

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Sledování změn genové exprese interleukinu 10
u potkana jako modelového organismu v průběhu
infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta***

Bakalářská práce

Jana Levá

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel specialista: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2017

Levá J., (2017): Sledování změn genové exprese interleukinu 10 u potkana jako modelového organismu v průběhu infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta* [Interleukin 10 gene expression mobilized by rats during *Hymenolepis diminuta* infection. Bc. Thesis, in Czech] - 28 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

In this study, we examined the gene expression of interleukin 10 (IL-10) mobilized by rats during prepatent and patent period of *Hymenolepis diminuta* infection. Relative IL-10 gene expression was determined from blood samples using real-time PCR. Our results showed that IL-10 gene expression is significantly increased in the beginning of the prepatent period of *H. diminuta* infection in the rat model system.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, PhD. za poskytnutí cenných rad, připomínek, za její trpělivost a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Mé díky patří také odbornému školiteli RNDr. Milanovi Jirků za jeho ochotu, vstřícnost a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat RNDr. Radku Šímovi, PhD. za pomoc, ochotu a cenné rady při vyhodnocování získaných dat. Mimořádné díky patří také mé rodině za velkou podporu během celého studia.

Tato práce byla částečně financována z grantového projektu Studentské grantové agentury (SGA) PřF JU.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Helminti	1
1.2. Helminti a helmintoterapie	2
1.2.1. Imunomodulační mechanizmy helmintů	3
1.2.1.1. Th2 imunitní odpověď	3
1.2.2. Helminti v helmintoterapii.....	4
1.3. <i>Hymenolepis diminuta</i>	7
1.3.1. Vývojový cyklus <i>Hymenolepis diminuta</i>	7
1.3.2. Morfologie životních stádií <i>Hymenolepis diminuta</i>	8
1.3.3. Imunomodulační efekt <i>Hymenolepis diminuta</i>	9
1.3.4. Infekce člověka tasemnicemi rodu <i>Hymenolepis</i>	9
2. Cíl práce	11
3. Materiál a metody	12
3.1. Plán experimentu	12
3.2. Kultivace helminta.....	13
3.3. Experimentální zvířata	13
3.3.1. Outbrední potkani	13
3.4. Genová exprese interleukinu 10.....	14
3.5. Statistické analýzy	16
4. Výsledky	17
4.1. Experiment A.....	17
4.2. Experiment B	17
5. Diskuze	19
6. Závěr	23
7. Seznam použité literatury	24

1. Úvod

V posledních desetiletích byl u lidí ve vyspělých zemích zaznamenán prudký nárůst prevalence autoimunitních onemocnění (Lerner et al., 2015). Tento nárůst není dosud zcela objasněn, ale na základě „Old friends“ hypotézy se předpokládá, že je spojen s moderním způsobem života (Rook, 2012). Tento životní styl obnáší vysoké hygienické standardy, nadměrné užívání antibiotik a eradikaci parazitů, zejména helmintů (Hernandez et al., 2013; Rook, 2012). Na základě epidemiologických studií bylo zjištěno, že u lidí v zemích třetího světa, kde jsou helmintózy časté, nebyl zaznamenán vyšší nárůst autoimunitních onemocnění (např. Yazdanbakhsh et al., 2002; Weinstock, 2012). Na základě takového zjištění začal být zkoumán vliv helmintů, nejčastěji zástupců tříd Cestoda, Nematoda a Trematoda, na výše zmíněná onemocnění (Helmby, 2009; Johnston et al., 2009; Summers et al., 2003; Zaccane et al., 2013). Dosud bylo objasněno několik imunomodulačních mechanismů, kterými helminti ovlivňují organizmus hostitele (Elliott & Weinstock, 2012; Weinstock & Elliott, 2014; Zaccane et al., 2013). Nejpodstatnějším mechanismem je indukce Th2 imunitní odpovědi u hostitele spojená s produkcí protizánětlivých cytokinů, která vede k inhibici Th1 imunitní odpovědi a následnému potlačení zánětlivých procesů (Hunter et al., 2005; McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2013).

1.1. Helminti

Helminti jsou skupina různorodých organismů, do které jsou zahrnováni platyhelminté (Cestoda, Trematoda, Monogenea), hlístice (Nematoda), vrtejší (Acanthocephala), dále pak vířníci, parazitické ploštěnky, strunovci, pijavky a pásnice (Volf & Horák, 2007).

Třída **Cestoda** zahrnuje okolo 5000 druhů tasemnic. Jsou to parazité všech skupin obratlovců. Nejvíce tasemnic nalezneme u ryb a paryb. Většina tasemnic, až na výjimky, kolonizuje trávicí soustavu. Třída **Trematoda** zahrnuje okolo 8000 druhů. Jedná se především o endoparazity obratlovců, částečně o ektoparazity. Mohou parazitovat ve všech orgánových soustavách (trávicí soustava, dýchací soustava, krev, nervová soustava, urogenitální soustava atd.). Třída **Nematoda** jsou hlístice, parazité obratlovců, bezobratlých i rostlin. Někteří zástupci žijí volným způsobem života. Dodnes je popsáno téměř 20 tisíc druhů. Hlístice jsou lokalizovány v různých orgánových soustavách, např. krevní či lymfatický oběh, trávicí soustava, nervová, dýchací, urogenitální soustava, srdce, tělní dutiny či kůže (Roberts et al., 2013; Volf & Horák, 2007).

Helminti mají různý vývojový cyklus, který zahrnuje jednoho i více hostitelů, tzv. definitivních hostitelů a mezihostitelů. V této skupině nacházíme jak jedince s přímým vývojovým cyklem (jeden hostitel), tak s nepřímým cyklem, který může být dvouhostitelský, tříhostitelský, ojediněle čtyřhostitelský i vícehostitelský (Volf & Horák, 2007). U některých helmintů se setkáváme s tzv. paratenickým hostitelem. V tomto se pouze hromadí larvální stádia, u kterých nedochází k dalšímu vývoji, ale jsou infekce schopná pro dalšího hostitele. Pro přežití helmintů v hostiteli je velmi důležitá jejich adaptace. Taková adaptace může spočívat např. v různých způsobech maskování [hostitelské molekuly jsou začleněny do struktur na povrchu helminta], obraně proti hostitelově imunitě [obměna povrchových antigenů, blokování kaskády komplementu] nebo morfologické adaptace [přichycovací orgány] (Volf & Horák, 2007).

Někteří helminti jsou organizmy, které pro sebe získávají živiny z hostitelského organismu a se svým hostitelem jsou v symbiotickém vztahu (Volf & Horák, 2007). Dle povahy tohoto soužití je možné helminty dělit do několika skupin, a to např. parazitů, komezálové či mutualisté. Pokud helmint na svém hostiteli parazituje, škodí mu a prospěch z tohoto soužití je pouze na straně parazita, jedná se o parazitismus. Naopak mutualismus je vzájemné soužití dvou a více organismů, z kterého mají prospěch všichni zúčastnění. Komensalismus je dalším příkladem soužití, kdy jeden organismus má užitek, druhý ne, ale tento není poškozován.

1.2. Helminti a helmintoterapie

Helminti dokáží žít spolu se svým hostitelem po dlouhou dobu až v řádech desítek let. U těchto organismů se vyvinuly různé důmyslné strategie pro jejich přežití v hostiteli, zejména pak schopnost manipulovat s imunitou svého hostitele (Ditgen et al., 2014; Elliott & Weinstock, 2012; Girgis et al., 2013). Vzhledem k imunomodulační schopnosti helmintů v organismu hostitele, infekce některými z nich mohou mít pozitivní vliv na průběh autoimunitních onemocnění u lidí a tak mohou být potencionálně využity k jejich terapii, tzv. helmintoterapii (Helmbly, 2015; Weinstock, 2012; Weinstock & Elliott, 2014). Principem helmintoterapie je striktně kontrolovaná infekce nepatogenním či mírně patogenním helmintem (Weinstock, 2012).

