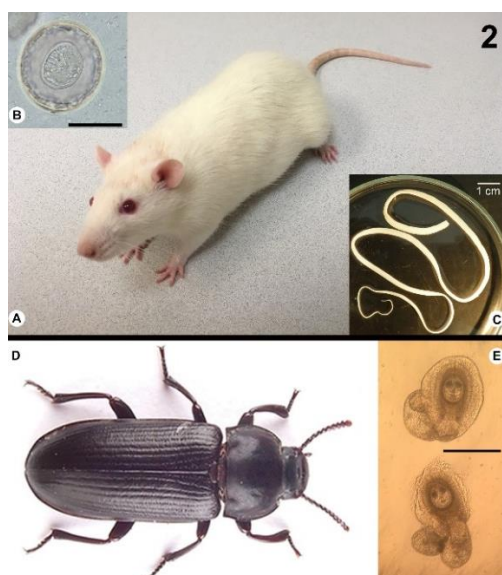
Aktuálně nejvyužívanějšími helminty pro terapeutické účely jsou zástupci kmene nematoda (hlístice), přičemž klinické testy proběhly u dvou druhů hlístů - tenkohlavci prasečím (*Trichuris suis*) a měchovci americkém (*Necator americanus*) (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b; Cheng et al., 2015; Helmbly, 2015). Zřídka byl testován či použit i tenkohlavce lidský (*Trichuris trichiura*) (Sobotková et al., 2019). Zatím jediným zástupcem kmene Cestoda (tasemnice) experimentálně využívaným v rámci helminto-terapie je tasemnice *Hymenolepis diminuta* (McKay, 2010; Smyth et al., 2017; Jirků Pomajbíková et al., 2018).

1.4.3 Tasemnice *Hymenolepis diminuta*

Tasemnice krysí je kosmopolitně rozšířený helmint, jehož životní cyklus zahrnuje výhradně dva hostitele. Obvyklým mezihostitelem bývají brouci čeledi Tenebrionidae (potemníkovití), v jejichž střevě se z požitých vajíček uvolňují onkosféry a v tělní dutině se posléze vyvíjejí v infekce-schopná larvální stádia *H. diminuta* (larvocysty, cysticekoidy). Tyto larvocysty požitím definitivním hostitelem (převážně potkani nebo krysy) putují do jeho střeva, kde se vyvíjí v pohlavně dospělé tasemnice produkující opět infekce schopná vajíčka. Ta jsou z těla definitivního hostitele vyloučena společně s exkrementy do vnějšího prostředí a cyklus se uzavírá požitím takového vajíčka mezihostitelem (Roberts et al., 2013). V ojedinělých případech, a to převážně v tropických a subtropických oblastech, byla *H. diminuta* diagnostikována také u lidí, přičemž projevy infekce byly vesměs asymptomatické (Garcia, 2006). Životní cyklus *H. diminuta* je graficky znázorněn na obrázku 1. Vývojová stádia *H. diminuta* a její hostitelé jsou zobrazeny na obrázku 2.



Obr. 1: Životní cyklus tasemnice *Hymenolepis diminuta* (Řežábková et al., 2019).



Obr. 2: Vývojová stádia tasemnice *Hymenolepis diminuta* udržované v laboratorních podmínkách a její hostitelé. (A) SPF (Specific Pathogen Free) outbrední potkan Wistar – definitivní hostitel; (B) vajíčko s hexakantem; (C) dospělá tasemnice izolovaná z tenkého střeva potkana; (D) *Tenebrio molitor* – mezihostitel; (E) larvocysty *H. diminuta* (Řežábková et al., 2019).

Morfologicky se dospělec *H. diminuta* vyznačuje čtyřmi kruhovými přísavkami na skolexu a krátkým rostelem bez háčků. Její článkovitě členěné tělo dorůstá délky až 90 cm (Hendrix & Robinson, 2012; Roberts et al., 2013). Uvnitř vajíček *H. diminuta*, které dosahují

velikosti až 80 x 85 µm, se nachází larvální stádium (onkosféra se závěsným aparátem, tj. hexakant). Z vajíčka uvolněná onkosféra se v těle meziphostitele vyvíjí v larvocystu, která již obsahuje skolex a disponuje nápadným ocasním přívěskem nazývaným cercomer (Chervy et al., 2002).

1.4.4 Použití *Hymenolepis diminuta* v helminto-terapii

Kromě hlístic (*T. suis*, *N. americanus*) je i *H. diminuta* vhodný kandidát pro použití v helminto-terapii, protože splňuje všechna kritéria definovaná ve studiích Lukeš et al. (2014) a Sobotková et al. (2019). Podstatným faktem je, že její kolonizace hostitelů jsou většinou asymptomatické, zároveň kultivace a produkce může být pod systematickou kontrolou a v neposlední řadě spočívá její výhoda v cenové dostupnosti (Sobotková et al., 2019).

Již po několik let je tasemnice *H. diminuta* laboratorně testována ve snaze pochopit interakce mezi hostitelem a symbiontem (e.g., McKay, 2010; McKenney et al., 2015; Parfrey et al., 2017; Jirků-Pomajbíková et al., 2018; revidováno v Sobotková et al., 2019). Na zvířecích modelech bylo dokázáno, že je *H. diminuta* v některých případech schopna zmírnit projevy zánětu (McKay, 2010; Jirků Pomajbíková et al., 2018). Při sledování vlivu *H. diminuta* na chemicky vyvolanou kolitidu byla prokázána Th2 proti-zánětlivá imunitní odpověď (Reyes et al., 2016; Parfrey et al., 2017; Jirků Pomajbíková et al., 2018). Velmi zajímavým faktem je, že studie Williamson et al. (2016) prokázal pozitivní účinky tasemnice *H. diminuta* na zmírnění neurologických projevů stresu a modelu autismu. Navíc se tento helmint ukázal být vysoce účinný u většiny „self-treatrů“, kteří navíc poukazují na minimální vedlejší účinky (Cheng et al., 2015).

1.4.5 Použití extraktů a exkrečních/sekrečních produktů získaných z helminta

Výsledky studií terapie živým červem prokázaly pozitivní efekt helmintů v helminto-terapii, proto se jiné studie zaměřily na testování vlivu extraktů a ES-produktů z těla helminta (Shepherd et al., 2015; Nascimento Santos et al., 2017; Smallwood et al., 2017; Maizels et al., 2018; revidováno v Sobotková et al., 2019). Zjistilo se, že bioaktivní molekuly obsažené v extraktech nebo ES-produktech helmintů mohou ovlivnit diferenciaci makrofágů, modulovat imunitní odpověď a potlačit sekreci některých pro-zánětlivých cytokinů (Smallwood et al., 2017). Ve snaze odhalit vliv bioaktivních molekul obsažených v extraktech a ES-produktech z helminta na imunitní systém hostitele byla již testována také *H. diminuta*,

a to jak na *in vivo* tak *in vitro* modelu, přičemž tyto výzkumy potvrdily jejich imunomodulační efekt (např. Johnston et al., 2010; Lopes et al., 2015; Zawistowska-Deniziak et al., 2017).

1.5 Makrofágy a helminto-terapie

Makrofágy jsou jedny z nejvýznamnějších buněk imunitního systému a hrají významnou roli jak v celkové, tak lokální imunitní odpovědi proti patogenům. Jsou také zodpovědné za poškození tkáně při zánětlivých procesech (Baillie et al., 2017). Vznikají derivací monocytů vytvořených v kostní dřeni a dozrávají pod vlivem růstového faktoru (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF). V nezralé formě kolují krví do tkání a k místu zánětu, kde se aktivují a stávají se z nich specifické tkáňové makrofágy. V závislosti na aktivátoru se makrofágy polarizují na dva typy: aktivované klasickou cestou (M1) a alternativní cestou (M2) (Orecchioni et al., 2019). Makrofágy M1 jsou aktivovány typicky bakteriálními lipopolisacharydy (LPS) nebo interferonem- γ (INF γ) a produkují cytokiny zahrnuté v pro-zánětlivé Th1 imunitní odpovědi. Oproti tomu M2 makrofágy jsou aktivované prostřednictvím interleukinu 4 (IL-4), 10 (IL-10) nebo 13 (IL-13) a jsou zodpovědné za opravu tkání díky produkci kolagenu. Proto můžeme u makrofágů pozorovat imunitní odpověď dvojího typu – jak pro-zánětlivou, tak proti-zánětlivou (Martinez & Gordon, 2014).

V rámci této studie byly na potkaních makrofázích testovány účinky extraktů ze dvou životních stádií *H. diminuta*, a to z larvocyst (HdL) a z dospělců (HdA). Navíc jsme testovali také vliv ES-produktů (HdES) získaných kultivací dospělce *H. diminuta*.

1.5.1 Cytokiny analyzovány v této studii

Pro sledování vlivu extraktů HdL a HdA a ES-produktů HdES byla analyzována genová exprese cytokinů TNF α (Tumor necrosis factor α), IL-10 (interleukin 10), IL-1 β (interleukin 1 β), transkripčního faktoru STAT6 a exprese receptoru pro interleukin 17C (IL-17re).

Cytokin TNF α produkují různé typy buněk těla, nicméně hlavními producenty jsou makrofágy. Cytokin TNF α je připisována role hlavního pro-zánětlivého cytokinu. Produkce TNF α je spojována s rozvojem např. revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby, diabetu a obezity (Parameswaran & Patial, 2010). Vzhledem k tomu bývá měření exprese TNF α častou volbou při testování imunomodulačních procesů (např. Johnston et al., 2010; Zawistowska-Deniziak et al., 2017; Jirků Pomajbíková et al., 2018).

Interleukin 10 je znám pro svou imunosupresivní a regulační funkci. Na buňkách makrofágů bylo dokázáno, že potlačuje produkci pro-zánětlivých cytokinů (Li et al., 2015), podporuje diferenciaci střevních makrofágů (Shouval et al., 2014; Zigmund et al., 2014) nebo inhibuje prezentaci antigenu u makrofágů potlačením exprese hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC-II, major histocompatibility complex) (De Waal Malefyt, 1991) nebo zajišťuje integritu střevních epitelálních buněk (Quiros et al., 2017).

Interleukin 1 β je zástupcem rodiny IL-1, což je skupina interleukinů s pro-zánětlivou imunitní funkcí (Masters et al., 2009). Hlavními producenty IL-1 β během zánětu jsou monocyty (Madej et al., 2017).

Transkripční faktor STAT6 (signal transducer and activator of transcription protein 6) patří do skupiny transkripčních faktorů a účastní se mimo jiné potlačení odpovědi makrofágů na zánětlivé podněty. Je nezbytný pro přímou transkripční represi genů zahrnutých v polarizaci makrofágů klasickou cestou na M1 (Shaheen & Broxmeyer, 2018).

Interleukin 17 receptor E (IL-17re) je součástí receptoru pro epitelální interleukin-17C (IL-17C), který má funkci zprostředkovatele pro-zánětlivé imunitní reakce. Také bylo potvrzeno, že receptor IL-17re reguluje časnou imunitní odpověď vůči střevním patogenům (Song et al., 2011). Na lidské monocytární linii THP-1 bylo dokázáno, že IL-17C stimuluje uvolnění TNF α a IL-1 β a má tedy pro-zánětlivý účinek (Li et al., 2000).

2 CÍLE PRÁCE

Pro účely této diplomové práce byl vytyčen následující hlavní cíl:

Otestování vlivu účinků exkrečních/sekrečních produktů (ES-produktů) a extraktů získaných z různých životních stádií tasemnice *Hymenolepis diminuta* na *in vitro* buněčné linii makrofágů získaných z potkana.

V rámci hlavního cíle byly vytyčeny tyto čtyři dílčí cíle:

- zvolení vhodného časového bodu u *in vitro* zánětlivého modelu pro analýzy cytokinů;
- zjistit optimální koncentraci extraktů a ES-produktů na protizánětlivý účinek;
- analyzovat genovou expresi buněk ovlivněných extrakty nebo ES-produkty;
- výsledky analýz porovnat s hodnotami genové exprese buněk posléze ovlivněných zánětem;

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

V experimentální části projektu byly použity následující chemikálie a přístrojové vybavení uvedené v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled použitých chemikálií a materiálu.

NÁZEV	VÝROBCE	MÍSTO PŮVODU
CHEMIE		
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	Carl Roth	Karlsruhe, Německo
DNAsa	GeneAll Biotechnology	Soul, Jižní Korea
Dulbeccův PBS (10x)	Biosera	Nuaille, Francie
Etanol 96%, p.a.	Penta	Praha, Česká republika
Edetan disodný dihydrát	Lach-Ner, s.r.o.	Neratovice, Česká republika
FBS (South America), Premium	Biosera	Nuaille, Francie
GMC-SF	PeptoTech	Rocky Hill, New Jersey, USA
Chloroform	Penta	Praha, Česká republika
Kyselina fosforečná 85%	Penta	Praha, Česká republika
LPS O111:B4+	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Penicilin	Biosera	Nuaille, Francie
Protein Standard, 2 mg/vial BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
RPMI – 1640	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Streptomycin	Biosera	Nuaille, Francie
Trypanová modř	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
KITY		
5x Hot FirePol [®] Probe qPCR Mix Plus	Solis Biodyne	Tart, Estonsko
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
Hybrid RNA Kit	GeneAll Biotechnology	Soul, Jižní Korea
SONDY pro qPCR		
B2M TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
IL-1 β TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
IL-10 TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
IL-17re TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
STAT6 TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
TNF α TaqMan gene expression assay for rats	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA

PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ MATERIÁL		
96 Well Cell Culture Plate (F-Type)	SPL LIFE SCIENCES	Pocheon-si, Jižní Korea
Accublock™	Labnet	Edison, USA
Amicon® Stirred cells	Merck	Darmstadt, Německo
Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter 10 kDa	Merck	Darmstadt, Německo
Digitální stereo mikroskop DM143 SERIES	Motic	Hong Kong, Čína
CelCulture® CO ₂ incubator	Esco	Singapur
Centrifuga Eppendorf 5415R	Eppendorf	Hamburk, Německo
Centrifuga HERMLE Z 326 K	HERMLE	Wehingen, Německo
Durapore®PVDF, Filter membranes	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Filtr VWR® Cell Strainers	VWR	Radnor, Pensylvánie, USA
Filtrační aparatura Sartorius	Sartorius	Göttingen, Německo
Laminární box NuAire NU-440-600	NuAire	Plymouth, USA
Laboratorní předvážky	Bel Engineering	Monza, Itálie
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche	Basilej, Švýcarsko
Mikroskop Eclipse Ts2	Nikon	Tokyo, Japonsko
Mikroskop TR 500	VWR	Radnor, Pensylvánie, USA
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Foster City, USA
qPCR 96-well plate for Roche LC480	Kaneka Eurogentec	Seraing, Belgie
Sonikátor UP200S	Hielscher	Teltow, Německo
Spektrofotometr Infinite M200PRO	Tecan	Salzburg, Rakousko
T100™ Thermal Cycler	BIO-RAD Laboratories	Hercules, Kalifornie, USA
Tissue Culture Flasks 75cm ²	Techno Plastic Products AG	Trasadinger, Švýcarsko
Tissue Culture Test Plates 12-well	Techno Plastic Products AG	Trasadinger, Švýcarsko
Ultrafiltration Discs, 10 kDa NMW	Merck	Darmstadt, Německo
Vortex V-1 plus	Biosan	Riga, Lotyšsko

3.2 Kultura tasemnice v laboratorních podmínkách

Tasemnice *Hymenolepis diminuta* byla udržována v laboratorních podmínkách podle optimalizovaných protokolů Laboratoře parazitární terapie (Biologické centrum AV ČR v.v.i., PaŮ, České Budějovice). Její životní cyklus zahrnuje dva hostitele, v našem případě potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) jako mezihostitele a laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) jako hostitele definitivního.

3.2.1 Chov potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Potemníci (dar Entomologického ústavu, Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice) byly chovány v kontrolovaných podmínkách při 28 °C v krytém teráriu se sterilními hoblinami; živeni krmnou směsí, tvrdým pečivem, dále čerstvým ovocem a zeleninou, které zároveň sloužily jako doplňkový zdroj vody; voda podávána ve vatě na Petriho misce. Světelný režim byl nastaven na 12/12 hodin.

