

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Imunomodulační účinky extraktů z helminta na střevní
buněčnou linii potkaního modelu**

Diplomová práce

Bc. Jana Levá

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

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

České Budějovice 2019

Levá J., (2019): Imunomodulační účinky extraktů z helminta na střevní buněčnou linii potkaního modelu [Immunomodulatory effects of helminth's extracts on the rat intestinal cell line. Mgr. Thesis, in Czech] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: In this study, we examined the immunomodulatory effect of excretory/secretory products, crude adult extracts and crude larvae extracts from *Hymenolepis diminuta* on the intestinal epithelial cell line from a rat. For determination of the immunomodulation effect of all *H. diminuta* extracts was used relative gene expression of TNF α , IL-17re and IL-33 from epithelial cells and it was tested using real-time PCR. Our result showed that excretory/secretory products had the strongest antiinflammatory effect on the epithelial cells. We assume that crude adult extracts play an important role in increase of gene expression of IL-33 and also in the immunomodulatory ability of *H. diminuta* in the host organism.

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 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

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, PhD. za její odborné vedení, trpělivost, poskytnutí cenných rad a pomoc při zpracování veškerých výsledků a této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat odbornému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za jeho ochotu, vstřícnost a odborné konzultace. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat RNDr. Milanovi Jirků za pomoc a ochotu při vyhodnocování získaných dat. Mé díky patří také celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí a Katedře medicínské biologie Přírodovědecké fakulty JU v Českých Budějovicích za poskytnutí přístupu do jejich laboratoří. Mimořádné díky patří především rodičům za podporu během celého studia.

Obsah

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 1.1 | Helminto-terapie | 1 |
| 1.2 | Mechanismy imunomodulace helmintů | 3 |
| 1.2.1 | Th2 imunitní opověď a střevní epitelální buňky | 3 |
| 1.3 | Helminto-terapie v praxi | 4 |
| 1.3.1 | Využití exkrečních/sekrečních produktů a extraktů z helmintů | 4 |
| 1.3.2 | Kolonizace hostitele živým červem | 5 |
| 1.3.2.1 | Experimentální zánětlivá onemocnění <i>in vivo</i> u zvířecích modelů | 5 |
| 1.3.2.2 | Využití živých helmintů v rámci helminto-terapie lidí | 6 |
| 1.4 | Výběr dalších možných kandidátů vhodných pro účely helminto-terapie | 8 |
| 1.5 | <i>Hymenolepis diminuta</i> | 9 |
| 1.5.1 | Životní cyklus <i>Hymenolepis diminuta</i> | 9 |
| 1.5.2 | Morfologický popis <i>Hymenolepis diminuta</i> | 9 |
| 1.5.3 | Imunomodulační účinky <i>Hymenolepis diminuta</i> | 11 |
| 1.5.4 | Účinky exkrečních/sekrečních produktů a extraktů <i>Hymenolepis diminuta</i> | 11 |
| 1.5.5 | Imunomodulace <i>Hymenolepis diminuta</i> v rámci experimentálních onemocnění | 11 |
| 1.5.6 | Terapeutický potenciál <i>Hymenolepis diminuta</i> v rámci helminto-terapie lidí | 13 |
| 2 | Cíl práce | 14 |
| 3 | Materiál a metody | 15 |
| 3.1 | Seznam použitého materiálu a chemikálií | 15 |
| 3.2 | Udržování kultury helminta v laboratorních podmínkách | 17 |
| 3.2.1 | Potemník moučný (<i>Tenebrio molitor</i>) | 17 |
| 3.2.2 | Laboratorní potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) | 17 |
| 3.3 | Příprava exkrečních/sekrečních produktů z helminta | 18 |
| 3.3.1 | Kultivace <i>Hymenolepis diminuta</i> v médiu <i>in vitro</i> | 18 |
| 3.3.2 | Sterilizace a koncentrace HdES | 18 |
| 3.4 | Příprava hrubých extraktů ze stádia dospělce | 18 |
| 3.5 | Příprava hrubých extraktů z larválních stádií | 19 |
| 3.6 | Měření koncentrace extraktů | 19 |
| 3.7 | Tkáňové kultury | 20 |
| 3.7.1 | Rozmražení buněk a kultivace | 20 |
| 3.8 | Analýza genové exprese cytokinů | 21 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.8.1 | Izolace RNA | 21 |
| 3.8.2 | Reverzní transkripce | 21 |
| 3.8.3 | Real-time PCR reakce | 21 |
| 3.9 | Statistické analýzy | 21 |
| 3.10 | Design experimentu..... | 22 |
| 3.10.1 | Experiment I | 22 |
| 3.10.2 | Experiment II..... | 23 |
| 3.10.3 | Experiment IIIa..... | 24 |
| 3.10.4 | Experiment IIIb..... | 25 |
| 4 | Výsledky | 26 |
| 4.1 | Experiment I: Stanovení vhodného časového intervalu pro vyhodnocení změn genové exprese TNF α | 26 |
| 4.2 | Experiment II: Stanovení optimální koncentrace extraktů | 26 |
| 4.3 | Experiment III: Analýza imunomodulačních účinků extraktů <i>H. diminuta</i> na základě změn genové exprese TNF α , IL-17re a IL-33..... | 28 |
| 4.3.1 | Experiment IIIa: Analýza protizánětlivého účinku po čtyřech hodinách inkubace | 28 |
| 4.3.2 | Experiment IIIb: Analýza protizánětlivého účinku po 12 hodinách inkubace | 33 |
| 5 | Diskuze..... | 34 |
| 6 | Závěr | 45 |
| 7 | Seznam použitých zkratk | 46 |
| 8 | Seznam použité literatury | 48 |