K rozvoji helmintoterapie přispělo zformulování tzv. „Old Friends“ hypotézy (Rook, 2012). Podle této hypotézy se evoluce člověka pojí s vytvořením úzkých a velmi složitých vztahů mezi jeho organismem a mnoha dalšími organismy (tj. viry, bakterie, jednobuněčné houby, prvoci a helminti), kteří napomáhají k potřebnému rozvoji imunitního systému

a imunoregulaci. Dle „Old Friends“ hypotézy došlo k narušení těchto křehkých vztahů v době druhé epidemiologické transmise (tj. průmyslová revoluce), kdy společenstvo lidí začalo přecházet na tzv. moderní způsob života (Rook, 2012). Moderní životní styl zahrnuje přehnané zvýšení hygienických návyků lidí ve vyspělých zemích, chemické ošetřování vody, snížení potravní pestrosti, omezený kontakt se zvířaty, nadměrné užívání antibiotik a v neposlední řadě dehelmintizaci. Toto vše postupně vedlo k následnému narušení rovnováhy imunitního systému a imunoregulace člověka a také k rozvoji různých autoimunitních onemocnění (Ditgen et al., 2014; Falcone & Pritchard, 2005; Rook, 2012). Tento fakt platí především pro západní civilizace. Na podkladě této hypotézy bylo provedeno mnoho experimentů, které prokázaly, že někteří helminti mohou svými imunomodulačními schopnostmi pozitivně ovlivňovat průběh a projev autoimunitních onemocnění lidí (Ditgen et al., 2014; Helmbly, 2009; Hernandez et al., 2013; Weinstock & Elliott, 2014; Zacccone et al., 2013).

Autoimunitní onemocnění, např. idiopatické střevní záněty, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, *diabetes mellitus* I, spadají společně s alergiemi do komplexu imunitně zprostředkovaných onemocnění (Kuek et al., 2007; Williams & Meyers, 2002). V souvislosti s terapií helminty jsou nejčastěji studovanými onemocněními idiopatické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). Jedná se o chronická, recidivující zánětlivá onemocnění tenkého a tlustého střeva, která jsou vyvolána aktivací Th1 typu imunitní odpovědi (Kaser et al., 2010; Weinstock & Elliott, 2014; Wilson & Maizels, 2003).

1.2.1. Imunomodulační mechanismy helmintů

Helminti mají schopnost modulovat imunitní systém svého hostitele (McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2014). Existuje několik možných mechanismů, kterými helminti ovlivňují imunitní systém svého hostitele a které mohou být využité při terapii autoimunitních onemocnění či alergií (Ditgen et al., 2014; Elliott & Weinstock, 2012; McSorley et al., 2013). V těle hostitele vyvolají např. aktivaci makrofágů, dendritických buněk a B buněk, expresi Foxp3, aktivaci regulačních CD4⁺ T buněk a následně vznik Th2 imunitní odpovědi a s ní související produkci protizánětlivých cytokinů (Ditgen et al., 2014; Elliott & Weinstock, 2012; McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2014).

1.2.1.1. Th2 imunitní odpověď

Jedním ze stěžejních mechanismů, kterými helminti ovlivňují imunitní systém hostitele, je schopnost indukovat Th2 imunitní odpověď (McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2014). Tato je zprostředkovávána CD4⁺ T pomocnými buňkami typu 2 (Th2 buňky) a s nimi

spojenou produkcí protizánětlivých cytokinů, jako jsou interleukiny IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25, IL-31, nebo TGF- β [transforming growth factor beta] (Ditgen et al., 2014; Helmbly, 2015; Weinstock & Elliott, 2014). Tyto cytokiny mají schopnost alternativní aktivace makrofágů, dokáží mobilizovat a aktivovat další typy buněk (např. eozinofily, žírné buňky, NK buňky), efektorové molekuly (tj. protilátky IgE, IgG1, IgG4) nebo složky komplementu (Anthony et al., 2007; Ditgen et al., 2014; Elliott & Weinstock, 2012; Maizels & Holland, 1998). Cílem Th2 imunitní odpovědi hostitele je vypuzení či zničení parazita (Ditgen et al., 2014; Persaud et al., 2007). Vedlejším účinkem Th2 imunitní odezvy je inhibice prozánětlivých (Th1) imunitních procesů v hostitelském organismu. Právě tento efekt je využíván tzv. helmintoterapií pro zmírnění autoimunitních onemocnění, kde je aktivována Th1 odpověď, např. u Crohnovy choroby (Elliott & Weinstock, 2012; Hunter et al., 2005; Weinstock & Elliott, 2013).

Jedním z důležitých mediátorů Th2 imunity je interleukin 10 [IL-10] (Hunter et al., 2005; Persaud et al., 2007). Jde o takzvaný protizánětlivý cytokin, produkt Th2 buněk, který je produkován makrofágy, dendritickými buňkami, B-buňkami a různými populacemi CD4+ a CD8+T buněk. Interleukin 10 má schopnost inhibovat Th1 imunitní odpověď a pomáhá omezit tvorbu prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1, IL-6, IL-12, tumor nekrotizující faktor α - TNF- α , a také některých chemokinů (Couper et al., 2008).

1.2.2. Helminti v helmintoterapii

Dosud nejvýznamnější a nejvíce zkoumaní zástupci helmintů v souvislosti s helmintoterapií jsou hlístice *Trichuris suis*, *Necator americanus*, *Trichinella spiralis*, tasemnice *Hymenolepis diminuta* nebo motolice *Schistosoma mansoni* (Helmbly, 2015; Hernandez et al., 2013).

Trichuris suis

Trichuris suis patří mezi hlístice (Nematoda), řád Enoplida. Má přímý vývojový cyklus a jeho hostitelem jsou prasata (prase domácí, prase divoké). Člověk může být náhodným hostitelem (Beer, 1972; Volf & Horák, 2007). Dospělci jsou lokalizováni v tlustém nebo ve slepém střevě. Vajíčka *T. suis* odchází z těla hostitele spolu s jeho trusem, ve vnějším prostředí se v vajíčku vyvíjí infekční L1 larva. Po pozření infekce schopného vajíčka hostitelem se v tlustém střevě L1 larvy z vajíčka uvolňují a zavrtávají se do jeho sliznice, kde prodělávají další vývoj až do preadultního stádia L5. To se opět uvolňuje do lumen kolonu, kde dospívá a dospělci *T. suis* se opět zavrtávají zúženou přední částí do sliznice tlustého střeva (Roberts et al., 2013).

Trichuris suis indukuje u svého hostitele v průběhu somatické migrace v sliznici tlustého střeva Th2 imunitní odpověď a s ní spojenou produkci protizánětlivých cytokinů (Summers et al., 2003). Terapeutický potenciál *T. suis* byl testován v klinických studiích na pacientech s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b). Pacienti terapii s vajíčky *T. suis* dobře tolerovali a zároveň bylo pozorováno zlepšení jejich zdravotního stavu nebo dokonce remise onemocnění (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b). V rámci terapie *T. suis* byl testován a komerčně distribuován přípravek TSO® (*Trichuris suis* ova; www.ovamed.de). Jednalo se o vajíčka *T. suis*, určená k terapeutickým účelům. Bohužel byla v klinických studiích zjištěna snížená účinnost přípravku, která byla pravděpodobně způsobena nevhodným způsobem jeho přípravy (Helmbly 2015).

Necator americanus

Necator americanus patří mezi hlístice (Nematoda), řád Strongylida, má přímý vývojový cyklus, definitivním hostitelem je člověk (Volf & Horák, 2007). Vajíčka odchází z těla hostitele spolu s jeho stolicí. Ve vnějším prostředí se ve vajíčku rýhuje larva L1, která tenkostěnný obal vajíčka opouští a přeměňuje se přes L2 stádium na infekce schopnou L3 larvu. K nákaze hostitele L3 larvou dochází perkutánně nebo perorálně. V těle hostitele se larvy dostanou krví do plic, kde prodělávají další vývoj do preadultního stádia L5. Toto je přes průdušky a hltan vykašláno, spolknuto a následně se L5 stádium dostává do tenkého střeva, kde dochází k vývoji dospělců této hlístice. Dospělci se přichycují svými ústními kapsulami ke klkům tenkého střeva (Roberts et al., 2013). Infekce *N. americanus* vyvolává u hostitele silnou Th2 imunitní odpověď spolu s produkcí cytokinů IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 (Gaze et al., 2012).