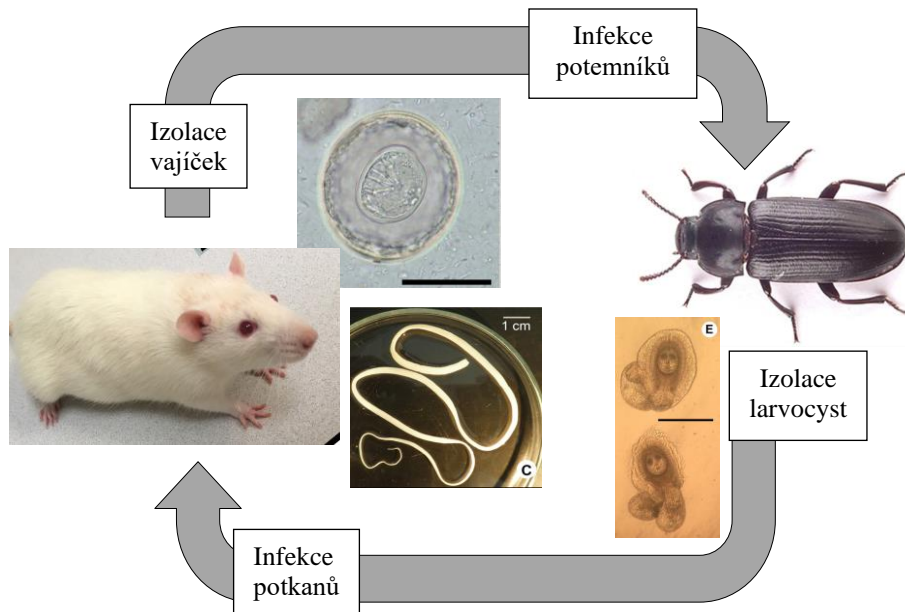
3.2.2 Chov potkana (*Rattus norvegicus*)

Jako definitivní hostitelé byli využíváni outbrední SPF (Specific Pathogen Free) potkani Wistar, odchovaní v Charles River Laboratories (Envigo RMS B.V., Horst, Holandsko) a distribuovaní společností Anlab s.r.o. (Praha, Česká republika). Byli chováni ve standardních podmínkách bariérového chovu akreditovaného zvěřince Parazitologického ústavu v boxech při teplotě 20-24 °C a vzdušné vlhkosti optimální 55 %. Krmeni byli horkovzdušně sterilizovanou granulovanou krmnou směsí *ad libitum*. Denní světelný režim byl nastaven na 12/12 hodin. Experiment na potkanech byl povolen Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Biologického centra AV ČR a Resortní komise Ministerstva Zemědělství (č. schváleného protokolu 33/2018).

3.2.3 Infikování hostitelů tasemnicí

Infekce obou hostitelů pro *H. diminuta* probíhala perorálně. Jako materiál pro infekci potemníků byl použit zředěný čerstvý trus infikovaného potkana obsahující vajíčka *H. diminuta*. Během infekce byli umístěni do malé nádoby a krmeni po dobu pěti dnů plátky okurky nebo jablka pokrytými kašovitou směsí obsahující trus od pozitivního potkana. V těle potemníků se vajíčka *H. diminuta* vyvíjela v infekce schopné larvocysty. Po 21 dnech od infekce byly larvocysty z těla potemníka vypreparovány pod binolupou (DM143), 3× promyty ve sterilním PBS (pH 7,4) a přeneseny po cca 15 kusech (= infekční dávka) do 1,5ml mikrozkuřavky s 200 µl sterilního roztoku PBS. Takto připravené larvocysty byly buď ihned použity k infikování potkanů nebo zamrazeny pro pozdější použití (např. pro přípravu hrubého extraktu).

Vlastní infekce potkanů byla provedena perorálně pomocí jícnové sondy, a to opakovaně dva dny po sobě. Infekce hostitelů *H. diminuta* je znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3: Schéma kultury tasemnice *H. diminuta* v laboratorních podmínkách. Obrázky převzaty z Řežábková L. et al. (2019)

3.3 Příprava hrubých extraktů a exkreční/sekrečních produktů z tasemnice

Pro sledování imunomodulačních účinků tasemnice na *in vitro* buněčné linii byly použity dva typy extraktů *H. diminuta*, a to (i) hrubé extrakty ze dvou životních stádií (z dospělé a larválních stádií) a (ii) její exkreční/sekreční produkty (ES-produkty) získané krátkodobou *in vitro* kultivací dospělé. Příprava těchto složek (i+ii) je popsána v podkapitolách níže. V případě získávání dospělých tasemnic, bylo nezbytné vypreparovat tato stádia přímo ze střeva právě usmrceného potkana. Potkani byli usmrceni cervikální dislokací v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

3.3.1 Příprava hrubých extraktů z larválních stádií tasemnice (HdL)

Larvocysty vypreparované z tělní dutiny potemníků a uchovávané v roztoku PBS, byly přeneseny do třecí misky chlazené na ledu, pečlivě rozetřeny tloučkem, aby došlo k dokonalému mechanickému narušení jejich povrchu. Získaný homogenát byl přenesen pomocí pipety do 1,5ml mikrozkušavek. Pro úplné porušení struktur larvocyst byly zkumavky s homogenátem ponořeny na dvě minuty do tekutého dusíku, poté následovalo rychlé zahřátí na 38 °C na termobloku. Tento proces zmrazování a zahřívání byl opakován 3×

po sobě. Následovala sonikace na ledu po dobu 2 min s použitím jehlové sondy UP200S-S3 (nastaveno na 0,5 impuls s 20% amplitudou) a sonikátoru Hielscher. Směs byla odstředěna při 5300 g při 4 °C po dobu 10 minut (centrifuga 5415R). Vzniklý supernatant s extrakty byl odebrán. Koncentrace extraktů (proteinů) byla stanovena metodou dle Bradforda popsané v kapitole 3.3.4. Z této směsi extraktů v PBS bylo před každým experimentem odebráno potřebné množství (v závislosti na typu experimentu) a zkoncentrováno dle návodu na centrifugačních kolonách Amicon Ultra-0,5 (500 µl extraktu bylo odstřeďováno 15 minut při 14000 g a 4 °C). Do čisté 1,5ml mikrozkušavky byl vložen filtr obsahující koncentrát a znovu odstředěn za stejných podmínek. Poté bylo přidáno RPMI médium a směs byla znovu zkoncentrována. Tento proces přidávání RPMI média a koncentrování byl několikrát opakován s cílem odstranění PBS ze směsi (dokud směs neobsahovala pouze RPMI médium s extrakty). Finálním krokem pro získání proteinu z kolonek bylo odstředění při 1000 g po dobu 2 minut.

3.3.2 Příprava hrubého extraktu z dospělé tasemnice (HdA)

Dospělé tasemnice vyjmuté ze střeva potkana byly 3× důkladně opláchnuty v 50ml roztoku PBS s antibiotiky (ATB) (100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin), přeneseny do 50 ml čistého sterilního PBS a poté několikrát omyty PBS bez ATB. Poté byly zváženy na laboratorních předvážkách a rozděleny po cca 2 g do 15ml zkumavek obsahujících 5 ml sterilního PBS (pH 7,4). Následovala homogenizace na ledu s využitím sonikátoru Hielscher (sonikační jehlová sonda typu S2 s 0,5 impulzem s 20% amplitudou). Homogenát byl odstředěn při 5300 g a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklá interfáze obsahují proteiny (střední fáze mezi sedimentem se zbytky nehomogenizované tkáně a mezi horní tukovou vrstvou) byla pipetou přenesena do čistých mikrozkušavek, bylo k ní přidáno RPMI médium; znovu odstředěno za stejných podmínek, taktéž s cílem odstranění PBS ze směsi. Zkoncentrování hrubého extraktu z dospělé probíhalo stejným postupem jako v případě hrubých extraktů z larvocyst, a to na centrifugačních kolonách Amicon Ultra-0,5.

3.3.3 Příprava ES-produktů z dospělé (HdES)

Tasemnice vyjmuté ze střeva usmrceného potkana byly opakovaně propláchnuty v 50 ml PBS v Petriho misce vyhřívané na 37 °C. Poté byly přeneseny do 80 ml roztoku PBS a RPMI média v poměru 1:1 a znovu opláchnuty. Následovalo vážení tasemnic a přenesení do RPMI média (1 g tasemnice/200 ml média) s obsahem penicilinu v koncentraci 100 U/ml média a streptomycinu v koncentraci 100 µg/ml média. Poté byly kultivovány při 38,8 °C a 5% CO₂

atmosféře v termoboxu Esco CelCulture[®]. Nakonec byly tasemnice z média vyjmuty a uvolněná vajíčka byla odstraněna použitím sítky. Od této chvíle probíhala další manipulace s médiem důsledně na ledu. Médium obsahující ES-produkty bylo filtrováno pomocí aparatury (Sartorius) s filtry Durapore[®] (velikost pórů 0,22 μm). ES-produkty v médiu byly zkoncentrovány přes koncentrační celu Amicon[®] Stirred cells s filtry Ultrafiltration Discs (10 kDa), dle návodu výrobce (Merck). Finální zkoncentrování probíhalo přes centrifugační kolony Amicon Ultra-0,5. Koncentrace byla změřena Bradfordovou metodou popsanou v kap. 3.3.4.

3.3.4 Měření celkové koncentrace proteinů

Pro měření celkové koncentrace proteinů z extraktů a ES-produktů byla použita metoda dle Bradforda:

- nejdříve bylo připraveno Bradfordovo zásobní činidlo:
 - 175 ml Coomasie Brilliant Blue G-250,
 - 50 ml 96% etanol,
 - 100 ml 85% kyselina fosforečná;
- následovala příprava pracovního činidla, kdy na 500 ml roztoku bylo použito:
 - 425 ml destilovaná voda,
 - 15 ml 96% etanol,
 - 30 ml 85% kyselina fosforečná
 - 30 ml Bradfordovo zásobní činidlo;
- do předem připravených 1,5ml mikrozkušavek byl napipetován BSA o známých koncentracích 5, 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ (do každé zkumavky po 10 μl) a do poslední mikrozkušavky byl přenesen náš vzorek o neznámé koncentraci (také 10 μl);
- ke všem vzorkům bylo přidáno 40 μl PBS a 500 μl pracovního činidla;
- roztoky promíchány pomocí vortexu (Biosan);
- do předem popsané mikrotitrační destičky bylo nanášeno vždy po 200 μl všech vzorků;
- absorbance byla měřena spektrofotometrem (Tecan) při 595 nm;
- nakonec byla sestrojena kalibrační křivka (z hodnot roztoků s BSA), z níž byla dopočítána výsledná koncentrace extraktů nebo ES produktů ve vzorku.

3.4 Příprava buněčné kultury

Imunomodulační účinky extraktů a ES-produktů byly sledovány na makrofázích. Makrofágy byly nejdříve izolovány z kostní dřeně usmrčeného laboratorního potkana, a to ve formě monocytů. Poté po dobu devíti dnů maturovaly v makrofágy, které byly schopné imunitní reakce. Veškerá manipulace s buněčnou kulturou probíhala asepticky v laminárním boxu (NuAire) v BSL2 laboratoři.

3.4.1 Izolace monocytů z kostní dřeně potkana

Pro účely experimentu byli využíváni outbrední SPF potkani Wistar (Envigo) dodávaní firmou Anlab s.r.o., jejichž bariérový chov je uveden výše v kapitole 3.2.2. Buňky kostní dřeně byly izolovány následujícím způsobem:

- kosti femur a tibia byly vypreparovány z usmrčeného potkana (potkan byl usmrčen cervikální dislokací v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání);
- kosti očištěné od svaloviny byly vloženy do Petriho misky se sterilním PBS o pokojové teplotě tak, aby byly po celé délce ponořené, a přeneseny do laminárního boxu;
- pro snadný přístup k buňkám kostní dřeně byly z kostí odstříženy koncové části;
- pomocí injekční stříkačky s nasátým sterilním RPMI médiem byly ze všech kostí opakovaně vypláchnuty buňky kostní dřeně do sterilní centrifugační zkumavky;
- směs RPMI média a buněk kostní dřeně byla homogenizována pipetou a sterilně přefiltrována přes VWR® filtr (70 µm, nylon) do 50ml sterilní centrifugační zkumavky;
- následovalo odstředování při 300 g po dobu 5 min při 4 °C (centrifuga Z 326 K);
- vzniklý supernatant byl odstraněn a k sedimentu buněk bylo přidáno 50 ml předem temperovaného RPMI média na 37 °C obohaceného o:
 - 10% fetální hovězí sérum,
 - 1% směs ATB – Penicillin-Streptomycin (výsledné koncentrace: Penicilin G 100 U/ml a Streptomycin 100 µg/ml),
 - kombinace komplexu L-Alanyl-L-Glutamine v koncentraci 0,446 g/l (je součástí základního RPMI média, dodatečně se nepřidává),
 - 0,1% 2-Mercaptoethanol 14,3M (ředěno na 50 mM, výsledná koncentrace 50 µM),
 - růstový faktor GM-CSF (zásobní koncentrace 20 µg/ml, 1000x ředěn do média);

- vzniklá směs byla promíchána pipetou a rozdělena do tří 75ml kultivačních lahví, ty byly uloženy do 37 °C v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou po dobu devíti dnů.

3.4.2 Derivace a kultivace makrofágů

Každých 48 hodin bylo buňkám vyměněno staré médium za čerstvé s totožným složením (viz kapitola 3.4.1). Výměna probíhala následovně:

- buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem (Eclipse Ts2, znětšení 40×), jsou-li přichyceny ke dnu kultivační lahve;
- staré médium bylo ze všech tří kultivačních lahví opatrně vylito;
- do každé lahve bylo opět napipetováno cca 20 ml předem vytemperovaného (37°C) PBS, kterým byly makrofágy opláchnuty, a poté zase vylito;
- bylo připraveno 50 ml čerstvého RPMI média o stejném složení, promícháno;
- do každé kultivační lahve s makrofágy bylo nalito po cca 15 ml čerstvého temperovaného RPMI média;
- lahve byly umístěny zpět do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂ atmosféra).

3.5 Příprava buněk na experiment

Po devíti dnech od izolace monocytů byly makrofágy zkontrolovány. Byl zjištěn počet, stav a pokrytí povrchu a nasazeny na kultivační destičku.

3.5.1 Sklizeň buněk z kultivačních lahví

Před samotnou sklizní byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem. Sklizeň makrofágů probíhala následovně:

- médium bylo z lahví vylito, buňky byly opláchnuty sterilním PBS o teplotě 37 °C;
- roztoku trypsinu (0,02 % trypsinu a 0,02% EDTA v PBS) byl rozmrazen a temperován (37 °C); do každé z lahví byl napipetován 1 ml opatrně tak, aby roztok pokryl celé dno a povrch všech buněk, a poté byl zase vylit;
- pro oddělení buněk od povrchu dna kultivační lahve byl nalit další 1 ml roztoku trypsinu, lahve byly poté přibližně pět minut temperovány při 37 °C;
- předem bylo připraveno a temperováno (37 °C) 20 ml RPMI média s 1% fetálním hovězím sérem a 1% směsí ATB (Penicillin-Streptomycin, o výše uvedených koncentracích), poté bylo rozpipetováno do kultivačních lahví;

- buňky byly do média uvolněny pomocí pipety při promíchávání, případně byla použita stěrka na pevně přichycené buňky;
- obsah všech lahví byl a pečlivě promíchán pipetou.

3.5.2 Počítání buněk

Počítání buněk probíhalo manuálně pod mikroskopem (TR 500) s využitím Bürkerovy komůrky.

- do předem připravené mikrozkušavky bylo přeneseno 50 μ l buněčné suspenze (obsahující buňky a roztok RPMI obohacený 1% fetálním hovězím sérem (FBS) a 1% směsí ATB, viz. kapitola 3.5.1) a 50 μ l 0,5% vodného roztoku trypanové modři, promícháno pipetou;
- promíchaná směs byla po 10 μ l napipetována do Bürkerovy komůrky;
- buňky byly počítány pod mikroskopem při 100x zvětšení;
- počet buněk (x) v jednom mililitru média byl vypočten podle vzorce: $x = p * 2 * 10^4$, kde p je počet živých buněk ve 25 čtvercích včetně buněk dotýkajících se horní a levé strany čtverců.

3.6 Postup práce s buněčnou kulturou

Pro účely této práce byl zvolen preventivní přístup, tzn. bylo sledováno, zda mohou mít hrubé extrakty z dospělce (HdA), z larvocyst (HdL) nebo ES-produkty (HdES) preventivní imunomodulační účinky na buňky, u kterých je posléze vyvolán zánět.