V rámci helmintoterapie byl *N. americanus* testován v klinických studiích na lidech s Crohnovou chorobou, celiakií a astmatem. V případech astmatu nebylo zaznamenáno žádné výrazné zlepšení klinických příznaků onemocnění, u pacientů s celiakií byla pozorována přítomnost eozinofilů ve střevě (Davieson et al., 2011; Feary et al., 2009; McSorley et al., 2011). U menší části infikovaných pacientů s Crohnovou chorobou bylo zaznamenáno snížení indexu určujícího aktivitu onemocnění a to i 45 týdnů po infekci (Croese et al., 2005).

Trichinella spiralis

Trichinella spiralis patří mezi hlístice (Nematoda), řád Enoplida. Parazituje u řady savců včetně člověka. Dospělec je lokalizován v tenkém střevě hostitele (Volf & Horák, 2007).

Životní cyklus této hlístice probíhá pouze v těle jednoho hostitele, který je definitivním hostitelem i mezihostitelem zároveň (Volf & Horák, 2007; Roberts et al., 2013). Samice *T. spiralis* lokalizované v tenkém střevě kladou larvy L1, které se skrze stěnu střeva dostávají do krevního oběhu a následně do příčně pruhovaného svalstva. Tady se L1 larvy zapouzdří a vznikne cysta uvnitř svalového vlákna. Tato cysta s infekce schopnou L1 larvou vyčkává na požití svaloviny dalším hostitelem. V těle dalšího jedince se z cysty uvolní larvy L1, které se dále vyvíjí a dospívají (Volf & Horák, 2007).

V souvislosti s helmintoterapií byl testován efekt exkrečních a sekrečních produktů (ES-produkty) různých stádií *T. spiralis* na autoimunitní onemocnění (Bai et al., 2012; Zacccone & Hall, 2013). Tyto ES-produkty získané kultivací *T. spirallis* indukují u hostitele Th2 imunitní odpověď a zároveň produkci protizánětlivých cytokinů (Bai et al., 2012; Zacccone & Hall, 2013). Efekt *T. spiralis* byl, na rozdíl od výše zmíněných helmintických kandidátů, testován pouze na zvířecích modelech. Například použití ES-produktů z dospělců *T. spiralis* vedlo ke zlepšení indukované kolitidy u myšího modelu (Yang et al., 2014). Také byl zaznamenán pozitivní efekt na *diabetes mellitus* I opět u myšího modelu (Saunders et. al., 2007).

Schistosoma mansoni

Schistosoma mansoni patří mezi motolice (Trematoda), čeleď Schistosomatidae. Má nepřímý vývojový cyklus, definitivním hostitelem je člověk a další primáti, případně i hlodavci, a mezihostitelem je plž. Dospělci jsou lokalizováni v cévách mezenteria (Volf & Horák, 2007; Roberts et al., 2013). Vajíčko motolice opouští tělo hostitele spolu s jeho trusem, kde se z něj, ve vodním prostředí, uvolňuje první larvální stádium, tzv. miracidium, které infikuje plže. V mezihostiteli se vyvíjí další larvální stádia a to sporocysty a cercárie. Cercárie opouští plže a perkutánně infikuje definitivního hostitele a mění se na stádium schistosomuly migrující krevním řečištěm do cév mezenteria, kde dospívá (Volf & Horák, 2007).

Vajíčka *S. mansoni* obsahují látky, které mají schopnost indukovat u hostitele Th2 imunitní odpověď a ta může pozitivně ovlivnit některá autoimunitní onemocnění (Grzych et al., 1991; Zacccone et al., 2013). *Schistosoma mansoni* byla v rámci helmintoterapie testována pouze na zvířecích modelech. U myší bylo zjištěno, že ES-produkty získané z jejich vajíček a z dospělců zmírňují průběh *diabetes mellitus* I (Cooke, 1999; Zacccone & Hall, 2013; Zacccone et al., 2003). Při infekci *S. mansoni* také u myšího modelu bylo zjištěno, že dochází ke snížení příznaků autoimunitní artritidy (Osada et al., 2009).

Testování dalších vhodných kandidátů pro účely helmintoterapie

Jak bylo popsáno výše, pro účely helmintoterapie bylo testováno již několik vybraných kandidátů helmintů a to jak v klinických studiích, tak na zvířecích modelech. Nicméně jejich imunomodulační mechanismy a vlivy na imunitně zprostředkovaná onemocnění se liší, vyvstává tedy potřeba hledat další kandidáty pro nová testování. Vhodní kandidáti by měli být vybíráni na základě několika kritérií popsaných ve studii Lukeš et al. (2014):

- životní cyklus bez somatické či viscerální migrace, popřípadě s minimální migrací;
- nulová nebo nízká patogenita s minimálními klinickými příznaky trvajících po krátkou dobu;
- lokalizace dospělců v trávicím traktu;
- minimální možnost šíření infekčních stádií do prostředí;
- možnost získat sterilní infekční stadia;
- dostatečné znalosti hostitelské specifity, biologie, epidemiologie a patogenity organismu;

Na základě těchto kritérií byla pro účely výzkumu helmintoterapie také vytipována tasemnice *Hymenolepis diminuta*.

1.3. *Hymenolepis diminuta*

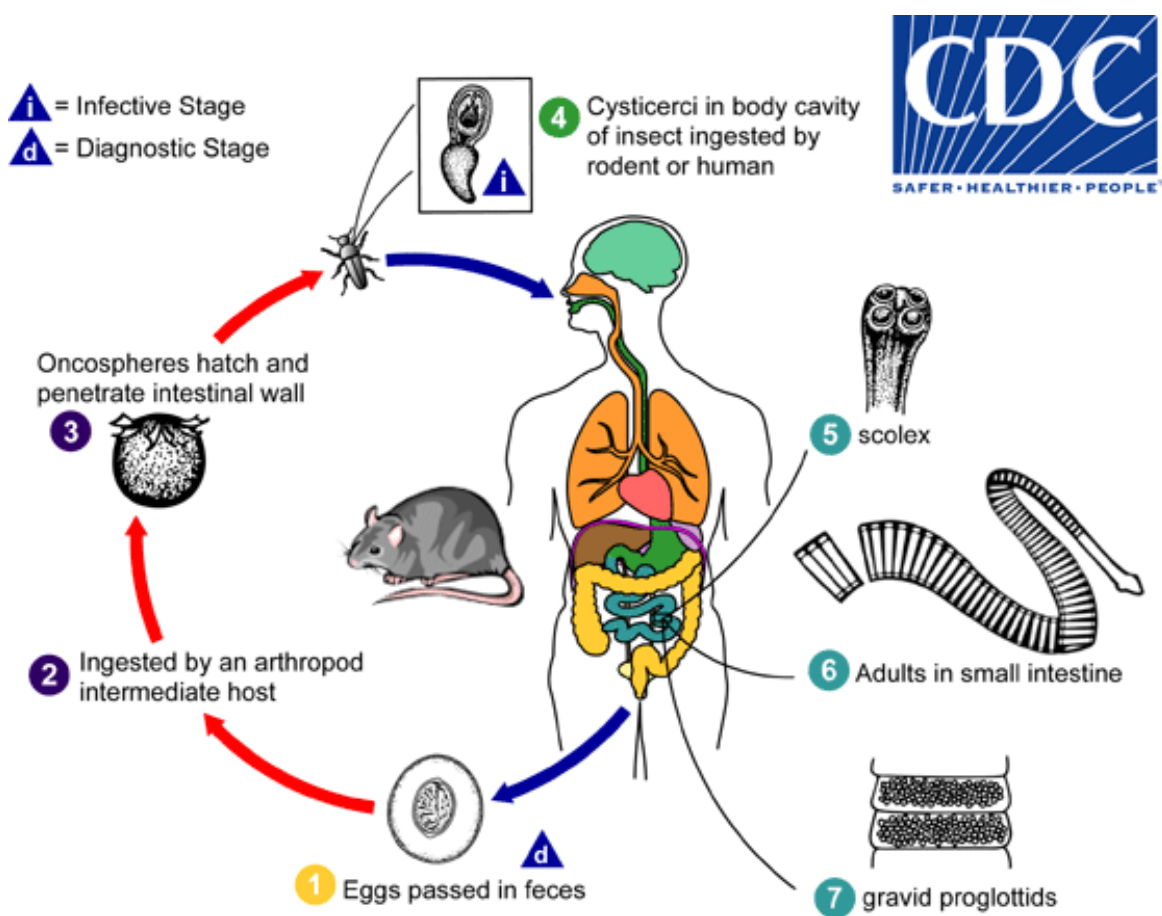
Hymenolepis diminuta je kosmopolitně rozšířená tasemnice náležící do třídy Cestoda a čeledi Hymenolepididae s nepřímým vývojovým cyklem (Volf & Horák, 2007). V posledních letech je studována v kontextu helmintoterapie (např. McKay, 2010; Persaud et al., 2007; Webb et al., 2007).

1.3.1. Vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta*

Hymenolepis diminuta má nepřímý vývojový cyklus, který zahrnuje definitivního hostitele (potkan, krysa) a mezihostitele (bezobratlí, nejčastěji brouci z čeledi potěmnikovití). Člověk je spíše jejím náhodným hostitelem (Andreassen et al., 1999; McKay, 2010; Volf & Horák, 2007). Nálezy *H. diminuta* u lidí jsou většinou náhodné, protože jsou tyto infekce v převážné většině případů asymptomatické (Kalaivani et al., 2014; Nkouawa et al., 2015).

Vajíčka *H. diminuta* odcházejí z těla hostitele spolu s jeho trusem a jsou schopna ve vnějším prostředí přežít deset dní (Volf & Horák, 2007). Vajíčko obsahuje larvální stádium, tzv. onkosféru, se závěsným aparátem zvaným hexakant. Po pozření vajíčka mezihostitelem dojde v jeho střevě k uvolnění onkosféry, ta migruje do jeho tělní dutiny, kde se přeměňuje

na další larvální stádium, tzv. cysticerkoid [dále jako larvocysta] (Andreassen et al., 1999). Definitivní hostitel se infikuje pozřením mezihostitele s infekce schopnými larvocystami (Andreassen et al., 1999). V tenkém střevě definitivního hostitele dochází k uvolnění larvocyst z těla mezihostitele (Obr. 1). Po infekci dochází ve střevě definitivního hostitele k přichycování larvocysty k mukóze a k jejich dospívání během 18-21 dní (tzv. prepatentní perioda). V patentní periodě infekce se v těle hostitele již nachází dospělec schopný produkce vajíček (Andreassen et al., 1999).



Obr. 1: Nepřímý vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta*

(zdroj: <http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html>)

1.3.2. Morfologie životních stádií *Hymenolepis diminuta*

Délka dospělé *H. diminuta* se pohybuje mezi 20 – 90 cm. Její skolex nese čtyři kruhové přísavky s vysunovacím chobotkem bez háčků. Segmentované tělo je tvořeno jednotlivými proglottidy, jež obsahují jak samičí, tak samčí pohlavní orgány. Živiny přijímá celým

povrchem těla, protože u tasemnic je naprostá absence trávicího systému. Povrch těla kryje glykokalyx, jehož hlavní funkcí je chránit *H. diminuta* ve střevě definitivního hostitele (Volf & Horák, 2007).

Vajíčka *H. diminuta* jsou silnostěnná, kulatá, o velikosti 60 až 80 μ m a obsahující onkosféru s hexantem uvnitř. Navíc pro vajíčka *H. diminuta* jsou typická poutka na pólech onkosfér, čímž se odlišuje například od *Hymenolepis nana*. K jejich vyloučení z dospělé tasemnice může dojít dvěma způsoby a to uvolněním vajíčka z článku přes uterinní pór nebo uvolněním článku, který obsahuje vajíčka (Volf & Horák, 2007). Z onkosfér, uvolněných z vajíček, se v těle mezihostitele líhnou larvocysty (Roberts et al., 2013).

1.3.3. Imunomodulační efekt *Hymenolepis diminuta*

Imunomodulační efekt *H. diminuta* na hostitelský organizmus spočívá v indukci Th2 imunitní odpovědi spolu s produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), dále v alternativní aktivaci makrofágů a T-regulačních buněk v tenkém střevě (McKay, 2010; Persaud et al., 2007; Hernandez et al., 2013; Webb et al., 2007).

Tyto imunomodulační mechanismy *Hymenolepis* byly zkoumány především na myším modelu. Nicméně myš není přirozeným hostitelem *H. diminuta* a tak dochází k jejímu vypuzení během 9-14 dní po infekci (Andreassen et al., 1999; McKay, 2010). Přesto *H. diminuta* u myšího modelu indukuje Th2 imunitní odezvu spolu s produkcí cytokinů IL-4, IL-9, IL-13, které inhibují diferenciaci a aktivaci Th1 buněk (McKay, 2010; Persaud et al., 2007). Přestože je potkan přirozeným hostitelem *H. diminuta*, je u něj dosud známo pouze malé množství informací o imunomodulačních mechanismech při infekci *H. diminuta*. Byla zaznamenána zvýšená genová exprese cytokinů IL-4, IL-5, IL-13 (Webb et al., 2007).

1.3.4. Infekce člověka tasemnicemi rodu *Hymenolepis*

Obecně lze předpokládat, že nákaza tasemnicemi rodu *Hymenolepis* u lidí je způsobena převážně dvěma druhy a to *H. nana* a *H. diminuta*, přičemž infekce *H. nana* je čtenější (Nkouawa et al., 2015). Tato tasemnice dokáže svůj dvouhostitelský nepřímý vývojový cyklus v případě „nutnosti“ využít i jako jednohostitelský. To znamená, že ve střevě definitivního hostitele proběhnou všechny fáze vývojového cyklu, kdy se ve střevě z onkosféry uvolněné z vajíčka vyvine larvocysta, která zároveň dospívá. Tudiž k vývojovému cyklu nepotřebuje mezihostitele a u člověka je častá autoinfekce (Volf & Horák, 2007).

Hymenolepis diminuta je kosmopolitně rozšířena, nejčtenější výskyt této komensální tasemnice je v tropických a subtropických oblastech a celkově v oblastech s nízkou hygienou (Nkouawa et al., 2015). Infekce *H. diminuta* u člověka je většinou asymptomatická, vzácně se může objevit bolest břicha, průjem či podrážděnost (Kalaivani et al., 2014). Hlavním zdrojem nákazy *H. diminuta* je požití tepelně nezpracované potravy kontaminované infikovanými brouky – mezihostiteli (Kołodziej et al., 2014). Diagnostika přítomnosti *H. diminuta* se provádí vyšetřením stolice a v ní případně přítomných vajíček tasemnice (Kalaivani et al., 2014; Nkouawa et al., 2015).

2. Cíl práce

Hlavním cílem této práce je sledování změn genové exprese interleukinu 10 (IL-10) u potkana jako modelového organismu v průběhu infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta* v prepatentní a patentní periodě infekce.

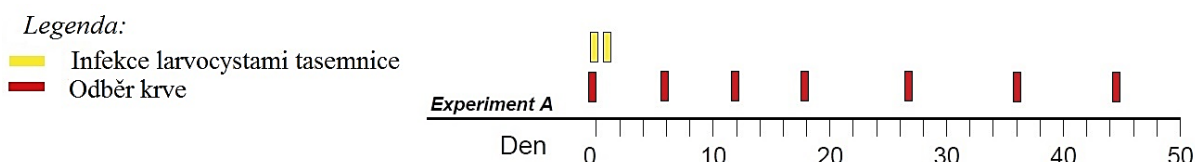
3. Materiál a metody

3.1. Plán experimentu

V rámci předložené práce byly provedeny dva experimenty s označením A a B.

Experiment A

Cílem experimentu A bylo sledování exprese interleukinu 10 (IL-10) v dlouhodobém časovém úseku v průběhu prepatentní a patentní periody infekce *Hymenolepis diminuta*. Celková délka trvání experimentu byla 45 dní. K pokusu byly použity dvě skupiny zvířat (n=5/1 skupina): (i) experimentální (infikovaná *H. diminuta*) a (ii) kontrolní (bez infekce *H. diminuta*). Zvířata v experimentální skupině byla na počátku experimentu dva dny po sobě infikována larvocystami *H. diminuta* a dále jim byly průběžně odebírány vzorky krve (viz. Obr. 2).