- Buněčná suspenze byla rozpipetována na 12-ti jamkovou destičku přibližně po 5 až 7 x 10^5 buňkách na jamku v objemu cca 0,6 ml (objem závisel na počtu buněk v 1 ml);
- následovala inkubace buněk v inkubátoru po dobu 4 hod při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře; v RPMI s ATB
- po 4 hodinách bylo médium odstraněno a buňky byly opláchnuty 37°C PBS;
- k buňkám bylo vzápětí napipetováno nové médium bez ATB a k vybraným skupinám buněk byly přidány HdES, HdA nebo HdL o koncentracích zvolených dle typu experimentu (experimenty jsou popsány v kapitole 3.5), každá jamka představuje jednu skupinu buněk;
- buňky na kultivačních deskách byly opět jednu hodinu inkubovány (37°C, 5% CO₂)

- po hodinové inkubaci byl u zvolených skupin buněk indukován zánět aplikací 1 ug/ml lipopolysacharidu O111:B4+ (LPS);
- následovala inkubace za stejných podmínek po dobu 4, 8, 12 nebo 24 hodin;
- poté následovala sklizeň buněk – z kultivačních jamek bylo odebráno médium a k buňkám přichyceným na dno jamky byl napipetován 1 ml lyzačního roztoku RiboEX (součást kitu pro izolaci RNA, viz kapitola 3.7.1);
- roztok s lyzovanými buňkami byl z jamek přenesen do 1,5ml mikrozkušavek a umístěn na ledu do dalšího zpracování

3.7 Design experimentů

V rámci práce byly provedeny tři na sebe navazující experimenty – označené I, II a III, každý se svým cílem (viz tabulka 2). Jak bylo uvedeno výše, v experimentu bylo zvoleno preventivní použití testovaných složek *H. diminuta*, kdy byly buňky nejdříve kultivovány s extrakty a teprve poté byl u takto ošetřených buněk vyvolán zánět prostřednictvím LPS. Preventivní přístup byl zvolen z důvodu, abychom předešli zkrácení výsledků rychlým nástupem tumor necrosis faktoru α (TNF α), vzhledem k faktu, že ošetření a vyvolání zánětu provádíme v krátkém časovém odstupu.

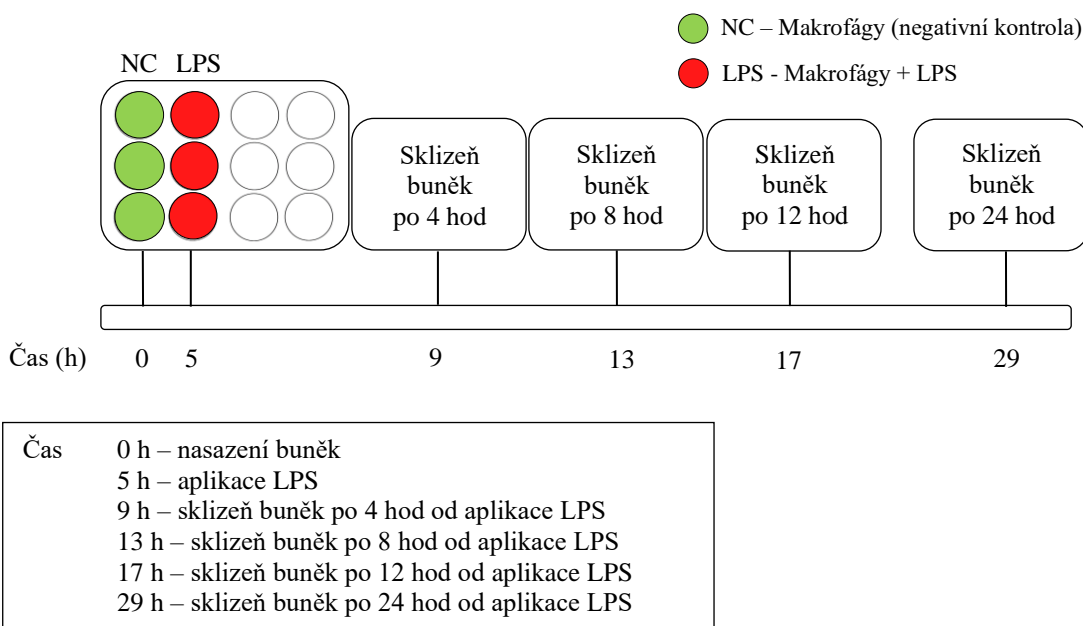
Tab. 2: Přehled experimentů.

EXPERIMENT	CÍL	DESIGN
Experiment I	Zvolení vhodného časového bodu pro sklizeň buněk, kdy dosáhne hladina genové exprese TNF α nejvyšších hodnot.	Obr. 4
Experiment II	Určení optimální koncentrace HdES, HdA a HdL, která nejvýrazněji sníží účinek LPS.	Obr. 5
Experiment III	Stanovení exprese genů vybraných cytokinů u buněk ovlivněných HdES, HdA nebo HdL a zároveň porovnání skupin buněk ovlivněných/neovlivněných LPS.	Obr. 6

3.7.1 Experiment I

Experiment I (Exp I) byl plánován pro optimální načasování při analýze exprese zvolených cytokinů. Buňky byly nasazeny na celkem čtyři desky vždy ve dvou skupinách – negativní kontrola (NC) a buňky s indukovaným zánětem (LPS). U obou skupin buněk byla sledována

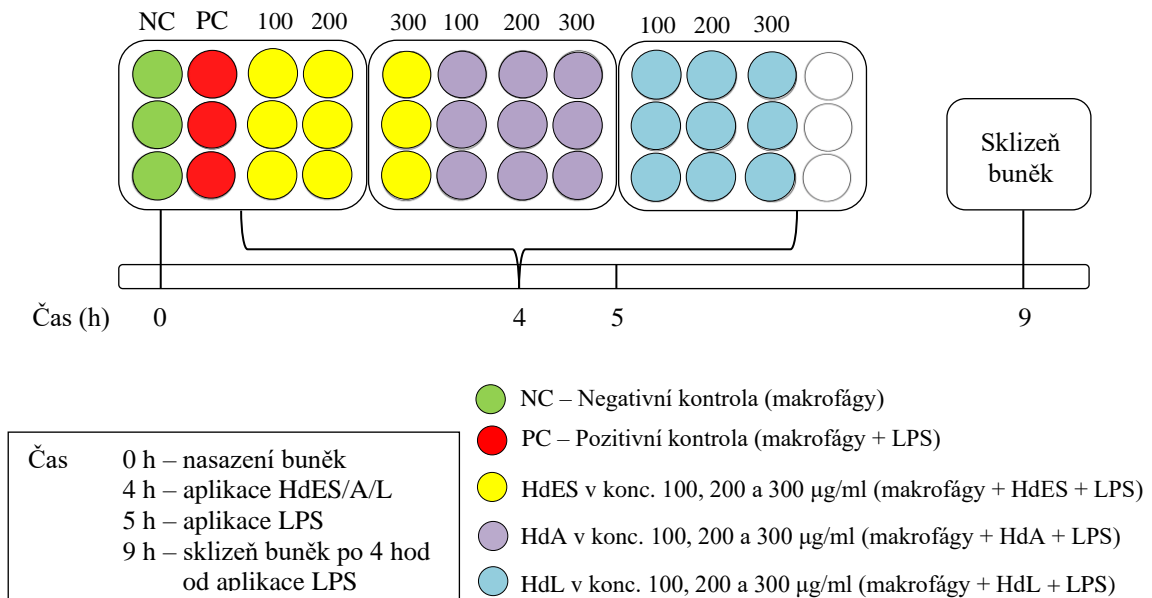
expresi TNF α , a to v intervalech po 4, 8, 12 a 24 hodinách od vyvolání zánětu. Časová osa je znázorněna na obrázku 4.



Obr. 4: Schéma experimentu I

3.7.2 Experiment II

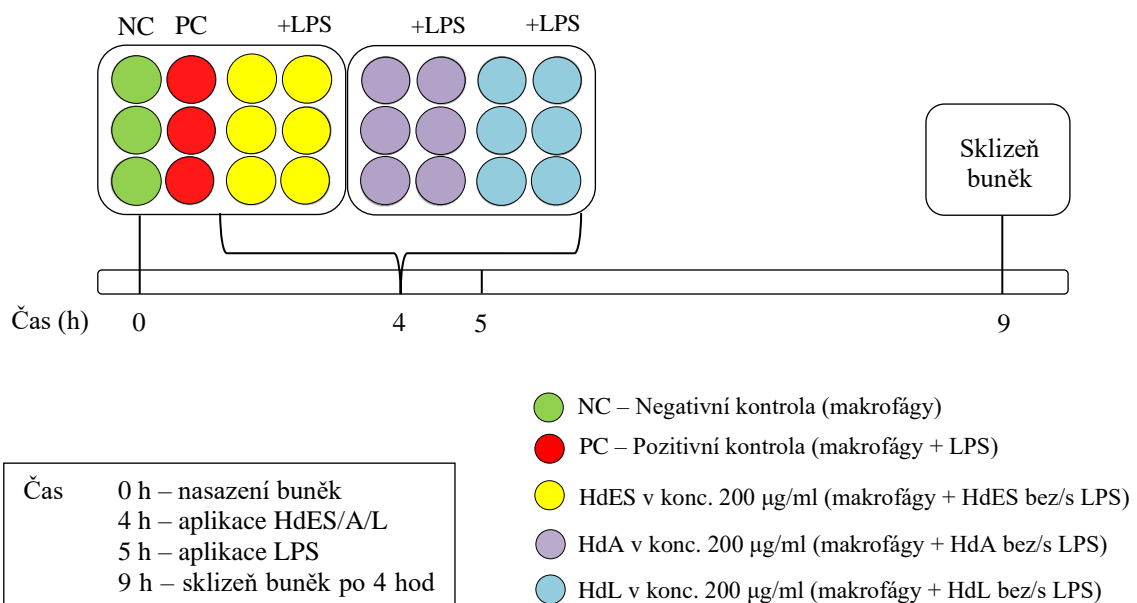
Experiment II navazoval na výsledky Exp I. Měl za cíl zjistit vhodnou koncentraci extraktů a ES-produktů. V tomto případě byly makrofágy po dobu jedné hodiny kultivovány (ošetřeny) s HdES, HdA nebo HdL v koncentracích 100, 200 nebo 300 $\mu\text{g/ml}$. Poté byl u všech skupin buněk (vyjma negativní kontroly) indukován zánět aplikací LPS. Experiment probíhal na třech kultivačních deskách (viz obrázek 5).



Obr. 5: Schéma experimentu II

3.7.3 Experiment III

V tomto experimentu byla sledována genová exprese cytokinů TNF α , IL-1 β a IL-10, receptoru IL-17re a exprese transkripčního faktoru STAT6 u buněk ovlivněných a neovlivněných LPS (viz obr 6). Vyjma negativní (NC) a pozitivní (PC) kontroly byly všechny skupiny buněk v tomto experimentu hodinu před vyvoláním zánětu kultivovány s extrakty/ES-produkty ve zvolené koncentraci (vychází z experimentu II). Experiment III byl třikrát opakován.



Obr. 6: Schéma experimentu III

3.8 Analýza genové exprese vybraných cytokinů

Pro měření genové exprese cytokinů byla zvolena metoda real-time PCR (qPCR). Abychom mohli analyzovat genovou expresi zvolenou metodou, musela být nejdříve ze sklizených buněk izolována RNA, která byla posléze převedena na komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkripce. Postup těchto metod je popsán v kapitolách níže.

3.8.1 Izolace RNA

Buněčná RNA byla izolována s využitím kitu HybridR RNA Kit dle návodu výrobce.

3.8.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripcí byla izolovaná RNA převedena do cDNA.

- Nejdříve byla změřena koncentrace celkové vyizolované RNA u všech skupin buněk pomocí spektrofotometru NanoDrop;
- z každé skupiny buněk byl použit 1 µg celkové RNA a ta byla pomocí kitu High Capacity RNA-to-cDNA Kit převedena dle návodu výrobce do komplementární DNA (cDNA) v PCR cycleru za podmínek:
 - 37 °C/60 min,
 - 95 °C/5 min,
 - 4 °C/∞.
- po proběhnuté reakci byl objem v každé zkumavce doplněn vodou do 200 µl

3.8.3 Real-time PCR reakce

Jako referenční gen pro real-time PCR reakce sloužil beta-2-mikroglobulin (B₂M) uveden v tabulce 1. Všechny reakce byly připraveny v triplikátech na 96-ti jamkové destičky.

- Do každé jamky bylo nanášeno 20 µl reakční směsi:
 - 4 µl qPCR Mix 5x Hot FirePol[®]
 - 1 µl TaqMan sondy (kapitola 3.1, tabulka 1) conc 20×
 - 5 µl naředěné cDNA z předchozí reakce (reverzní transkripce)
 - 10 µl vody
- qPCR reakce probíhala v lightcycleru LC480 za podmínek:
 - 95 °C/10 min,
 - 50 cyklů 95 °C/15 s, 60 °C/1 min,
 - 4 °C/∞.

3.9 Statistická analýza dat

Pro zpracování dat byly použity programy GraphPad Prism 5 a Excel. Pro analýzu genové exprese byla zvolena strategie relativní kvantifikace, která porovnává hladinu genové exprese cílových genů vzhledem k referenčnímu genu (Pfaffl, 2001). Pro vyhodnocení genové exprese byla využita Pfafflova metoda, která ve vzorci pro výpočet zahrnuje korekci efektivity PCR reakce u každého genu (Pfaffl, 2001). Pro celkový výpočet relativní genové exprese byl použit vzorec

$$R = \frac{E(\text{ref.})^{Ct(\text{ref.})}}{E(\text{target})^{Ct(\text{target})}}$$

Hodnota C_t udává počet amplifikačních cyklů potřebných k překročení prahové úrovně. Efektivita E je vypočtena z kalibrační křivky a její směrnice použitím vzorce

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{směrnice}}} \quad (\text{Pfaffl, 2001}).$$

V našem případě bylo předpokládáno, že průběh amplifikace byl pro každý gen 100%, tedy efektivita $E = 2$.

Výsledné hodnoty byly poté zpracovány statisticky nepárovým t-testem. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $N=3$ u jednotlivých experimentů, $N=9$ u celkových grafů). Hranice statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Míra signifikance (p) mezi skupinou negativní kontroly a vybranou skupinou buněk je v grafech značena symbolem hvězdičky:

* $p < 0,05$;

** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$.

Míra signifikance (p) mezi pozitivní kontrolou a vybranou skupinou buněk je značena křížky:

$p < 0,05$;

$p < 0,01$;

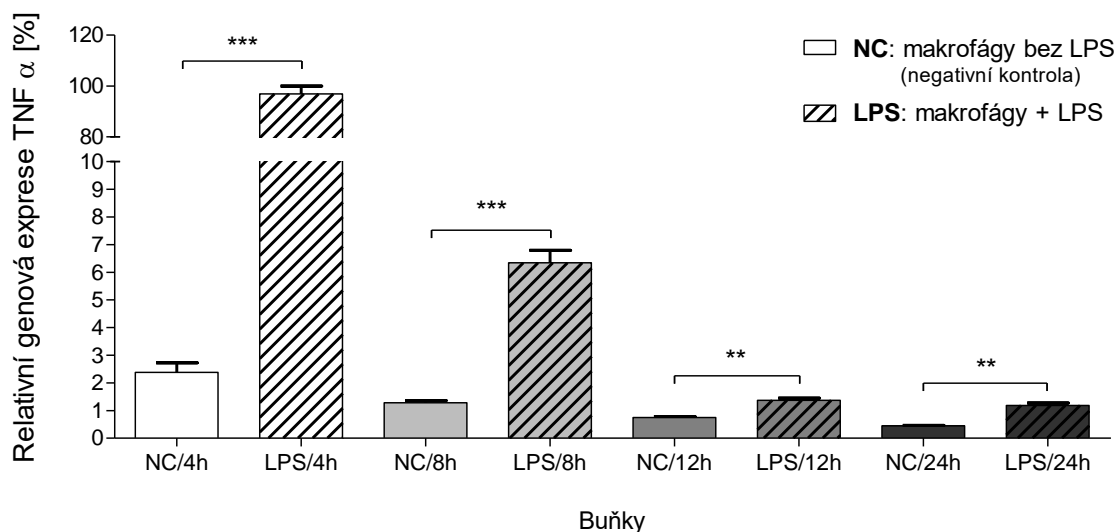
$p < 0,001$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Výsledky experimentu I

Cílem prvního experimentu bylo sledovat vliv působení LPS na změnu genové exprese a na základě výsledků zvolit vhodný časový bod pro analýzy cytokinů. Pro tyto účely byl jako vhodný gen zvolen TNF α . Buňky byly sklizeny po 4, 8, 12 a 24 hodinách od vyvolání zánětu aplikací LPS.

Na základě výsledků graficky znázorněných na obrázku 7 byl jako nejvhodnější časový bod pro analýzy cytokinů zvolen první časový bod, tedy 4 hodiny od aplikace LPS, kdy hladina TNF α statisticky velmi významně vzrostla. Po 8 hodinách byl zaznamenán významný pokles. Po 12 a 24 hodinách hladina cytokinu dále významně klesala. Míra signifikance mezi skupinou negativní kontroly a vybranou skupinou buněk je v grafu značena hvězdičkou. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; N=3).

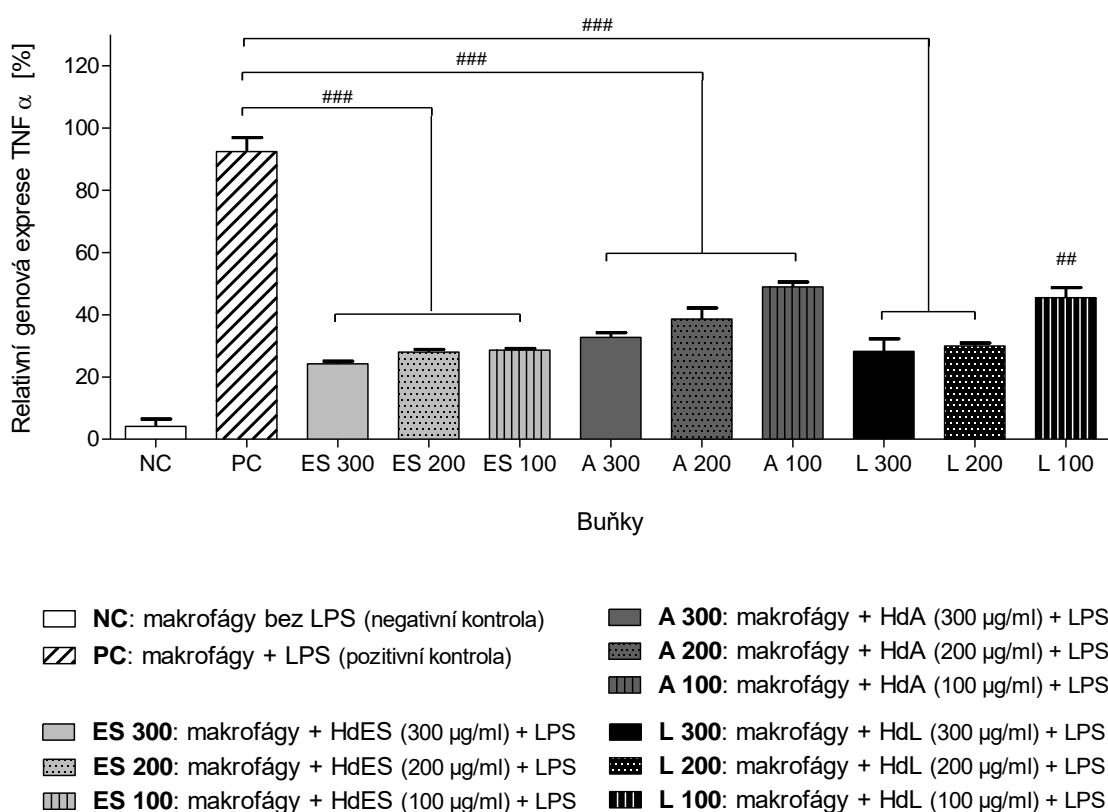


Obr. 7: Relativní genová exprese TNF α po 4, 8, 12 a 24 hodinách od aplikace LPS.

4.2 Výsledky experimentu II

V experimentu II byl testován vliv tří složek [extraktů ze dvou životních stádií *Hymenolepis diminuta* (HdA a HdL) a exkrečních/sekrečních produktů z dospělého (HdES)], a to vždy ve třech různých koncentracích – 100, 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$. Účelem bylo najít optimální koncentraci HdES/A/L, která bude mít největší protizánětlivý účinek. V tomto experimentu byla opět sledována genová exprese TNF α . Buňky byly sklizeny po 4 hodinách od indukce zánětu LPS (viz. experiment I). Výsledná data jsou graficky znázorněna na obrázku 8. Míra signifikance mezi skupinou pozitivní kontroly a vybranou skupinou buněk je značena křížky. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; N=3).

Statisticky velmi významný pokles genové exprese TNF α oproti pozitivní kontrole byl zaznamenán u všech tří testovaných extraktů *H. diminuta*. Nejvýraznější snížení bylo pozorováno vždy u buněk skupiny 300 (s 300 $\mu\text{g/ml}$ HdES/A/L). Pro účely tohoto projektu byla jako optimální koncentrace zvolena 200 $\mu\text{g/ml}$ pro všechny tři složky vzhledem k náročnosti jejich přípravy.



Obr. 8: Relativní genová exprese TNF α po kultivaci buněk s třemi různými koncentracemi extraktů/ES-produktů a následně vyvolaném zánětu.

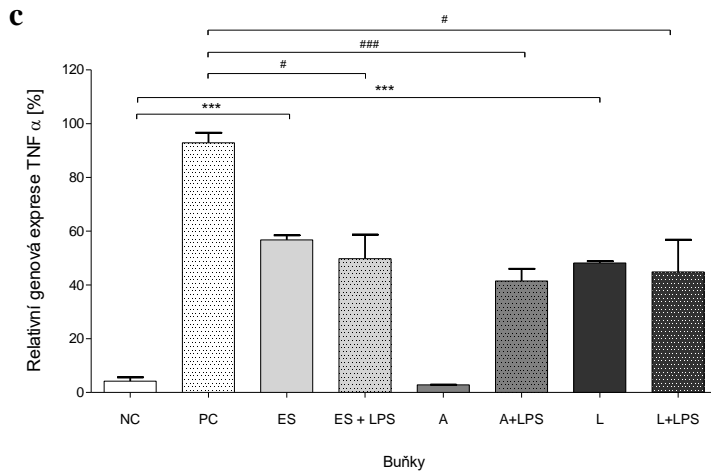
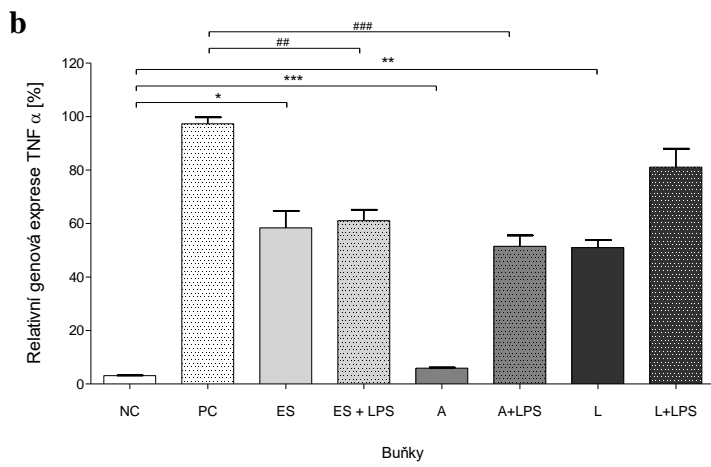
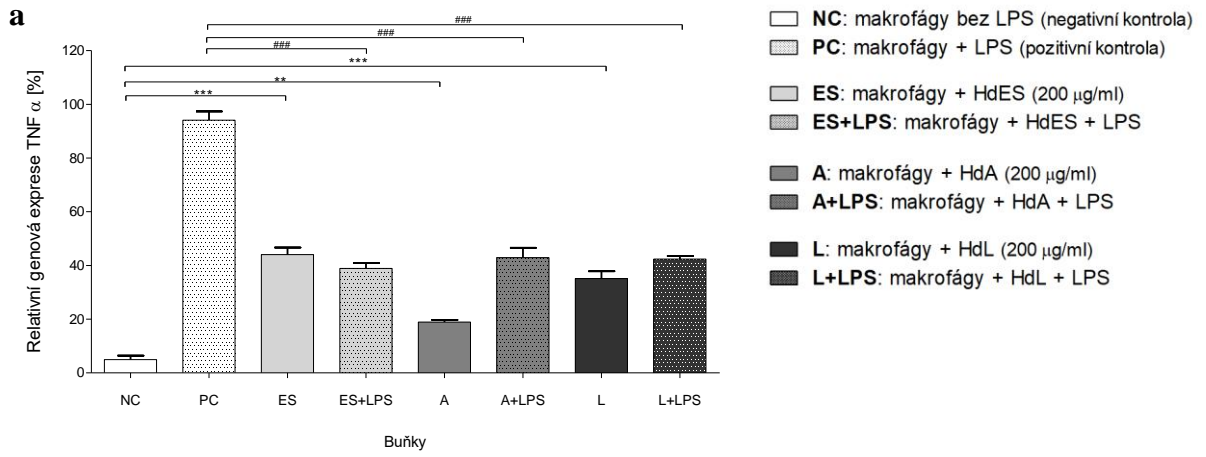
4.3 Výsledky experimentu III

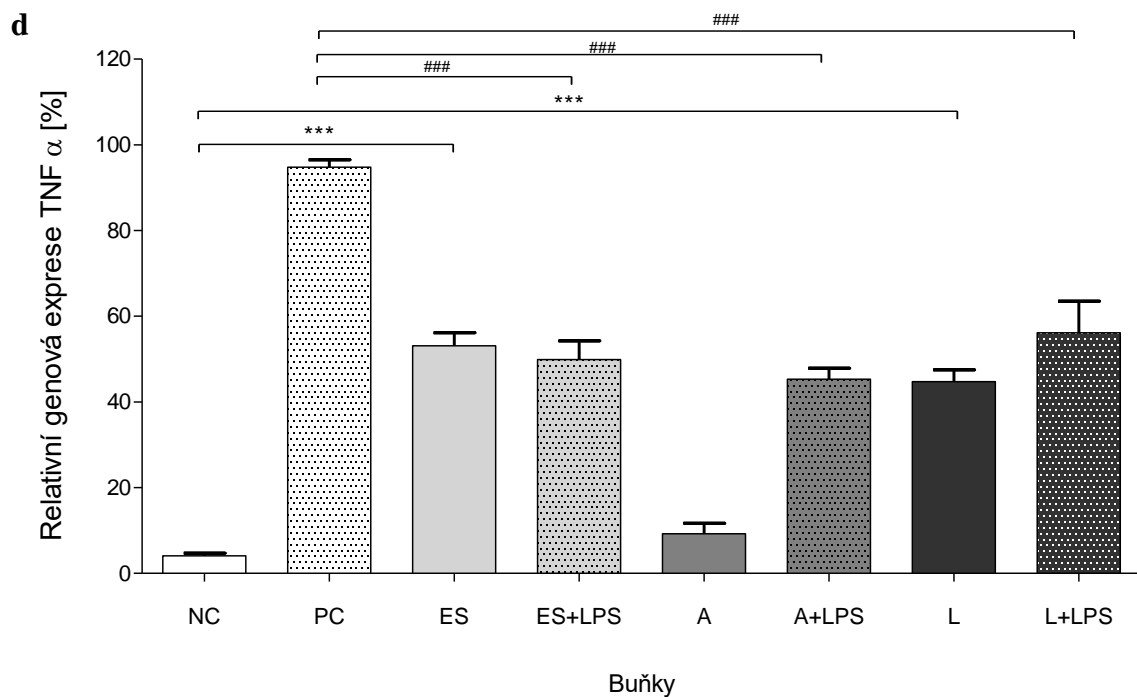
Experiment III byl proveden v návaznosti na výsledky experimentů I a II a kladl si za cíl analyzovat genovou expresi některých cytokinů v buňkách kultivovaných v médiu s HdES/A/L (o koncentraci 200 µg/ml). Výsledky analýz pak porovnat s hodnotami genové exprese buněk posléze ovlivněných zánětem. Vybráno bylo celkem pět genů, a to pro cytokiny TNF α , IL-1 β , IL-10, pro gen IL-17re (receptor cytokinu IL-17C) a pro transkripční faktor STAT6. Experiment III byl vždy 3 \times opakován (grafy **a**, **b**, **c**) a z výsledných hodnot byl sestrojen souhrnný graf (**d**). Míra signifikance mezi skupinou negativní kontroly a vybranou skupinou buněk je v grafu značena hvězdičkou a mezi skupinou pozitivní kontroly a vybranou skupinou buněk je značena křížky. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; N=3 (**a-c**); N=9 (**d**)).

4.3.1 Tumor necrosis factor α

Na obrázku 9 jsou graficky znázorněné hodnoty relativní genové exprese tumor necrosis faktoru α (TNF α) třech nezávislých měření (9**a**, **b**, **c**) a souhrnný graf z těchto měření (9**d**). Statisticky velmi významné zvýšení hladiny TNF α bylo pozorováno u skupin buněk ovlivněných HdES/A/L v porovnání s negativní kontrolou (NC) a tedy zesílení prozánětlivé reakce. Výsledky skupiny buněk ovlivněných HdA nebyly signifikantně významné v porovnání s negativní kontrolou (viz. souhrnný graf 9**d**), neboť v posledním opakování dosahovala hladina TNF α u buněk ovlivněných HdA dokonce nižších hodnot než skupina buněk NC (viz. graf 9**c**). U buněk ovlivněných zánětem (+LPS) je patrné významné snížení genové exprese TNF α v porovnání s pozitivní kontrolou (PC), a to u všech tří testovaných skupin HdES/A/L (viz. graf 9**d**).

Z výsledných dat lze konstatovat, že všechny tři testované složky *H. diminuta* (HdES, HdA i HdL) mají mírný prozánětlivý účinek na buňky neovlivněné zánětem, zároveň silně snižují účinky LPS a mají tedy v tomto případě výrazný protizánětlivý účinek.





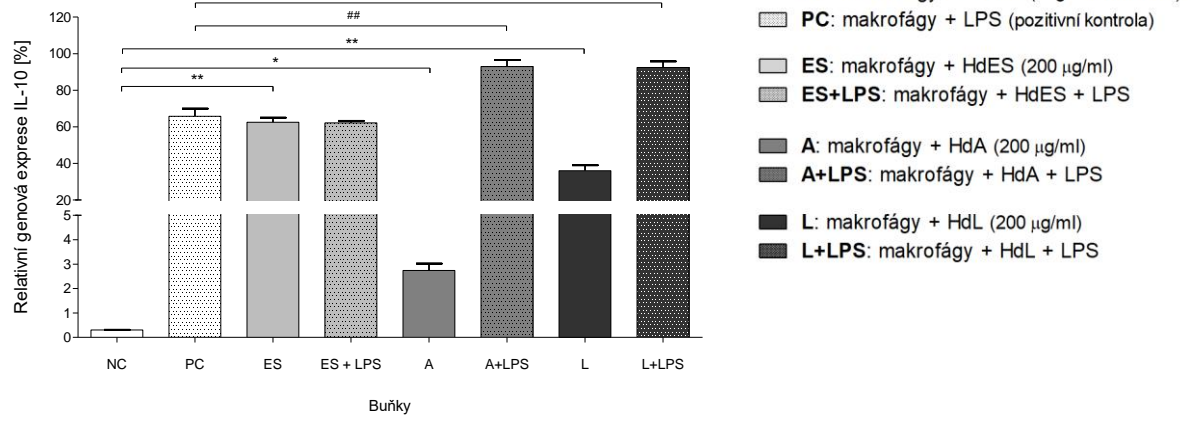
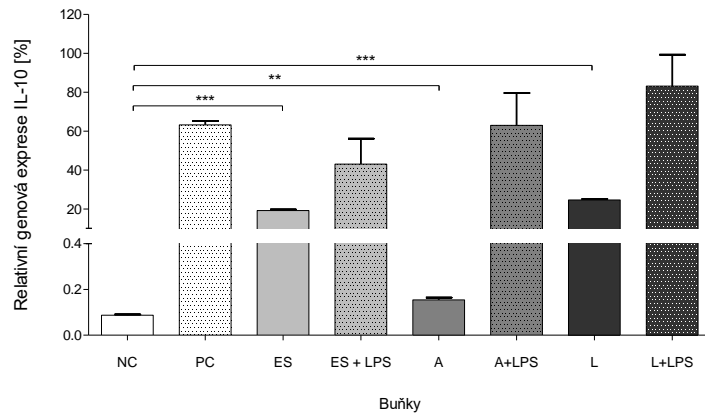
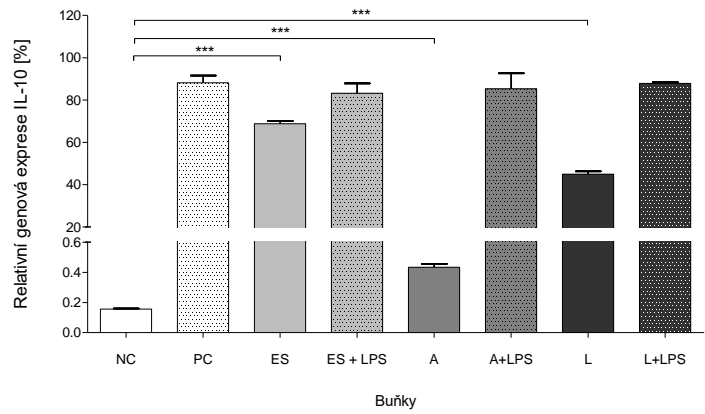
Obr. 9: Vliv ES-produktů (ES = HdES), extraktů z dospělé (A=HdA) a z larvocyst (L=HdL) na genovou expresi cytokinu TNF α u buněk ovlivněných a neovlivněných zánětem. (a-c) tři nezávislá opakování měření, (d) souhrnný graf těchto měření.