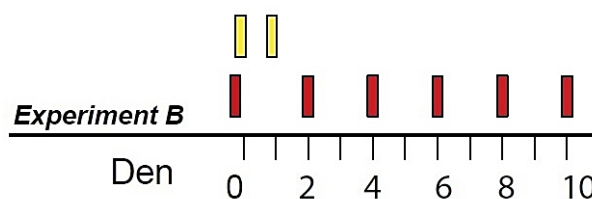
Obr. 2: Plán experimentu A: Celková délka experimentu byla 45 dní, infekce potkanů *Hymenolepis diminuta* proběhla v den 0 a v den 1, krev byla odebírána v den 0, 6, 12, 18, 27,36 a 45.

Experiment B

Na základě výsledků experimentu A byl naplánován a proveden navazující experiment B, jehož cílem bylo sledovat genovou expresi IL-10 pouze v prepatentní periodě. Délka trvání byla, oproti prvnímu, pouhých deset dní. K pokusu byly opět použity dvě stejně velké skupiny zvířat (n=5/1 skupina): (i) experimentální (infikována *H. diminuta*) a (ii) kontrolní (bez infekce *H. diminuta*). Potkani byli infikováni larvocystami tasemnice dva po sobě jdoucí dny a v dalších dnech byla oběma skupinám odebírána krev (viz. Obr. 3).

Legenda:

- Infekce larvocystami tasemnice
- Odběr krve



Obr. 3: Plán experimentu B: Celková délka experimentu byla 10 dní, infekce potkanů *Hymenolepis diminuta* proběhla v den 0 a v den 1, krev byla odebírána v den 0, 2, 4, 6, 8 a 10.

3.2. Kultivace helminta

V rámci obou výše popsaných experimentů byla použita tasemnice *H. diminuta*. K její kultivaci v laboratorních podmínkách využíváme její přirozený vývojový cyklus. Dospělec je udržován v rezervoárových SPF (Specific Pathogen Free) outbredních potkanech Wistar. Potkani jsou chováni v chovných boxech, při teplotách 22 až 24°C, ve 12h denním režimu, ve standardních podmínkách akreditovaného zvěřince Parazitologického ústavu (Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice). Trusem potkanů, který obsahuje vajíčka tasemnice, jsou krmeni potměnící (*Tenebrio molitor*) představující mezihostitele v laboratorních podmínkách. Ti jsou chováni v boxech při stabilní teplotě 28°C s 12h denním režimem (bílé světlo 18W zářivkou s časovým spínačem). Po třech týdnech se v tělní dutině potměníků vyvíjejí infekční larvocysty, kterými lze dále infikovat potkany.

3.3. Experimentální zvířata

3.3.1. Outbrední potkani

Pro experiment byli standardně používáni SPF outbrední potkani Wistar, samice, stáří 12 týdnů, z chovů Envigo RMS SRL (Udine, Itálie; distributor Anlab s.r.o., Praha, Česká Republika). Experimentální potkani jsou chováni v bariérovém chovu v systému individuálně ventilovaných jednotek (Green Line Sealsafe Plus Rat, Trigon plus s.r.o., Čestlice, ČR) ve stejném zvěřinci a podmínkách popsaných výše (viz kapitola 3.2.).

Infekce potkanů

V den infekce potkanů byly vypreparovány infekční larvocysty z infikovaných potměníků. Před vlastní preparací byla hlava brouka odstřižena, tělní dutina mediálně rozstřižena a pomocí stříčky s fosfátovým fyziologickým roztokem (dále PBS) byly z těla vyplaveny larvocysty na Petriho misku. Ty byly poté, pomocí automatické pipety, přemístěny na čistou Petriho

misku a znovu řádně promyty dostatečným množstvím PBS roztoku. Takto ošetřené larvocysty byly následně použity k infekci potkanů. Potkani v experimentální skupině byli infikováni dva po sobě jdoucí dny (pro zvýšení úspěšnosti infekce) vždy 10-15 larvocystami v PBS roztoku a to perorálně pomocí jícnové sondy. Jedincům v kontrolní skupině byl aplikován pouze PBS roztok jako placebo (pro vyrovnání stresových podmínek působících na zvířata v experimentální i kontrolní skupině).

Kontrola infekce potkanů

Po uplynutí prepatentní periody (16 – 21. den po infekci potkanů larvocystami) byla pomocí modifikované Sheatherovy flotační metody (Sheather, 1923) a světelné mikroskopie zkontrolována úspěšnost infekce potkanů. V případě pozitivní infekce potkanů byla detekována vajíčka *H. diminuta* s charakteristickými znaky a to kulatý nebo oválný tvar, velikost 60-80 μm , onkosféra s pozorovatelným hexakantem v jeho středu, silná a příčně pruhovaná stěna.

Odběry krve potkanů

Pro účely sledování genové exprese interleukinu 10 (IL-10) byly potkanům odebírány vzorky krve a to v pravidelných intervalech rovnoměrně rozložených v průběhu obou experimentů. Každý potkan byl, před vlastním odběrem krve, nejprve uspán inhalační anestezií s použitím izofluranu a anesteziologického přístroje (Matrx VMR®, Dayton, Ohio, USA). Z vnitřního koutku oka, pomocí odběrové skleněné kapiláry bez protisrážlivých aditiv, bylo odebráno 250 μl krve do 0,5 ml EDTA MiniCollect® zkumavek (DiaLab spol. s r.o., Praha, ČR). Ta byla okamžitě promíchána, aby nedošlo k vytvoření sraženiny. Poté byla krev přenesena do připraveného roztoku RiBo Ex v 1,5 ml zkumavce Eppendorf (součást kitu HybridR Blood RNA Kit). Před dalším zpracováním byly takto připravené vzorky krve umístěny na ledu.

3.4. Genová exprese interleukinu 10

Pro účely zjištění genové exprese IL-10 byly použity tyto chemikálie a kity:

- HybridR Blood RNA Kit (GeneAll Biotechnology, Soul, Jižní Korea)
- High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA)
- 5x Hot FirePol® Probe qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Tart, Estonsko)
- IL-10TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA)

- UBC TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA)
- Chloroform (Penta, Praha, Česká Republika)

Izolace RNA z krve

K izolaci celkové RNA byl použit kit HybridR Blood RNA Kit podle návodu výrobce. Odstředivka potřebná při zpracování vzorků krve: Centrifuga 5415R (Eppendorf, Hamburk, Německo). Po izolaci celkové RNA byla její koncentrace změřena v ng/ul na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

Reverzní transkripce

Získané vzorky celkové RNA sloužily jako substrát pro reverzní transkripci (High Capacity RNA-to-cDNA Kit) dle návodu výrobce. Výchozí množství RNA ve všech reakcích bylo stejné (1 µg). Takto vzniklá směs (20 µl) byla inkubována v PCR cycleru BioRAD T100™ Thermal Cycler (Hercules, Kalifornie, USA) za následujících podmínek: 37°C/60 min, 5°C/5 min a 4°C/∞.

Real-time PCR reakce

Pro přípravu RT-PCR reakce bylo použito: 5x Hot FirePol Probe qPCRMIX Plus, specifická fluorescenčně značená sonda a primery pro IL-10 (IL-10 Taqman gene expression assay pro potkany), specifická sonda a primery pro kontrolní (house-keeping) gen ubiquitin - UBC (UBC-Taqman gene expression assay pro potkany, Thermo Fisher Scientific) a bílá 96-jamková deska s transparentní folií

Nejdříve bylo potřeba připravit a rozvrhnout si 96-jamkovou destičku dle počtu vzorků a jednotlivých specifických sond (IL-10 a UBC). Jednotlivé reakce byly pro každý izolovaný vzorek prováděné v triplicátech a jako kontrolní gen byl použit UBC. Do označených jamek byl postupně pipetován qPCR Mix (14 µl) spolu se specifickou sondou a primery pro IL-10 případně pro UBC (1 µl). Poté bylo do každé jamky přidáno 5 µl cDNA, která byla před tímto použitím 10-krát naředěna. Každá jamka tedy obsahovala 20 µl finálního roztoku. Deska byla potažena folií, popsána, odstředěna a vložena do cycleru LC480 (Roche, Basilej, Švýcarsko). PCR reakce probíhala za podmínek: 50 °C/2 min, 95°C/10 min, 50 cyklů 95°C/15 sek, 60 °C/1 min.