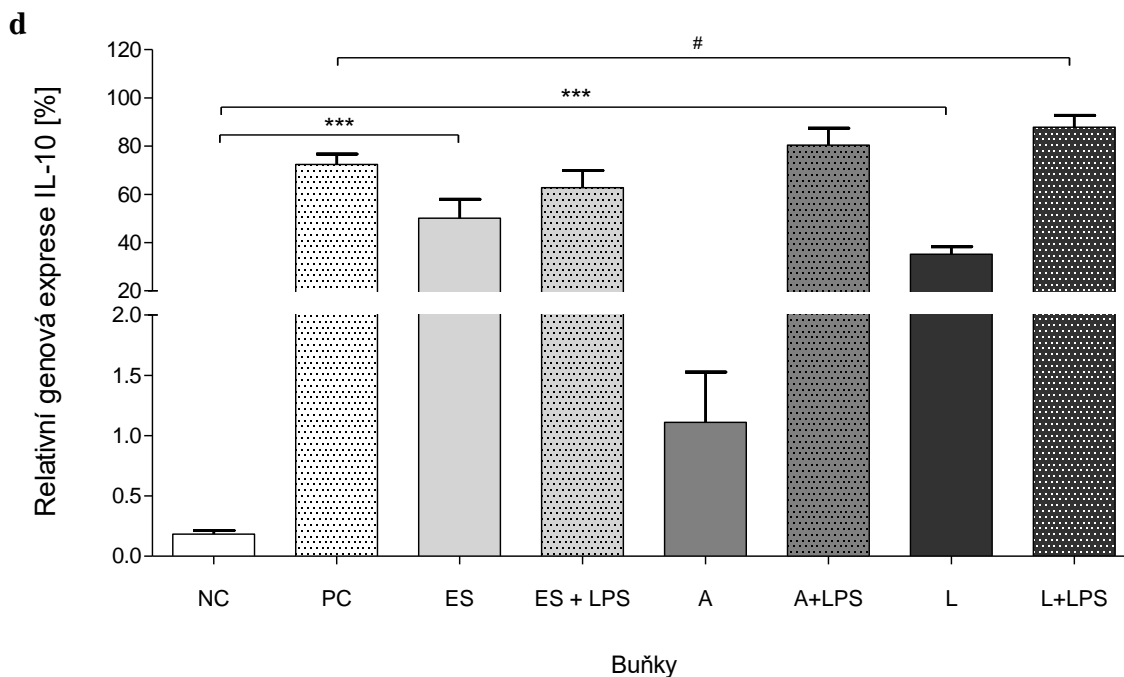
4.3.2 Interleukin 10

Grafické znázornění relativní genové exprese interleukinu 10 (IL-10) je uvedeno na obrázku 10.

Napříč všemi třemi měřeními je zřejmé velmi významné zvýšení hladiny genové exprese IL-10 u skupin buněk kultivovaných s HdES a HdL oproti NC. V případě buněk s HdA dochází v souhrnu ke zvýšení hladiny nesignifikantně v porovnání s NC. Tyto výsledky jsou vyobrazeny v grafu 10d.

Ze souhrnného grafu **d** lze říci, že extrakt HdL ovlivnil skupinu buněk s vyvolaným zánětem oproti PC. HdES a extrakt HdA buňky s LPS výrazně neovlivnily, nebyl tedy patrný signifikantní rozdíl oproti PC (viz. graf 10d).

a**b****c**



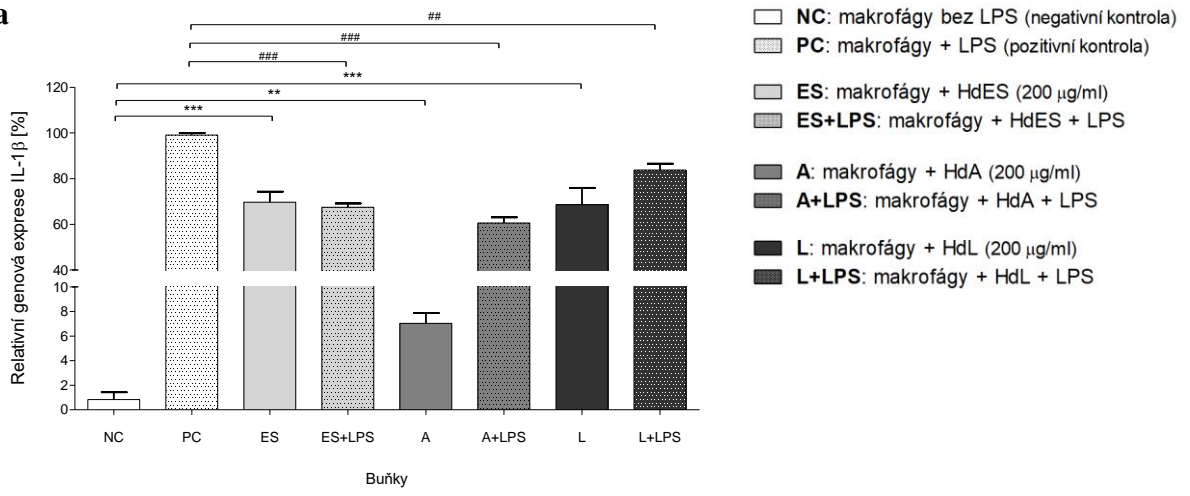
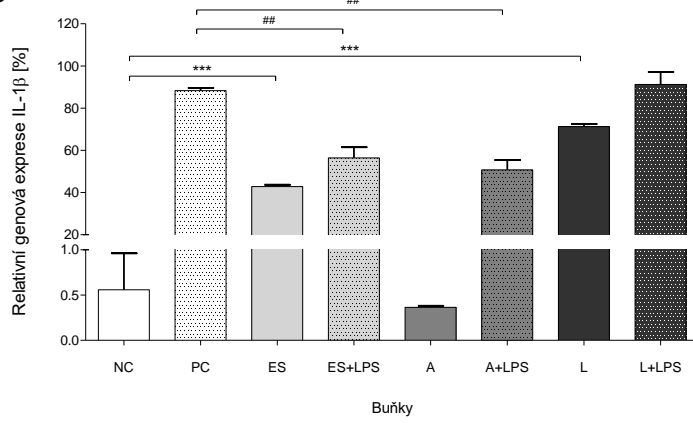
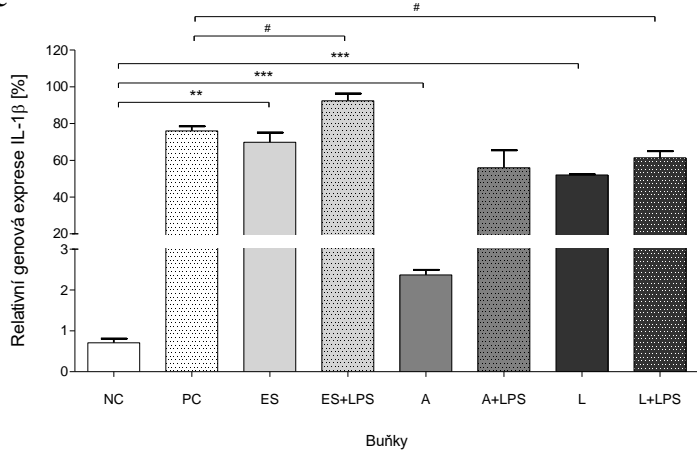
Obr. 10: Vliv ES-produktů (ES = HdES), extraktů z dospělého (A=HdA) a z larvocyst (L=HdL) na genovou expresi IL-10 u buněk ovlivněných a neovlivněných zánětem. (a-c) tři nezávislá opakování měření, (d) souhrnný graf těchto měření.

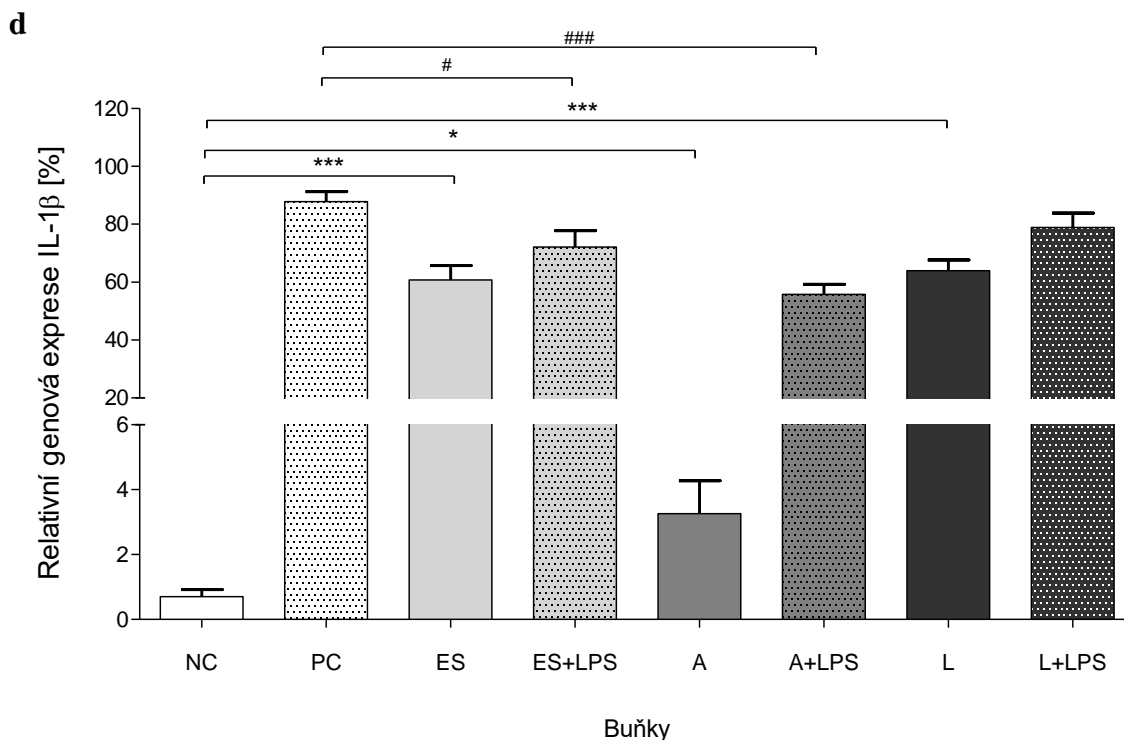
4.3.3 Interleukin 1 β

U všech tří skupin buněk (HdES, HdA i HdL) neovlivněných LPS došlo v souhrnu k významným signifikantním rozdílům v genové expresi interleukinu 1 β (IL-1 β) oproti NC. V případě HdES a HdL byl zaznamenán dokonce statisticky velmi významný nárůst hladiny IL-1 β . A můžeme tedy usuzovat na jejich prozánětlivý účinek. V případě buněk s HdA byla signifikance v souhrnu méně výrazná, a to z důvodu nižších hodnot oproti NC v rámci druhého měření (viz. graf 11b)

Výsledná data všech tří skupin buněk ovlivněných LPS ukazují na mírný protizánětlivý účinek HdES a extraktů HdA a HdL. V případě skupiny s HdES došlo k signifikantnímu snížení hladiny IL-1 β v porovnání s PC, v případě HdA došlo ke statisticky velmi významnému snížení hladiny IL-1 β oproti PC. HdL extrakt buňky statisticky nikterak neovlivnil, protože v souhrnu nedošlo ke statisticky prokazatelnému rozdílu v genové expresi oproti PC.

Výsledky měření relativní genové exprese IL-1 β jsou graficky znázorněny na obrázku 11.

a**b****c**



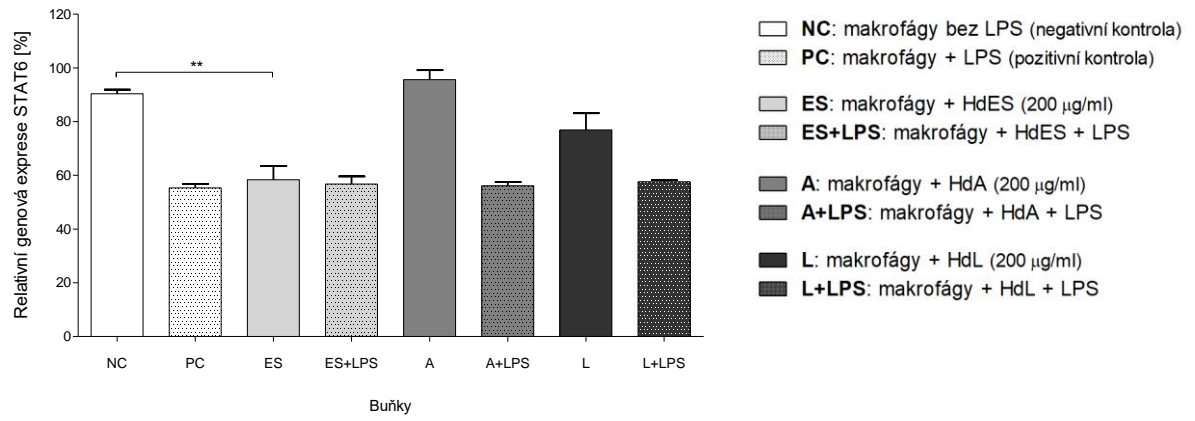
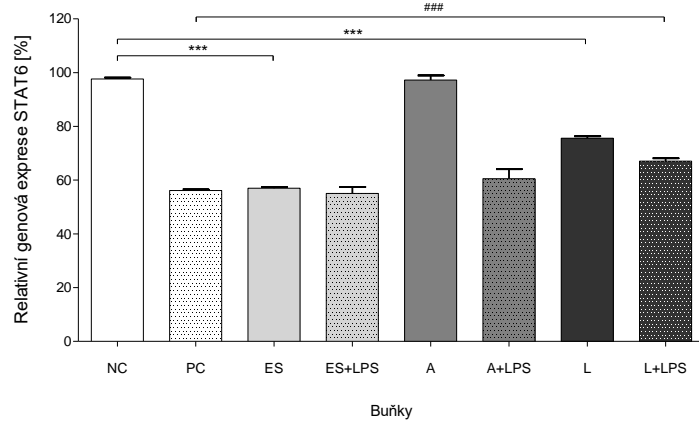
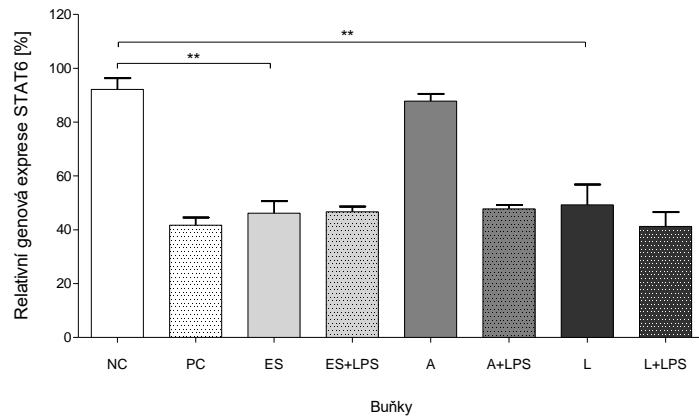
Obr. 11: Vliv ES-produktů (ES = HdES), extraktů z dospělého (A=HdA) a z larvocyst (L=HdL) na genovou expresi IL-1 β u buněk ovlivněných a neovlivněných zánětem. (a-c) tři nezávislá opakování měření, (d) souhrnný graf těchto měření.

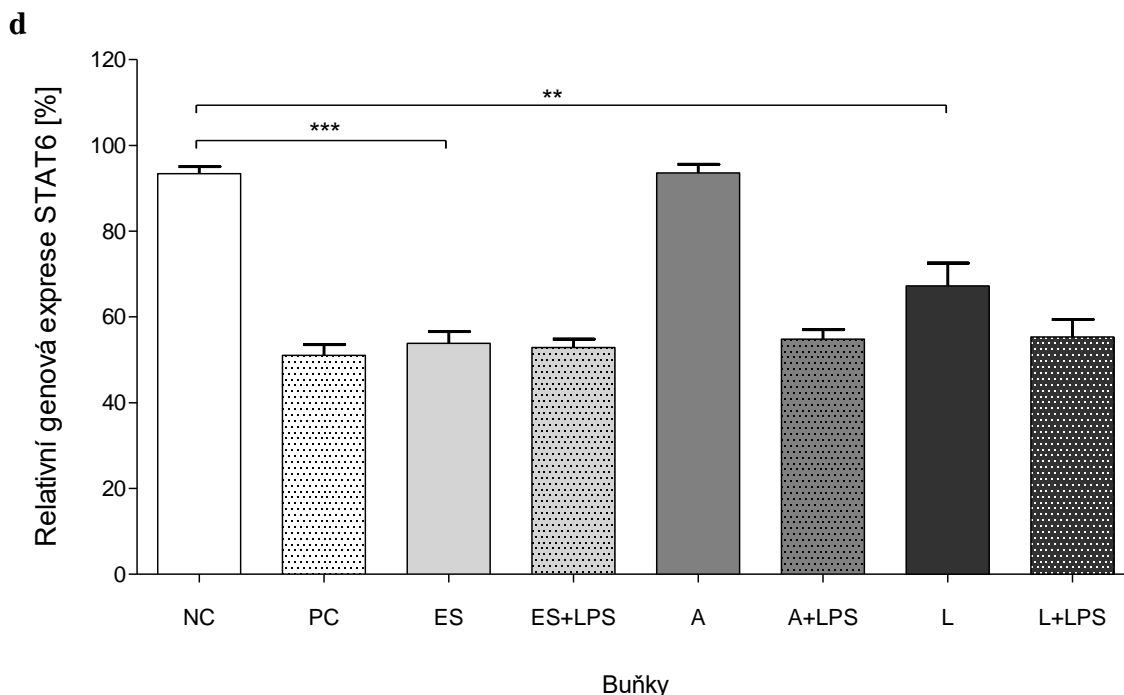
4.3.4 STAT protein 6

Na obrázku 12 jsou graficky znázorněny naměřené hodnoty genové exprese STAT proteinu 6 (STAT6) tří na sobě nezávislých měření (12a,b a c) a souhrnný graf (12d).

Signifikantní změny v genové expresi byly zaznamenány převážně u skupin buněk neovlivněných zánětem. Velmi významný pokles genové exprese byl pozorován u skupiny buněk s HdES a významný pokles u skupiny HdL v porovnání s NC. V případě HdA nebyly zaznamenány výraznější statistické změny oproti NC a lze tedy usuzovat na jejich minimální účinek.

U buněk ovlivněných zánětem nebyl v souhrnu pozorován žádný statisticky významný rozdíl v porovnání s PC. Ze získaných dat lze konstatovat, že HdES, HdA ani HdL nemají významný vliv na hladinu genové exprese u buněk ovlivněných zánětem.

a**b****c**



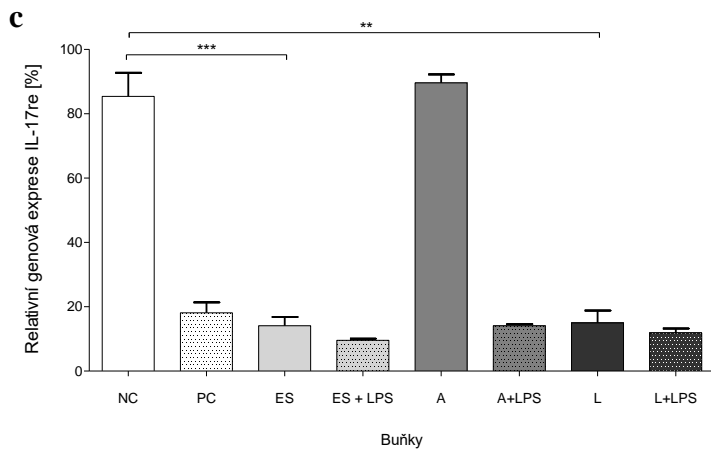
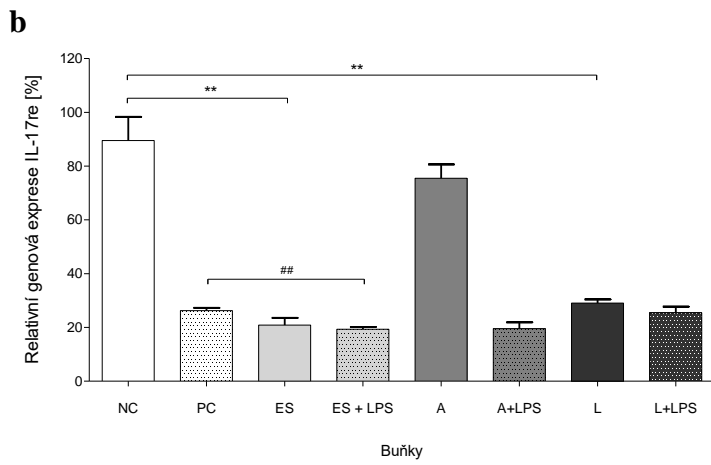
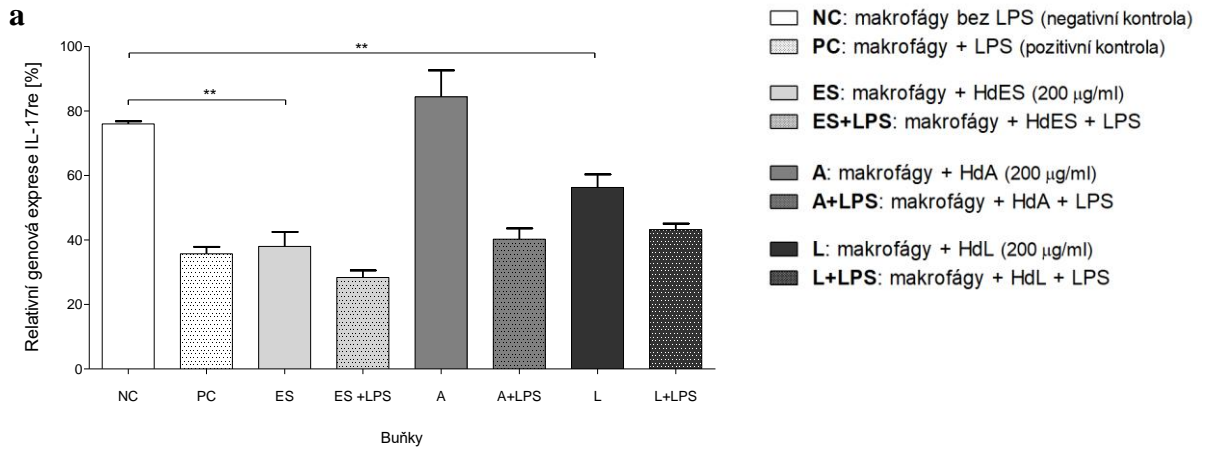
Obr. 12: Vliv ES-produktů (ES = HdES), extraktů z dospělého (A=HdA) a z larvocyst (L=HdL) na genovou expresi transkripčního faktoru STAT6 u buněk ovlivněných a neovlivněných zánětem. (a-c) tři nezávislá opakování měření, (d) souhrnný graf těchto měření.

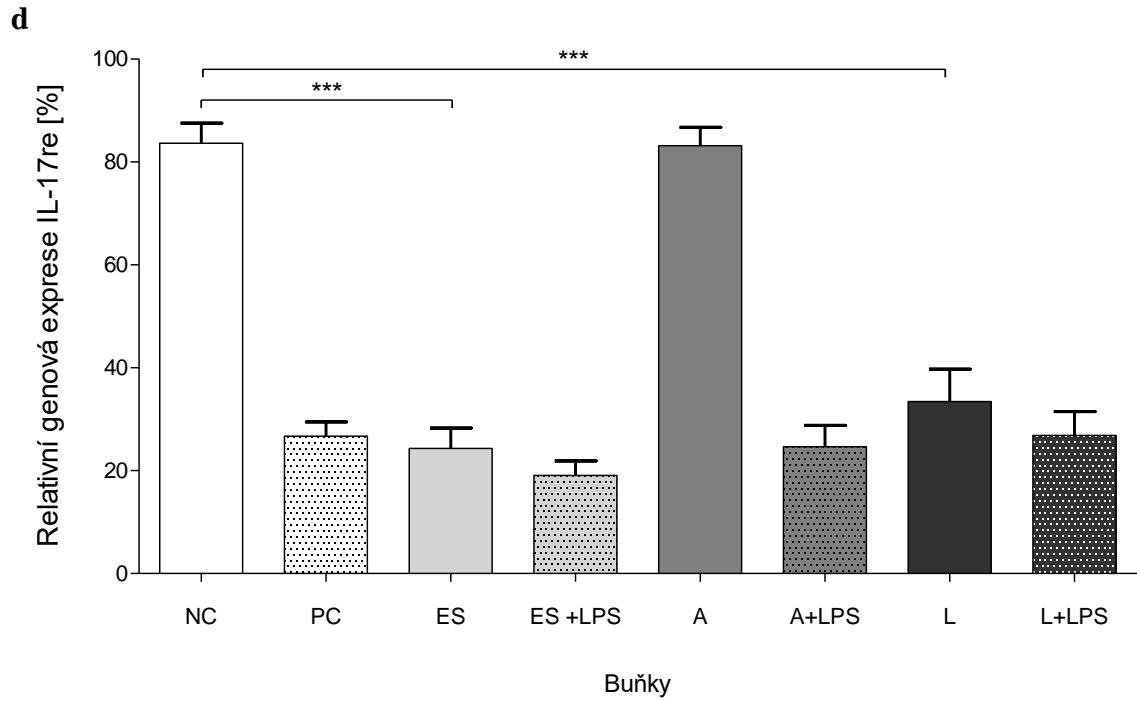
4.3.5 Interleukin 17re

Výsledky měření hladiny genové exprese interleukinu 17re (IL-17re; receptoru pro IL-17C) jsou znázorněny na obrázku 13.

Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány u buněk kultivovaných s HdES a s HdL, a to pouze v případě buněk neovlivněných LPS. Jak přítomnost HdES, tak HdL vyvolala velmi významný pokles hladiny genové exprese receptoru pro IL-17C oproti NC. Zatímco u extraktu HdA tento vliv pozorován nebyl (viz. obrázek 13d).

Buňky ovlivněné zánětem nevykazovaly signifikantní změny genové exprese oproti PC. Z výsledků můžeme vyvodit, že přítomnost HdES a extraktů HdA a HdL nemá výrazný vliv na buňky s indukovaným zánětem.





Obr. 13: Vliv ES-produktů (ES = HdES), extraktů z dospělé (A=HdA) a z larvocyst (L=HdL) na genovou expresi receptoru IL-17re u buněk ovlivněných a neovlivněných zánětem. (a-c) tři nezávislá opakování měření, (d) souhrnný graf těchto měření.

5 DISKUZE

Tasemnice *Hymenolepis diminuta* je helmint kolonizující tenké střevo svého hostitele. Jejím definitivním hostitelem jsou převážně potkani nebo krysy, ve výjimečných případech také člověk (Garcia, 2006; Roberts et al., 2013). V rámci výzkumu naší laboratoře byla *H. diminuta* zvolena jako vhodný kandidát helminta pro studium terapie či prevence imunitně zprostředkovaných střevních onemocnění (Inflammatory Bowel Diseases – IBD), a to na základě kritérií vytyčených ve článku Lukeš a kol., 2014. Chronická zánětlivá onemocnění, Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, jsou onemocnění autoimunitní povahy, která jsou charakteristická aktivací pro-zánětlivé (Th1) imunitní odpovědi multifaktoriálního původu (Kaser et al., 2010).

Během posledních desetiletí byl zaznamenán vysoký nárůst autoimunitních onemocnění, a to především ve vyspělých zemích (např. El-Gabalawy et al., 2010; Lerner et al., 2015). Tento nárůst není dosud zcela objasněn, nicméně nedávné výzkumy ukazují na možnou příčinu v posunu k modernímu způsobu života s vysokými hygienickými standardy (intenzivní hygiena, užívání dezinfikované vody, nadměrné užívání antibiotik a antiparazitik atd.). To vše má za následek eliminaci až eradikaci různých mikroorganismů a dalších komenzálních organismů včetně helmintů (např. Rook, 2012; Weinstock, 2012; Parker & Ollerton, 2013; Filyk et al., 2016).

Helminti si během koevoluce s hostitelem vyvinuly propracované mechanismy, kterými jsou schopni modulovat hostitelovu imunitní odpověď a tím si zajistit své přežití (Bilbo et al., 2011; Rook et al., 2012, 2014; Ditgen et al., 2014; Wammes et al., 2014). Hlavní vliv helmintů na imunitní systém hostitele spočívá v indukci proti-zánětlivé (Th2) imunitní odpovědi (např. Finlay et al., 2015; Harnett & Harnett, 2017) a právě tento efekt je využíván biologickou léčbou tzv. helminto-terapií pro zmírnění autoimunitních onemocnění (Elliott & Weinstock, 2012; Wang et al., 2017; Sobotková et al., 2019).

Pro posouzení, zda je *H. diminuta* vhodným kandidátem pro případnou terapii, bylo zapotřebí otestovat její účinky na experimentálním buněčném *in vitro* modelu – v případě naší laboratoře na modelu potkaním. Sledujeme především vliv přirozené infekce *H. diminuta* na imunitní odpověď a střevní mikrobiom hostitele (Parfrey et al., 2017) a posléze i vliv na střevní zánětlivá onemocnění (Jirků Pomajbíková et al., 2018). Experimenty jsou ovšem náročné

časově i finančně, proto byl pro tuto studii zvolen *in vitro* model makrofágové buněčné linie získané izolací monocytů z kostní dřeně potkana.

Makrofágy hrají velmi významnou roli v aktivaci lokální i celkové imunitní odpovědi. Rozlišují se na dva subtypy (M1 a M2) v závislosti na aktivátoru, který danou fenotypovou polarizaci spustil. Tato aktivace rozhoduje, zda se bude imunitní odpověď vyvíjet pro-zánětlivou či proti-zánětlivou cestou (Orecchioni et al., 2019).

Z výsledků studií vyplývá, že bioaktivní molekuly obsažené v extraktech nebo exkrečních/sekrečních produktech (ES-produkty) helmintů mohou ovlivnit diferenciaci makrofágů a tím modulovat imunitní odpověď hostitele ve smyslu potlačení genové exprese některých pro-zánětlivých cytokinů (např. Shepherd et al., 2015; Nascimento Santos et al., 2017; Smallwood et al., 2017; Maizels et al., 2018). Zmapování účinků extraktů a ES-produktů z *H. diminuta* je tedy nezbytné pro pochopení imunomodulačních mechanismů tasemnice v organismu hostitele, případně pro její další využití v rámci helminto-terapie.

V tomto projektu byly testovány účinky extraktů získaných ze dvou životních stádií *H. diminuta*, a to z larvocyst (HdL) získaných z mezihostitele (v našem případě z potměníka moučného) a z dospělců (HdA) získaných ze střeva definitivního hostitele (potkan udržovaný v laboratorních podmínkách). Výsledky naší laboratoře prokázaly, že obě tato stádia vykazují protizánětlivé účinky (Jirků Pomajbíková et al., 2018). Testován byl zároveň vliv ES-produktů (HdES) získaných kultivací dospělého *H. diminuta*. Jejich účinky byly sledovány jak na zánětlivém (buňky ovlivněné LPS) tak nezápětlivém modelu. Pro částečné zmapování imunitní odpovědi byla analyzována genová exprese cytokinů TNF α , IL-10, IL-1 β , transkripčního faktoru STAT6 a exprese receptoru IL-17re. Abychom mohli otestovat vliv extraktů HdA a HdL a produktů HdES na produkci těchto cytokinů, bylo zapotřebí nejdříve určit vhodnou dobu pro jejich analýzu a zvolit optimální koncentraci HdES/A/L, která bude mít protizánětlivý účinek.

První experiment – zvolení vhodného časového bodu pro cytokinové analýzy

Účelem první části tohoto projektu bylo vysledovat určitý časový bod, kdy hladina buněčné genové exprese TNF α nabyde nejvyšších hodnot, což se ukázalo být nezbytné pro následné analýzy i jiných cytokinů. Expres TNF α byla sledována po 4, 8, 12 a 24 hodin od indukce zánětu bakteriálními LPS.