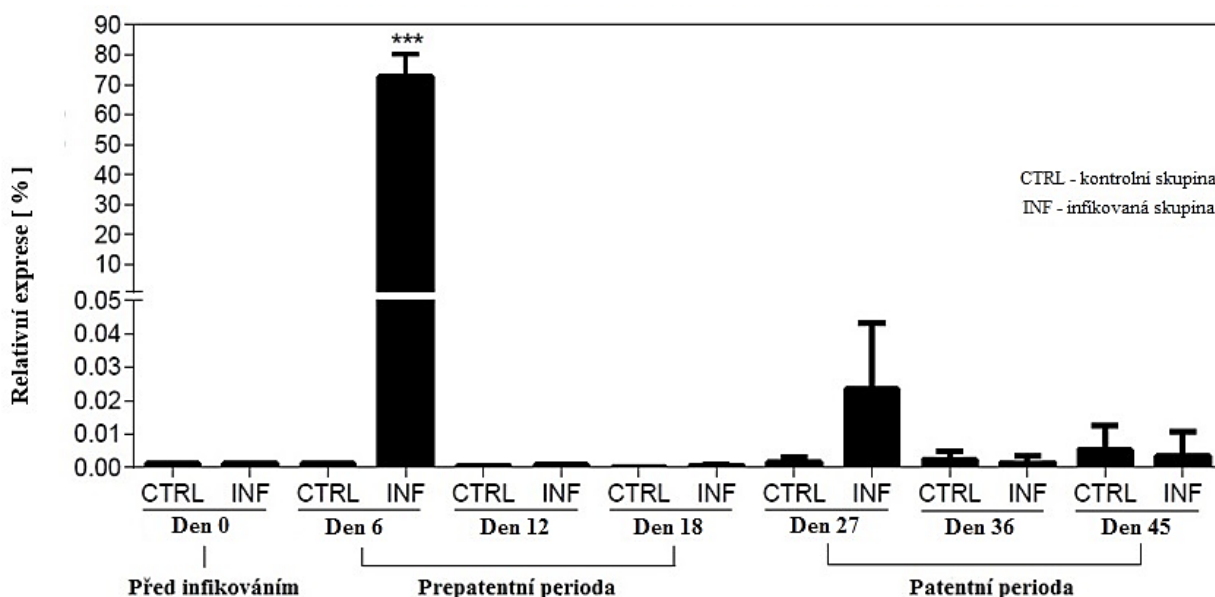
3.5. Statistické analýzy

Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Excel, GraphPad Prism 6. Rozdíl mezi infikovanou a kontrolní skupinou zvířat byl statisticky zhodnocena pomocí Studentova t-testu. Všechny výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM). Hvězdičkami jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly (**p < 0,01; ***p < 0,001).

4. Výsledky

4.1. Experiment A

Cílem experimentu bylo sledování změn genové exprese interleukinu 10 (IL-10) v průběhu prepatentní a patentní periody infekce *Hymenolepis diminuta*. Bylo zjištěno, že genová exprese IL-10 prokazatelně stoupá na velmi vysoké hladině významnosti (mean \pm SEM.; n= 5; ***p < 0,001; p=0,002) šestý den po infekci u experimentální skupiny potkanů, tj. v prepatentní periodě. U kontrolních potkanů, genová exprese IL-10 zůstává nezměněná (viz. Obr. 4).



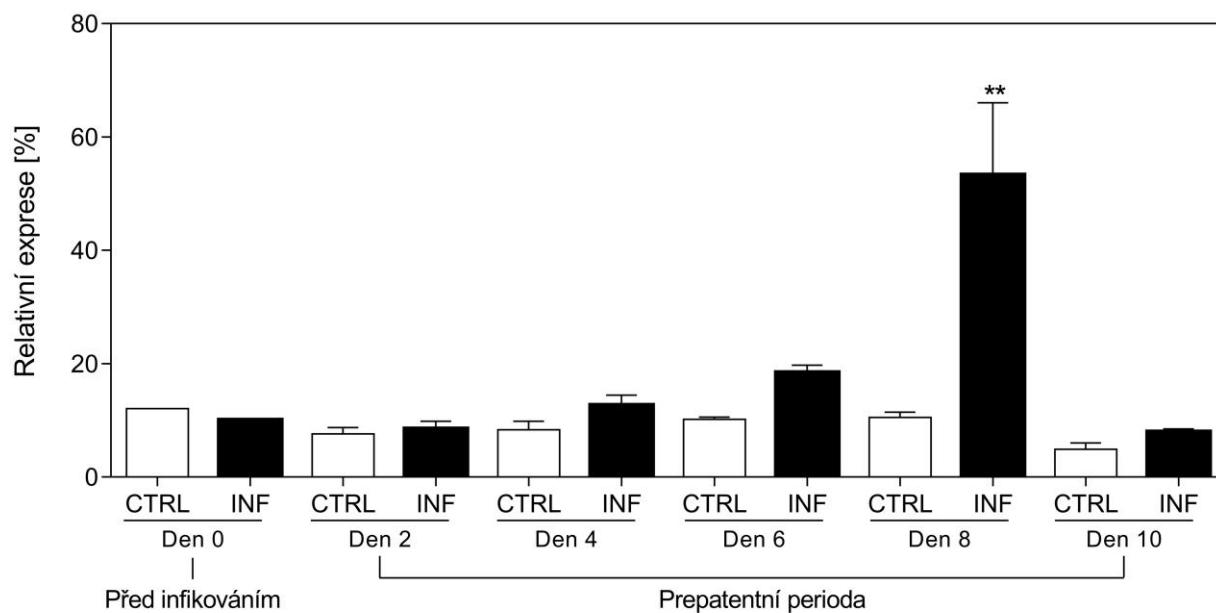
Obr. 4: Expresa genu interleukinu 10 v průběhu infekce *Hymenolepis diminuta* u SPF potkanů v prepatentní a patentní periodě.

4.2. Experiment B

Cílem experimentu bylo sledování změn genové exprese IL-10 v průběhu prepatentní periody infekce tasemnicí *H. diminuta*.

Tento experiment byl proveden na základě výsledků experimentu A. Zaměřili jsme se pouze na prvních deset dní po infekci *H. diminuta*, abychom mohli detailněji pozorovat změny genové exprese IL-10 a zjistili jsme, že exprese prokazatelně stoupá na vysoké hladině

významnosti (mean \pm SEM.; n=5; **p < 0,01; p=0,01) osmý den po infekci tasemnicí u infikované skupiny zvířat (viz. Obr. 5).



Obr. 5: Expze genu interleukinu 10 v průběhu infekce *Hymenolepis diminuta* u SPF potkanů v prepatentní periodě.

5. Diskuze

Po celá tisíciletí probíhala evoluce lidí a různých střevních organizmů (virů, bakterií, prvoků, jednobuněčných hub či helmintů) souběžně (Rook, 2012). Organismus člověka se pomocí různých obranných mechanismů snažil tyto organizmy z těla vypudit a naopak u mnoha z nich se vyvinuly důmyslné systémy, jak se stát pro tyto mechanismy svého hostitele neviditelným a jak se těmto obranným mechanismům vyhnout (McSorley & Maizels, 2012; Weinstock, 2012). Právě helminti do značné míry ovlivňují a formují imunitní systém svého hostitele (McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2014).

Jedním ze stěžejních mechanismů, kterými helmint ovlivňuje imunitu hostitele, je schopnost indukovat Th2 imunitní odpověď (Anthony et al., 2007; Ditgen et al., 2014; Weinstock & Elliott, 2014). Th2 imunitní odezva primárně aktivuje další imunitní buňky (žírné buňky, eosinofily, NK buňky) a tzv. efektorové molekuly (IgE, IgG1, IgG4, složky komplementu), které mají za úkol vypuzení parazita z těla hostitele (Anthony et al., 2007; Maizels & Holland, 1998). Taková imunitní odpověď však nemusí být zaměřena pouze na vypuzení parazita z těla hostitele. Allen & Wynn (2007) předpokládají, že Th2 typ imunity může, skrze produkované cytokiny, sloužit také k reparaci tkáně tenkého střeva poškozené právě při infekci helmintem. Dále lze Th2 imunitní odpovědi využít v helmintoterapii, léčbě autoimunitních onemocnění, ale i k dalšímu prohloubení poznatků o imunitním systému a jeho reakcích při helmintózách (Helmbj 2015; McKay, 2010 McSorley & Maizels, 2012; Weinstock & Elliott, 2014).

Cílem této práce bylo sledovat hladinu genové exprese interleukinu 10 (IL-10) u potkanů infikovaných tasemnicí *Hymenolepis diminuta* a to v průběhu prepatentní a patentní periody infekce. Již dříve byly provedeny studie, na jejichž základě lze tvrdit, že IL-10 je důležitým mediátorem Th2 imunity (Hunter et al., 2005; Persaud et al., 2007), má schopnost inhibovat Th1 imunitní odpověď a pomáhá omezit tvorbu prozánětlivých cytokinů (Couper et al., 2008).

Prvním a to velmi důležitým bodem před vlastním začátkem experimentu, byl výběr vhodného kandidáta mezi známými helminty, určeného k potenciální helmintoterapii. Ten měl splňovat několik důležitých požadavků, např. životní cyklus bez somatické migrace, nulová nebo jen nízká patogenita pro hostitele, lokalizaci dospělců v trávicím traktu, minimální možnost šíření infekčních stádií do prostředí, dostatečnou znalost o biologii parazita, jeho epidemiologii a patogenitu (Lukeš et al., 2014). Na základě výše popsaných kritérií a poznatků byla Laboratoří parazitární terapie (Biologické centrum AV ČR v.v.i., České

Budějovice) jako vhodný organismus využitelný k testování pro účely helmintoterapie, vybrána tasemnice *H. diminuta*.

Životní cyklus *H. diminuta* je nepřímý a dvouhostitelský. Ke svému kompletnímu vývoji potřebuje mezihostitele, nejčastěji bezobratlé (např. brouk *Tenebrio molitor* z čeledi potěmnikovití). Definitivním hostitelem této tasemnice je potkan (*Rattus norvegicus*). Člověk bývá pouze náhodným hostitelem (Volf & Horák, 2007). Lokalizace dospělce *H. diminuta* je v tenkém střevě definitivního hostitele, je přichycený na jeho mukóze pomocí přísavek závěsného aparátu (Roberts & Janovy, 2009). V několika předchozích studiích provedených na myším modelu bylo potvrzeno, že infekce tasemnicí *H. diminuta* dokáže aktivovat Th2 typ imunitní odpovědi hostitele a s ní spojenou produkci protizánětlivých cytokinů jako je interleukin 4 (IL-4), 5 (IL-5), 13 (IL-13) nebo 10 (IL-10) (Hunter et al., 2005; McKay, 2010; Persaud et al., 2007; Webb et al., 2007)

Doposud se k testování *H. diminuta* jako možného kandidáta pro helminterapii využíval především myší model (Persaud et al., 2007). Nicméně myší model má určité nevýhody pro testování *H. diminuta* pro účely helmintoterapie, především proto, že myš není jejím přirozeným definitivním hostitelem (Andreassen et al., 1999). Infekce touto tasemnicí u myši je samo-limitující, tzn., že organismus hostitele ji vypudí během 8-14 dní po infekci (McKay, 2010). U myši byla sledována hladina exprese cytokinu IL-10 v průběhu infekce *H. diminuta*, která vzrůstala do 11. dne po infekci, tudíž byla testována pouze prepatentní perioda infekce (Persaud et al., 2007). Dosud nebyly provedeny žádné studie, které by specifikovaly genovou expresi IL-10 jak v prepatentní, tak i v průběhu patentní periody infekce. Účelem našeho experimentu bylo důkladné otestování vlivu *H. diminuta* na hostitelský organismus a dlouhodobě sledovat expresi genu IL-10. Pro tuto práci byl vybrán potkan jako modelový organismus, protože infekce *H. diminuta* u potkana je dlouhodobá a může trvat po celý jeho život, tzn., že vztah potkana a tasemnice je permissivní, podobně jako je tomu u člověka (Andreassen et al., 1999). Tento fakt nám umožňuje získat přesnější představu o tom, jak *H. diminuta* může ovlivňovat imunitní systém lidí.

Samotné sledování hladiny genové exprese IL-10 bylo postaveno na třech hlavních metodách a to izolaci celkové RNA, reverzní transkripce a RT-PCR reakce. K použití těchto metod jsme přistoupili na základě prací, které je částečně využívaly a vypovídaly o jejich efektivnosti např. studie Persaud et al. (2007) a Webb et al. (2007). V těchto studiích byly jako výchozí tkáň pro určení genové exprese interleukinů použity slezina, tenké střevo, tlusté střevo a mezenterické lymfatické uzliny. Pro náš experiment jsme jako výchozí tkáň zvolili krev, abychom omezili enormní množství použitých experimentálních zvířat, protože se

vzorky odebíraly opakovaně v průběhu celého experimentu. V případě, že bychom chtěli použít pro experiment jiné tkáně, museli bychom zvířata utrácet v každém časovém bodě odběru tkání a zároveň, abychom dosáhli statisticky hodnotitelného počtu zvířat, by celkový počet potkanů v experimentu přesáhl únosnou kapacitní hranici.

V rámci provedených experimentů jsme zjistili, že se Th2 imunitní odezva indukuje během prepatentní periody při infekci *H. diminuta*, kdy dochází ke znásobení hladiny genové exprese IL-10. Sledování hladiny relativní genové exprese IL-10 v našem případě proběhlo ve dvou experimentech. V prvním experimentu jsme zjistili, že relativní exprese IL-10 dosahuje maxima v prepatentní periodě, konkrétně šestý den po infekci. Protože odběry krve v této části experimentu byly prováděny vždy v šesti-denních intervalech bylo potřeba navázat dalším experimentem, který byl již zaměřen pouze na prvních deset dní po infekci *Hymenolepis*. V tomto experimentu byly prováděny odběry krve každý druhý den a bylo zjištěno, že relativní exprese IL-10 dosahuje svého maxima osmý den po infekci.

Práce Persaud et al. (2007) taktéž potvrzuje indukci Th2 imunitní odpovědi, avšak u myšího modelu. V této studii byla sledována genová exprese IL-10 z tkáně tenkého střeva a to pomocí RT-PCR reakce. K indukci IL-10 došlo osmý a jedenáctý den po infekci. Další Th2 cytokiny IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13 byly detekovány v mezenterických lymfatických uzlinách a *in vitro* stimulované konkavalinem A s využitím metody ELISA. V případě IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13 bylo zjištěno zvyšování jejich hladiny v průběhu času a to do jedenáctého dne po infekci tasemnicí. Produkce IL-4 dosahovala maxima pátý den po infekci. Zde je nutné brát v potaz, že tato helmintóza, jak již bylo zmíněno, je u myši samo-limitující (McKay et al., 2003).

U potkana je stejná infekce *H. diminuta* permissivní, tzn., že nedochází k vypuzení tasemnice, a tak se exprese IL-10, díky rozdílnosti těchto dvou modelových organismů, může lišit. Práce Webb et al. (2007) také potvrzuje indukci Th2 imunitní odpovědi skrze zvýšení relativní exprese IL-4, IL-5 a IL-13 v prepatentní i patentní periodě, tentokrát u potkanů infikovaných *H. diminuta*. Nicméně, IL-10 v tomto pokusu zahrnut nebyl. Na základě námi zjištěných informací a faktu, že *H. diminuta* u potkaního modelu vyvolá Th2 imunitní odpověď, lze konstatovat, že potkaní model je vhodnější pro budoucí studie, které budou zaměřeny na testování *H. diminuta* v rámci helmintoterapie.

Silnou Th2 imunitní odpověď v prepatentní periodě infekce *H. diminuta* si vysvětlujeme přítomností larvocyst, které se přichycují ke tkáni ve střevě hostitele (Anthony et.al., 2007; Allen & Wynn, 2007). Po pozření larvocyst definitivním hostitelem, tyto projdou přes žaludek do tenkého střeva, kde se za pomoci čtyř přísavek na skolexu, přichycují

ke střevní stěně a postupně dospívají. Během tohoto přichycení dochází k narušení sliznice střeva a tudíž následně k vyvolání Th2 imunitní odpovědi, která je detekovatelná na základě genové exprese IL-10 mezi šestým až osmým dnem po infekci.