Výsledky ukázaly statisticky velmi významný nárůst hladiny genové exprese TNF α už v prvním vytypovaném časovém bodě, tedy po 4 hodinách od vyvolání zánětu. V časech 8, 12 a 24 hodin byl zaznamenán rapidní pokles exprese. Na základě výsledků prvního experimentu byl zvolen optimální čas, po který by měly být buňky inkubovány s LPS, na 4 hodiny.

Dle výsledků studie Baillie et al. (2017), kde metodou CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) analyzovali odpověď lidských makrofágů na LPS (10 ng/ml), je zřejmé, že k nejvýraznější genové expresi TNF α dochází u buněk inkubovaných 1-3 hodiny s LPS. Xiong et al. (1993) dokázali na testikulárních intersticiálních makrofágách myšního modelu, že exprese TNF α mRNA dosahovala nejvyšších hodnot 2 hodiny po aktivaci buněk LPS (1 μ g/ml). Při této analýze využívali metodu Northern blot. Metodu ELISA použili Johnston et al. (2010) pro určení hladiny proteinů TNF α po 2, 4, 8 a 24 hodinách u lidské THP-1 monocytární linie a nejvyšší hodnotu naměřili po 8 hodinách od stimulace buněk.

Přestože se zdá být dvouhodinová inkubace buněk s LPS pro další experimenty nevhodnější, zvolili jsme čtyřhodinový interval, abychom si pojistili případnou opožděnou genovou expresi ostatních námi zvolených cytokinů testovaných v experimentu III. Např. Zawistowska-Deniziak et al. (2017) analyzovali cytokiny metodou ELISA po 24 hodinách od kultivace buněk ES-produkty.

Druhý experiment – výběr optimální koncentrace extraktů a ES-produktů

Stěžejním krokem byla volba optimální koncentrace HdES/A/L z tasemnice *H. diminuta*. Abychom mohli otestovat jejich preventivní protizánětlivé účinky, byly buňky preinkubovány s různými koncentracemi HdES/A/L a hodinu poté byl vyvolán zánět. Sledovaným parametrem byla genová exprese TNF α . Na základě předchozích *in vivo* experimentů naší laboratoře (nepublikovaná data) a níže vypsáných výzkumů byly použity tři koncentrace extraktů/ES-produktů *H. diminuta*, a to 100, 200 a 300 μ g/ml.

Autoři studie Johnston et al. (2010) porovnávali vliv tří různých koncentrací hrubého extraktu z dospělce *H. diminuta* (10, 50 a 100 μ g/ml) na *in vitro* lidské THP-1 buněčné monocytární linii ovlivněné LPS (1 μ g/ml). Prokázal protizánětlivý účinek u dvou zmíněných koncentrací, a to 50 a 100 μ g/ml. Také Reyes et al. (2016) testoval účinky hrubých extraktů z dospělce *H. diminuta* na uměle vyvolanou DSS (dextran sulfate sodium) kolitidu u myší a zvolil koncentraci 100, 500 a 1000 μ g/ml. Odhalil, že všechny tři zvolené koncentrace

antigenů signifikantně redukuje projevy kolitidy a nejlepšího výsledku dosáhli s nejnižší koncentrací, tedy 100 µg/ml. Naproti tomu Lopes et al. (2015) zvolili koncentraci extraktů z dospělce *H. diminuta* pouhých 100 ng/ml, při které neprokázali významnější protizánětlivé účinky. Bohužel vliv extraktů larválních stádií na expresi imunitních faktorů u *H. diminuta* nebyl doposud testován na *in vitro* modelech, existují však studie zaměřené na identifikaci proteinů z cysticerkoidů, které odhalily 70 různých proteinů a řadu z nich s antigenní povahou (Sulima et al., 2017).

Kromě hrubých extraktů jsou již testované také ES-produkty získané kultivací dospělce *H. diminuta* v živném médiu (Johnston et al., 2010; Zawistowska-Deniziak et al., 2017). Ve studii Johnston et al. (2010) byla zvolena koncentrace ES-produktů 10, 20, 40, 80 a 100 µg/ml, kterými ošetřil THP-1 monocytární buněčnou linii s LPS-indukovaným zánětem (1 µg/ml), přičemž nejvýznamnějšího poklesu hladiny TNFα dosáhl při použití 100 µg/ml. Také autoři práce Zawistowska-Deniziak et al. (2017) sledovali účinky HdES na THP-1 makrofágové linii. K buňkám nejdříve aktivovali použitím LPS (100 ng/ml) a hodinu poté buňky ošetřili HdES (5 µg/ml). I zde prokázali protizánětlivý účinek.

Z výsledků druhého experimentu je zřejmé, že všechny tři námi vytipované koncentrace extraktů a ES-produktů mají statisticky velmi významné imunomodulační účinky na makrofágy ovlivněné zánětem. Jak u buněk kultivovaných s extrakty, tak s ES-produkty byl pozorován podobný trend – genová exprese TNFα velmi významně klesla v porovnání s negativní kontrolou při použití 300 µg/ml, poté mírně vzrostla se snižující se koncentrací. Na základě těchto relativně malých rozdílů hodnot jsme se rozhodli pro použití koncentrace 200 µg/ml u všech tří typů extraktů pro následující experiment, vzhledem k náročnosti jejich přípravy.

Třetí experiment – analýzy cytokinů

V této finální části studie jsme se zaměřili na samotný imunomodulační vliv extraktů a ES-produktů *H. diminuta* na *in vitro* makrofágové buněčné linii ovlivněné i neovlivněné zánětem. Pro zmapování imunitní odpovědi jsme analyzovali genovou expresi cytokinů TNFα, IL-10, IL-1β, transkripčního faktoru STAT6 a receptoru IL-17re.

Analýza TNF α

Cytokin TNF α je jedním z hlavních představitelů proteinů akutní fáze zánětu, což je také důvod, proč bývá hodnocení aktivity TNF α častou volbou při testování imunomodulačních procesů (např. Johnston et al., 2010; Zawistowska-Deniziak et al., 2017; Jirků Pomajbíková et al., 2018).

Z výsledků našeho experimentu lze konstatovat, že HdES a HdL vyvolávají v makrofágách neovlivněných zánětem silný pro-zánětlivý účinek oproti extraktům HdA, na které buňky reagují o poznání mírněji. Tento trend (mírná reakce na HdA) je pozorován napříč všemi zbylými cytokinovými analýzami této studie.

U skupiny buněk ovlivněných LPS jsme pozorovali výrazné snížení genové exprese TNF α oproti pozitivní kontrole při použití obou typů extraktů i HdES. Ve studii Johnston et al. (2010) sledovali vliv extraktů z *H. diminuta* a jejich výsledky korespondují s našimi, tedy zaznamenali podobný protizánětlivý účinek. Snížení hladiny TNF α zaznamenali také Zawistowska-Deniziak et al. (2017), kteří zvolili pro sledování hladiny cytokinů metodu ELISA a jejich výsledky ukázaly sice nízké ale signifikantní snížení TNF α u skupiny buněk s LPS, v případě buněk neovlivněných LPS nedošlo k signifikantním rozdílům koncentrací TNF α . Kromě HdES testovali také působení celého červa, ovšem taktéž bez statisticky významných rozdílů hodnot jak u buněk s LPS, tak bez užití LPS (Zawistowska-Deniziak et al., 2017).

Na základě těchto výsledků můžeme usuzovat, že HdES/A/L mají pozitivní efekt na zmírnění protizánětlivých procesů v buňkách makrofágů.

Analýza IL-10

Interleukin-10 hraje velmi významnou roli v imunitních proti-zánětlivých procesech jakožto inhibitor Th1 imunitní odpovědi (Couper et al., 2008). Kromě funkce imunosupresivní je mu připisována taktéž funkce regulační – např. potlačuje produkci pro-zánětlivých cytokinů, podporuje diferenciaci střevních makrofágů, inhibuje prezentaci antigenu u makrofágů potlačením exprese hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC-II, major histocompatibility complex) a kostimulačních molekul nebo zajišťuje integritu střevních

epiteliálních buněk (De Waal Malefyt, 1991; Zigmond et al., 2014; Shouval et al., 2014; Li et al., 2015; Quiros et al., 2017).

Autoři publikace Zawistowska-Deniziak et al. (2017) potvrdili signifikantní snížení IL-10 v porovnání s negativní kontrolou u *in vitro* lidských THP-1 buněk s LPS kultivovaných s ES-produkty z *H. diminuta*. Zvýšení genové exprese IL-10 v průběhu kolonizace *H. diminuta* pozorovali také ve studiích Parfrey et al. (2017) a Jirků-Pomajbíková et al. (2018) na *in vivo* potkaním modelu a taktéž Persaud et al. (2007) zaznamenali nárůst IL-10 při *in vivo* experimentech zaměřených na zmírnění kolitidy testovaných na myších. Ve všech těchto zmíněných studiích komentují zvýšení IL-10 jako proti-zánětlivý regulační efekt.

Výsledky našich experimentů ukázaly, že makrofágy neovlivněné zánětem reagovaly rapidním zvýšením hladiny genové exprese IL-10 na kultivaci s HdES a s HdL v porovnání s negativní kontrolou, což kopíruje výsledky TNF α . Je tedy možné, že makrofágy vnímají HdES a HdL jako aktivátory zánětu a produkcí IL-10 se snaží docílit inhibice pro-zánětlivých cytokinů. Existují studie, které popisují možnost přeprogramování IL-10 pod vlivem působení INF γ (interferon- γ). Takto řízený IL-10 aktivuje STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), který má pro-zánětlivý efekt (Mühl, 2013).

Naproti tomu na extrakty z dospělce reagovaly buňky jen minimálním zvýšením hladiny IL-10 (stejně jako v případě TNF α) oproti negativní kontrole. Extrakt z dospělce HdA se tedy zdají být nejvhodnější použitelnou alternativou pro případnou preventivní biologickou terapii, protože nejen že v podstatě nevyvolávají pro-zánětlivou odezvu u makrofágů bez LPS, ale zároveň inhibují produkci pro-zánětlivých cytokinů stejnou měrou jako v případě HdES a HdL u buněk s LPS. U skupin buněk ovlivněných zánětem došlo jen k minimálnímu zvýšení hladiny genové exprese IL-10 oproti pozitivní kontrole a lze tedy usuzovat, že buňka reaguje jak na HdES, tak na extrakty HdA i HdL v kombinaci s LPS obdobně.

Analýza IL-1 β

Interleukin 1 β je členem rodiny IL-1, je jedním z mediátorů pro-zánětlivé imunitní odpovědi a autoimunitních poruch (Masters et al., 2009).

Relativní genová exprese IL-1 β v našem experimentu koresponduje s předcházejícími analýzami TNF α . Buňky neovlivněné LPS reagují na HdES/L prudkým zvýšením hladiny

IL-1 β mRNA, což ukazuje na silné pro-zánětlivou reakci. V případě HdA došlo také k signifikantnímu zvýšení IL-1 β , nicméně pouze v řádu jednotek % v porovnání s negativní kontrolou.

V případě makrofágů s LPS-indukovaným zánětem jsme zaznamenali signifikantní snížení hladiny IL-1 β vlivem kultivace s HdES a statisticky velmi významný pokles IL-1 β u buněk ošetřených HdA v porovnání s pozitivní kontrolou. Tato data opět potvrzují proti-zánětlivý vliv extraktů z dospělce *H. diminuta* a jejich preventivní účinky. Oproti tomu Zawistowska-Deniziak et al. (2017) neprokázali signifikantní snížení IL-1 β po kultivaci THP-1 buněk s ES-produkty z *H. diminuta* u buněk s LPS v porovnání s kontrolní skupinou. Je možné, že tyto rozdílné výsledky mohou souviset s nižší použitou koncentrací LPS (100 ng/ml) v případě výzkumu Zawistowska-Deniziak et al. (2017).

Johnston et al. (2010) ve své studii použili analýzu IL-1 β jako důkaz proti-zánětlivých imunomodulačních účinků extraktů z *H. diminuta* na THP-1 makrofázích. Výsledky jejich zkoumání odhalily signifikantní snížení produkce IL-1 β oproti kontrolní skupině u buněk s LPS-indukovaným zánětem.

Analýza transkripčního faktoru STAT6

Autoři studie Czimmerer et al. (2018) prokázali, že transkripční faktor STAT6 aktivovaný prostřednictvím interleukinu 4 (IL-4) je nezbytný pro přímou transkripční represi genů zahrnutých v polarizaci makrofágů klasickou cestou na M1. V konečném důsledku to znamená, že signální dráha IL-4 – STAT6 vyvolává utlumení odpovědi makrofágů na zánětlivé podněty. Tomuto tvrzení odpovídá také fakt, že STAT6-deficitní myši mají narušenou produkci IgE proti helmintům a nejsou schopny je vyloučit (Shaheen & Broxmeyer, 2018). Hunter et al. (2005) se pokoušeli použitím tasemnice *H. diminuta* ochránit STAT6-deficitní myši před uměle vyvolanou DNBS-kolitidou (dinitrobenzene sulfonic acid), nicméně experiment nebyl úspěšný.

Dle našich výsledků je zřejmé, že makrofágy reagují na ES-produkty (HdES) a extrakt z larvocyst (HdL) snížením genové exprese STAT6 ve srovnání s negativní kontrolou, což opět koresponduje s výše popsány analýzami cytokinů. Je patrné, že v případě makrofágů inkubovaných s HdES a HdL probíhá polarizace klasickou cestou (M1), tedy pro-zánětlivou. Oproti tomu u makrofágů inkubovaných s extraktem z dospělce (HdA) nebyl pozorován žádný

rozdíl v hladinách exprese STAT6. Také skupiny makrofágů s indukovaným LPS-zánětem nejevily změny v expresi STAT6 oproti pozitivní kontrole.

Z těchto výsledků lze soudit, že proti-zánětlivý účinek HdES/A/L u buněk s LPS-indukovaným zánětem (doložený výše popsanými cytokinovými analýzami) není způsoben vlivem STAT6 transkripčního faktoru.

Analýza receptoru IL-17re

Interleukin 17 receptor E (IL-17re) je součástí receptoru pro epiteliální interleukin-17C (IL-17C), který bývá popisován jako mediátor pro-zánětlivé imunitní reakce (Song et al., 2011). Bylo dokázáno, že IL-17C stimuluje uvolnění TNF α a IL-1 β z THP-1 makrofágové buněčné linie (Li et al., 2000). Autoři publikace Song et al. (2011) také potvrdili, že receptor IL-17re reguluje vrozenou časnou imunitní odpověď vůči střevním patogenům.

Naše výsledky ukazují, že genová exprese receptoru IL-17re se rapidně sníží po kultivaci buněk s HdES a HdL oproti negativní kontrole. Je tedy zřejmé že sníženou expresí receptoru makrofágy reagují na zánětlivé procesy (prokázány výše) uvnitř buňky. Podle předpokladu zůstává reakce na HdA u buněk bez LPS bez rozdílu hladin IL-17re v porovnání s negativní kontrolní skupinou. Co se týče exprese receptoru IL-17re u buněk ovlivněných zánětem, nedošlo k žádným signifikantním změnám hladin genové exprese ve srovnání s kontrolní LPS skupinou pravděpodobně proto, že pro makrofágy ovlivněné zánětem nemají receptory IL-17re významný užitek v imunitních dějích.

Našimi experimenty bylo dokázáno, že extrakty z dospělce (HdA) vyvolají na potkaních derivovaných makrofágách jen velice mírnou imunitní reakci. Navíc, pokud je použijeme jako preventivní aktivátory makrofágů (tedy s časovým předstihem před indukcí zánětu bakteriálními LPS), jsou schopné zmírnit projevy pro-zánětlivé reakce snížením produkce cytokinů zahrnutých v Th1 imunitní odpovědi. Tento významný jev je způsoben pravděpodobně určitými zatím neidentifikovanými komponenty z těla dospělé tasemnice *H. diminuta*. Zdá se, že tyto složky jsou schopné inhibovat celkové (tj. pro- i proti-zánětlivé) imunitní projevy u potkaních makrofágů neovlivněných zánětem. Z širšího úhlu pohledu tato myšlenka koresponduje s faktem, že živé dospělé tasemnice *H. diminuta* dokáží rafinovaně modulovat hostitelovu imunitní odpověď tak dokonale, že i její ES-produkty, významně pro-zánětlivě působící složky potvrzené touto studií, zůstanou bez povšimnutí hostitelova

imunitního systému a tasemnice si tak zajistí své přežití. Pro hlubší poznání tohoto projevu bude zapotřebí se zaměřit přímo na složky vycházející z hrubého extraktu *H. diminuta* a poznat jejich působení podrobněji. S myšlenou identifikovat proteiny z těla dospělé tasemnice *H. diminuta* přišli poměrně nedávno Młocicki et al. (2018), přičemž na základě výzkumu přibližně u poloviny z 76 analyzovaných proteinů předpokládají imunogenní povahu.