Na základě námi získaných výsledků a údajů z literatury lze předpokládat, že v prepatentní periodě dochází spolu se zvýšenou relativní expresí IL-10 i ke zvýšení exprese dalších protizánětlivých cytokinů spadajících do Th2 imunitní odpovědi, jako např. IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13. To bude v budoucnu středem zájmu našich dalších experimentů, spolu se zjišťováním hladiny prozánětlivých cytokinů spadajících do Th1 imunitní odpovědi. Zároveň budeme zjišťovat, zda je možné expresi těchto interleukinů efektivně detekovat z krve v porovnání s jinými tkáněmi (např. střevo či slezina). Vzhledem k tomu, že vztah *H. diminuta* a potkana je permisivní, stejně tak, jako je tomu u člověka, lze tedy u lidí předpokládat stejnou nebo podobnou imunitní reakci. Celkové detailní zmapování a pochopení principu imunitní odpovědi hostitele, při infekci tasemnicí *H. diminuta*, by v budoucnu mohlo být využito k případné terapii autoimunitních onemocnění.

6. Závěr

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo prokázat expresi protizánětlivého cytokinu IL-10 a to v průběhu prepatentní periody infekce *H. diminuta* u potkana a tím se potvrdilo, že: i) tato tasemnice vyvolává u potkana Th2 imunitní odpověď, ii) potkaní model je vhodný k dalšímu testování *H. diminuta* v rámci terapie helminty.

7. Seznam použité literatury

- Allen, J. E., & Wynn, T. A. (2007). Evolution of Th2 immunity: A rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLOS Pathogens*, 5, e1002003.
- Andreassen, J., Bennet-Jenkins, E. M., & Bryant, C. (1999). Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*, 42, 223–275.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F. J., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 7, 975–987.
- Bai, X., Wu, X., Wang, X., Guan, Z., Gao, F., Yu, J., & Liu, M. (2012). Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360, 79–88.
- Beer, R. J. S. (1972). The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. *Research in Veterinary Science*, 20, 47–54.
- Cooke, A. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology*, 21, 169–176.
- 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.
- Croese, J., O’Neil, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W., Pithard, D., & Speare, R. (2005). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn’s patients and reservoir donors. *Gut*, 55, 136–137.
- Daveson, A. J., Jones, D. M., Gaze, S., McSorley, H., Clouston, A., Cooke, S., & Croese, J. (2011). Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease – a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLOS One*, 6, e17366.
- 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.
- 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.

- Falcone, F. H., & Pritchard, D. I. (2005). Parasite role reversal: worms on trial. *Trends in Parasitology*, 21, 2003–2006.
- Feary, J. R., Venn, A. J., Mortimer, K., Brown, A. P., Hooi, D., Falcone, F. H., & Britton, J. R. (2009). Experimental hookworm infection: a randomized placebo-controlled trial in asthma experimental allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 40, 299–306.
- Gaze, S., McSorley, H., Daveson, J., Jones, D., Bethony, J., Oliveira, L. M., Speare, R., McCarthy, J., Engwerda, C. R., Croese, J., & Loukas, A., (2012). Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLOS Pathogens*. 8, e1002520.
- Girgis, N. M., Gundra, U. M., Loke, P. (2013). Immune regulation during helminth infections. *PLOS Pathogens* 2013, 4, e1003250.
- Grzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, A. Z., Caspar, P., Heiny, S., & Sher, A. (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni . *The Journal of Immunology*, 4, 1322–1327.
- Helmby, H. (2009). Helminths and our immune system : Friend or foe ? *Parasitology International*, 58, 121–127.
- Helmby, H. (2015). Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand ? *BMC Immunology*, 16,1–5.
- Hernandez, J. R., Leung, G., & McKay, D. M. (2013). Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International Journal for Parasitology*, 43, 233–243.
- 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.
- Johnston, M. J. G., MacDonald, J. A., & McKay, D. M. (2009). Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology*, 136, 125–147.
- Kalaivani, R., Nandhini, L., & Seetha, K. (2014). *Hymenolepis diminuta* infection in a school-going child: A rare case report. *Australasian Medical Journal*, 7, 379–381.
- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology*, 28, 573–621.

- Kołodziej, P., Rzymowska, J., Stępień-Rukasz, H., Lorencowicz, R., Lucińska, M., & Dzióbek, M. (2014). Analysis of a child infected with *Hymenolepis diminuta* in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21, 510–511.
- Kuek, A., Hazleman, B. L., & Andrew, J. K. O. (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.
- Lukeš, J., Kuchta, R., Scholz, T., & Pomajbíková, K. (2014). (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in Parasitology*, 30, 377–385.
- Maizels, R. M., & Holland, M. J. (1998). Parasite immunity: Pathways for expelling intestinal helminths. *Current Biology*, 8, 711–714.
- McKay, D. M. (2010). The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, 137, 385–394.
- McKay, D. M., & Khan, W. I. (2003). STAT-6 is an absolute requirement for murine rejection of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*, 89, 188–190.
- McSorley, H. J., Gaze, S., Daveson, J., Jones, D., Anderson, R. P., Ruysers, N. E., & Loukas, A. (2011). Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. *PLOS One*, 6, e24092.
- McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 585–608.
- McSorly, H. J., Hewitson, J. P., & Maizels, R. M. (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 43, 301–310.
- Nkouawa, A., Haukisalmi, V., Li, T., Nakao, M., Lavikainen, A., Chen, X., & Ito, A. (2015). Cryptic diversity in Hymenolepidid tapeworms infecting humans. *Parasitology International*, 65, 83–86.
- Osada, Y., Shimizu, S., Kumagai, T., Yamada, S., & Kanazawa, T. (2009). Corrigendum to *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *International Journal for*

Parasitology, 39, 457–464.

Persaud, R., Wang, A., Reardon, C., & McKay, D. M. (2007). Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *International Journal for Parasitology*, 37, 393–403.

Roberts L. S., Janovy J. & Nadler S. (2013). Foundations of Parasitology, 9th ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, 670.p. ISBN 978-007-132641-4

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

Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A., & Lawrence, C. E. (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and Immunity*, 75, 397–407.

Sheather, A. L. (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 36, 266–275.

Summers, R. W., Elliott, D. E., Qadir, K., Urban, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2003). *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 98, 2034–2041.

Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R. A., & Weinstock, J. V. (2005)a. *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. (2005)b. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54, 87–90.

Volf P. & Horák P. (2007). Paraziti a jejich biologie. 1. vyd., Triton, Praha, 318p.
ISBN: 978-80-7437-162-2.

Webb, R. A., Hoque, T., & Dimas, S. (2007). Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite Immunology*, 29, 11–21.

Weinstock, J. V. (2012). The worm returns. *Nature*, 491, 183–185.

- Weinstock, J. V., & Elliott, D. E. (2013). Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. *International Journal for Parasitology*, *43*, 245–251.
- Weinstock, J. V., & Elliott, D. E. (2014). Helminth infections decrease host susceptibility to immune-mediated diseases. *The Journal of Immunology*, *193*, 3239–3247.
- Weinstock, J. V., (2015). Do we need worms to promote immune health? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *49*, 227-231.
- Williams, J. P., & Meyers, J. A. (2002). Immune-mediated inflammatory disorders (I.M.I.D.s): The economic and clinical costs. *The American Journal of Managed Care*, *8*, 664–681.
- Wilson, M. S., & Maizels, R. M. (2003). Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *26*, 35–50.
- Yang, X., Yang, Y., Wang, Y., Zhan, B., Gu, Y., Cheng, Y., & Zhu, X. (2014). Excretory/secretory products from *Trichinella spirallis* adult worms ameliorate DSS-induced colitis in mice. *PLOS One*, *9*, e96454.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, *296*, 490-494.
- Zaccone, P., Cooke, A., Zaccone, P., & Cooke, A. (2013). Vaccine against autoimmune disease: Can helminths or their products provide a therapy ? *Current Opinion in Immunology*, *25*, 418–423.
- Zaccone, P., & Hall, S. W. (2013). Helminth infection and type 1 diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, *9*, 272–286.
- Zaccone, P., Jones, F. M., Dunne, D. W., & Cooke, A. (2003). *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *European Journal of Immunology*, *33*, 1439–1449.