V úplném závěru diskuze můžeme shrnout, že díky této studii byly odhaleny preventivní účinky *H. diminuta* poprvé i na potkaním *in vitro* makrofágovém modelu s indukovaným zánětem. Zároveň se ukázalo, že imunomodulační cesty působení tasemnice *H. diminuta* na organizmus hostitele jsou velice komplexní a pro úplné pochopení těchto spletitých drah bude potřeba zahrnout vliv i ostatních faktorů např. dalších buněk imunitního systému nebo střevního mikrobiomu, který taktéž hraje významnou roli v hostitelově imunitním systému (Reynolds et al., 2015; Brosschot & Reynolds, 2018).

6 ZÁVĚR

V rámci této práce byly sledovány účinky exkrečních/sekrečních produktů (HdES) a extraktů získaných z larválního stádia (HdL) tasemnice *Hymenolepis diminuta* a z dospělce (HdA). Účinky byly testovány na *in vitro* modelu potkaních z monocytů-derivovaných makrofágách izolovaných z kostní dřeně. Pro sledování vlivu těchto extraktů byla analyzována genová exprese cytokinů TNF α , IL-10, IL-1 β , transkripčního faktoru STAT6 a receptoru IL-17re.

Nejdříve potřeba určit vhodný časový bod pro analýzy zvolených cytokinů. Pro tyto účely byly vytipovány intervaly 4, 8, 12 a 24 hodin od vyvolání zánětu bakteriálními lipopolysacharidy (LPS). Analyzována byla hladina TNF α mRNA, která dosahovala nejvyšších hodnot po 4 hodinách od indukce zánětu. Čtyřhodinový interval byl tedy zvolen jako nejvhodnější.

Dále bylo zapotřebí zvolit optimální koncentraci extraktů HdA a HdL a produktů HdES, která bude mít protizánětlivý účinek. Všechny tři typy extraktů byly aplikovány v koncentracích 100, 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$ na makrofágy posléze ovlivněné LPS. Opět byla analyzována exprese TNF α . Na základě výsledků byla zvolena koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ pro všechny tři typy extraktů.

Finální fáze této studie zahrnovala analýzu genové exprese buněk ovlivněných HdA, HdL nebo HdES a výsledky těchto analýz byly porovnány s hodnotami genové exprese buněk posléze ovlivněných zánětem. U všech tří typů extraktů byl pozorován silný imunomodulační efekt. Makrofágy neovlivněné zánětem reagovaly na HdES a HdL pro-zánětlivou imunitní odpovědí, oproti tomu na extrakty HdA reagovaly jen velice mírně. V případě makrofágů s LPS-indukovaným zánětem došlo ke zmírnění pro-zánětlivé imunitní odpovědi jak vlivem extraktů HdA a HdL, tak vlivem HdES produktů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Baillie J. K., Arner E., Daub C., De Hoon M., Itoh M., Kawaji H., Lassmann T., Carninci P., Forrest A. R. R., Hayashizaki Y., FANTOM Consortium, Faulkner G. J., Wells C. A., Rehli M., Pavli P., Summers K. M. & Hume D. A. (2017). Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease. *PLOS Genetics*, 13: 1-36.

Bauer M. E., & Teixeira A. L. (2018). Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1437: 1-11.

Bilbo S. D., Wray G. A., Perkins S. E. & Parker W. (2011). Reconstitution of the human biome as the most reasonable solution for epidemics of allergic and autoimmune diseases. *Medical Hypotheses*, 77:494–504.

Brosschot T. P., & Reynolds L. A. (2018). The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity. *Mucosal Immunology*, 11: 1039–1046.

Couper K. N., Blount D. G. & Riley E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180: 5771–5777.

Czimmerer Z., Daniel B., Horvath A., Ruckerl D., Nagy G., Kiss, M., Peloquin M., Budai M. M., Cuaranta-Monroy I., Simandi Z., Steiner L., Nagy B., Poliska S., Banko C., Bacso Z., Schulman I. G., Sauer S., Deleuze J. F., Allen J. E., Benko S. & Nagy L. (2018). The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity*, 48: 75–90.

De Waal Malefyt R. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine*, 174: 915–924.

Ditgen D., Anandarajah E. M., Meissner K. A., Brattig N., Wrenger C. & Liebau E. (2014). Harnessing the helminth secretome for therapeutic immunomodulators. *BioMed Research International*, 2014: 1–14.

- El-Gabalawy H., Guenther L. & Bernstein C. (2010).** Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: Incidence, prevalence, natural history, and comorbidities. *The Journal of Rheumatology*, 37: 2–10.
- Elliott D. E. & Weinstock J. V. (2012).** Helminth–host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Science*, 1247: 83–96.
- Filyk H. A. & Osborne L. C. (2016).** The microbiome: the intestinal ecosystem’s influence on immune homeostasis, health, and disease. *EBioMedicine*, 13: 46–54.
- Finlay C. M., Stefanska A. M., Walsh K. P., Kelly P. J., Boon L., Lavelle E. C., Walsh P. T. & Mills K. H. G. (2015).** Helminth products protect against autoimmunity via innate type 2 cytokines IL-5 and IL-33, which promote eosinophilia. *The Journal of Immunology*, 196: 703–714.
- Fleming J. O. & Weinstock J. V. (2015).** Clinical trials of helminth therapy in autoimmune diseases: rationale and findings. *Parasite Immunology*, 37: 277–292.
- Garcia L. S. (2006).** Intestinal cestodes, In: Diagnostic medical parasitology, 5th ed., ASM Press, Washington D. C., pp. 357-380. ISBN 978-15-5581-380-2.
- Girgis N. M., Gundra U. M. & Loke P. (2013).** Immune regulation during helminth infections. *PLoS Pathogens*, 9: e1003250.
- Harnett M. M. & Harnett W. (2017).** Can parasitic worms cure the modern world’s ills? *Trends in Parasitology*, 33: 694–705.
- Helmby H. (2015).** Human helminth therapy to treat inflammatory disorders – where do we stand? *BMC Immunology*, 16: 1–5.
- Hendrix C. M. & Robinson E. (2012).** Tapeworms that parasitize domestic animals and humans, In: Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians, 4th ed., Elsevier Health Sciences, St. Louis, pp. 94-122.
- Hunter M. M., Wang A., Hirota C. L. & 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.

- Cheng A. M., Jaint D., Thomas S., Wilson J. & Parker W. (2015).** Overcoming evolutionary mismatch by self-treatment with helminths: current practices and experience. *Journal of Evolutionary Medicine*, 3: 1-22.
- Chervy L. (2002).** The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology*, 52: 1–33.
- Jirků Pomajbíková K., Jirků M., Levá J., Sobotková K., Morien E. & Parfrey L. W. (2018).** The benign helminth *Hymenolepis diminuta* ameliorates chemically induced colitis in a rat model system. *Parasitology*, 145: 1324-1335.
- Johnston M. J. V., Wang A., Catarino M. E. D., Ball L., Phan V. C., MacDonald J. A. & 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.
- Kaser A., Zeissig S. & Blumberg R. S. (2010).** Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology*, 28: 573–621.
- Kuek A., Hazleman B. L. & Ostor A. J. K. (2007).** Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgraduate Medical Journal*, 83: 251–260.
- Lerner A., Jeremias P. & Matthias T. (2015).** The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *International Journal of Celiac Diseases*, 3: 151-155.
- Li B., Gurung P., Malireddi R. K. S., Vogel P., Kanneganti T.-D. & Geiger T. L. (2015).** *IL-10* engages macrophages to shift Th17 cytokine dependency and pathogenicity during T-cell-mediated colitis. *Nature Communications*, 6: 1-13.
- Li H., Chen J., Huang A., Stinson J., Heldens S., Foster J., Dowd P., Gurney A. L. & Wood W. I. (2000).** Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 773–778.
- Liu J., Morey R. A., Wilson, J. K. & Parker W. (2017).** Practices and outcomes of self-treatment with helminths based on physician’s observations. *Journal of Helminthology*, 91: 267-277.

- Lopes F., Leung G., Wang A., McKay D. M., Reyes J. L. & Lopes F. (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.
- Lukeš J., Kuchta R., Scholz T. & Pomajbíková K. (2014).** (Self-) infection with parasites: re-interpretations for the present. *Trend Parasitol*, 30: 377–85.
- Madej M. P., Töpfer E., Boraschi D. & Italiani P. (2017).** Different regulation of interleukin-1 production and activity in monocytes and macrophages: innate memory as an endogenous mechanism of IL-1 inhibition. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 1-12.
- Maizels R. M., Smits H. H. & McSorley H. J. (2018).** Modulation of host immunity by helminths: the expanding repertoire of parasite effector molecules. *Immunity*, 49: 801–818.
- Martinez F. O. & Gordon S. (2014).** The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6: 1-13.
- Masters S. L., Simon A., Aksentijevich I. & Kastner D. L. (2009).** Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annual Review of Immunology*, 27: 621–668.
- McKay D. M. (2010).** The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, 137: 385–94.
- McKenney E. A., Williamson L., Yoder A. D., Rawis J. F., Bilbo S. D. & Parker W. (2015).** Alteration of the rat cecal microbiome during colonization with the helminth *Hymenolepis diminuta*. *Gut Microbes*, 6: 182–33.
- Młocicki D., Sulima A., Bień J., Näreaho A., Zawistowska-Deniziak A., Basalaj K., Salamatin R., Conn D. B. & Savijoki K. (2018).** Immunoproteomics and surfaceomics of the adult tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-14.
- Molodecky N. A., Soon I. S., Rabi D. M., Ghali W. A., Ferris M., Chernoff G., Benchimol E. I., Panaccione R., Ghosh S., Barkema H. W. & Kaplan G. (2012).** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterol*. 142: 46-54.
- Mühl, H. (2013).** Pro-inflammatory signaling by IL-10 and IL-22: bad habit stirred up by interferons? *Frontiers in Immunology*, 4: 1-10.

- Nascimento Santos L., Carvalho Pacheco L. G., Silva Pinheiro C. & Alcantara-Neves N. M. (2017).** Recombinant proteins of helminths with immunoregulatory properties and their possible therapeutic use. *Acta Tropica*, 166: 202–211.
- Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A. B. & Ley K. (2019).** Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10: 1-14.
- Parameswaran N. & Patial S. (2010).** Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 20: 87–103.
- Parfrey L. W., Jirků M., Šíma R., Jalovecká M., Sak B., Grigore K. & Jirků Pomajbíková K. (2017).** A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system. *Plos One* 12, e0182205.
- Parker W. & Ollerton J. (2013).** Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2013: 89–103.
- Parker W. (2014).** The “hygiene hypothesis” for allergic disease is a misnomer. *The BMJ*, 349: 10–11.
- Pawankar R. (2014).** Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, 7: 1–3.
- Persaud R., Wang A., Reardon C. & McKay D. M. (2007).** Characterization of the immunoregulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *International Journal for Parasitology*, 37, 393–403.
- Pfaffl M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 10 h, 29: 45e–45.
- Quiros M., Nishio H., Neumann P. A., Siuda D., Brazil J. C., Azcutia V., Hilgarth R., O’Leary M. N., Garcia-Hernandez V., Leoni G., Feng M., Bernal G., Williams H., Dedhia P. H., Gerner-Smidt C., Spence J., Parkos C. A., Denning T. L. & Nusrat A. (2017).** Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling, *The Journal of Clinical Investigation*, 127: 3510–3520.

Reyes J. L., Lopes F., Leung G., Mancini N. L., Matisz C. E., Wang A., Thomson E. A., Graves N., Gilleard J. & McKay D. M. (2016). Treatment with Cestode parasite antigens results in recruitment of CCR2 + myeloid cells, the adoptive transfer of which ameliorates colitis. *Infection and Immunity*, 84: 3471–3483.

Reynolds L. A., Finlay B. B. & Maizels R. M. (2015). Cohabitation in the intestine: interactions among helminth parasites, bacterial microbiota, and host immunity. *The Journal of Immunology*, 195: 4059–4066.

Roberts L. S., Janovy J. & Nadler S. (2013). Foundations of Parasitology, 9th ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, 670 pp. ISBN: 9780073524191.

Rook G. A. (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42: 5–15.

Rook G. A. W., Raison C. L. & Lowry C. A. (2014). Microbial “old friends”, immunoregulation and socioeconomic status. *Clinical & Experimental Immunology*, 177: 1–12.

Řežábková L., Brabec J., Jirků M., Dellerba M., Kuchta R., Modrý D., Parker W. & Pomajbíková, K. J. (2019). Genetic diversity of the potentially therapeutic tapeworm *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology International*. 71: 121-125.

Shaheen M., & Broxmeyer H. E. (2018). Cytokine/receptor families and signal transduction. *Hematology*, 163–175.

Shepherd C., Navarro S., Wangchuk P., Wilson D., Daly N. L. & Loukas A. (2015). Identifying the immunomodulatory components of helminths. *Parasite Immunology*, 37: 293–303.

Shouval D. S., Biswas A., Goettel J. A., McCann K., Conaway E., Redhu N. S., Mascanfroni I. D., Al Adham Z., Lavoie S., Ibourk M., Nguyen D. D., Samsom J. N., Escher J. C., Somech R., Weiss B., Beier R., Conklin L. S., Ebens C. L., Santos F. G., Ferreira A. R., Sherlock M., Bhan A. K., Müller W., Mora J. R., Quintana F. J., Klein C., Muise A. M., Horwitz B. H. & Snapper S. B. (2014). Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity*, 40: 706–719.

- Smallwood T. B., Giacomini P. R., Loukas A., Mulvenna J. P., Clark R. J. & Miles J. J. (2017).** Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Frontiers in Immunology*, 8: 1-15.
- Smyth K., Morton C., Mathew A., Karuturi S., Haley C., Zhang M., Holzknecht Z. E., Swanson C., Lin S. S. & Parker W. (2017).** Production and use of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids as anti-inflammatory therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, 6: 1-20.
- Sobotková K., Parker W., Levá J., Růžková J., Lukeš J. & Jirků Pomajbíková K. (2019).** Helminth therapy – from the parasite perspective. *Trends in Parasitology*, 35: 501-515.
- Song X., Zhu S., Shi P., Liu Y., Shi Y., Levin S. D. & Qian Y. (2011).** IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature Immunology*, 12: 1151–58.
- Strachan D. P. (1989).** Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299: 1259–60.
- Sulima A., Bień J., Savijoki K., Näreaho A., Salamatin R., Conn D. B. & Młocicki D. (2017).** Identification of immunogenic proteins of the cysticercoid of *Hymenolepis diminuta*. *Parasites & Vectors*, 10: 1-12.
- Summers R. W., Elliott D. E., Urban J. F., Thompson R. A. & Weinstock J. V. (2005a).** *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128: 825–832.
- Summers R. W., Elliott D. E., Urban Jr J. F., Thompson, R. & Weinstock J. V. (2005b).** *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54: 87–90.
- Wammes L. J., Mpairwe H., Elliott A. M. & Yazdanbakhsh M. (2014).** Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *The Lancet Infectious Diseases*, 14: 1150–1162.
- Wang M., Wu L., Weng R., Zheng W., Wu Z. & Lv Z. (2017).** Therapeutic potential of helminth in autoimmune disease: helminth-derived immune-regulators and immune balance. *Parasitology Research*, 116: 2065-2074.
- Weinstock J.V. (2012).** The worm returns. *Nature*, 491: 183–185.

Williamson L. L., Mckenney E. A., Holzkecht Z. E., Belliveau C., Rawls J. F., Poulton S., Parker W. & Bilbo S. D. (2016). Got worms ? Perinatal exposure to helminths prevents persistent immune sensitization and cognitive dysfunction induced by early-life infection. *Brain Behavior and Immunity*, 51: 14–28.

Xiong Y. & Hales D. B. (1993). Expression, regulation, and production of tumor necrosis factor-alpha in mouse testicular interstitial macrophages *in vitro*. *Endocrinology*, 133: 2568–2573.

Zawistowska-Deniziak A., Basalaj K., Strojny B. & Mlocicki D. (2017). New data on human macrophages polarization by *Hymenolepis diminuta* tapeworm - an *in vitro* study. *Frontiers in Immunology*, 8: 1-15.

Zigmond E., Bernshtein B., Friedlander G., Walker C. R., Yona S., Kim K.-W., Brenner O., Krauthgamer R., Varol C., Müller W. & Jung S. (2014). Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*, 40: 720–733.