1 Úvod

Po celá tisíciletí docházelo k evoluční koadaptaci člověka a jiných organismů, jako jsou bakterie, prvoci, viry a v neposlední řadě také helminti (Bilbo et al., 2011; Parker & Ollerton, 2013). Na základě několika paradigmat zformulovaných během 20. století a epidemiologických studií je porušení těchto křehkých koevolučních vztahů spojováno se stále se zvyšující prevalencí autoimunitních onemocnění jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, diabetes mellitus I, revmatoidní artritida či alergie (Agmon-Levin et al., 2011; Bilbo et al., 2011; Lerner et al., 2015; Molodecky et al., 2012; Parker & Ollerton, 2013; Rook, 2012). Předpokládá se, že helminti, především zástupci tříd Nematoda, Cestoda a Trematoda, pozitivně regulují a modulují imunitní procesy za účelem přežití v hostitelském organismu. Toto zjištění vedlo k testování helmintů v rámci terapie výše zmíněných autoimunitních onemocnění, tzv. helminto-terapie (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Harnett & Harnett, 2017; Maizels et al., 2018; Wang et al., 2017; Weinstock & Elliott, 2014).

V mnoha studiích je testována a prokázána protizánětlivá imunitní odpověď hostitele v rámci kolonizace jeho organismu živými červy. Tento přístup má však určité nevýhody (Cheng et al., 2015; Ditgen et al., 2014; Hernandez et al., 2013; Liu et al., 2017; Sobotková et al., under review). Alternativou je tedy identifikace bioaktivních molekul helmintů. Jedná se především o látky obsažené v exkrečních/sekrečních produktech (E/S produkty) či extraktech z různých životních stádií helmintů (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Maizels et al., 2018; Nascimento Santos et al., 2017; Shepherd et al., 2015; Smallwood et al., 2017; Wu et al., 2017). Ačkoli již byly prokázány určité protizánětlivé imunomodulační účinky helmintů v rámci helminto-terapie autoimunitních onemocnění, stále vyvstává potřeba hledat nové efektivní molekuly.

1.1 Helminto-terapie

Helminti jsou široká variabilní skupina nepříbuzných organismů zahrnující platyhelminy (Cestoda, Monogenea, Trematoda), vrtejše (Acanthocephala), hlístice (Nematoda), vířníky, strunovce, pijavky, pásnice a parazitické ploštěnky (Roberts et al., 2013).

Po miliony let probíhala evoluce helmintů a jejich hostitelů společně. Helminti se během tohoto období adaptovali pro život v hostiteli vytvořením mnoha imunomodulačních strategií, kterými ovlivňují imunitní systém svého hostitele (Ditgen et al., 2014; Hernandez et al., 2013; Weinstock, 2012). Této jedinečné modulační schopnosti je využíváno v rámci helminto-terapie (Elliott & Weinstock, 2012; McSorley et al., 2013; Weinstock, 2012).

Podstatou této terapie je využití striktně kontrolované infekce mírně patogenním či nepatogenním červem s cílem aktivace protizánětlivých imunitních procesů v organismu (Lukeš et al., 2014; Maizels et al., 2018; Sobotková et al., under review).

Ve 20. století byla popsána souvislost mezi nárůstem autoimunitních onemocnění a vymizením helmintů u lidí žijících ve vyspělých civilizacích. Naopak u lidí v rozvojových oblastech je dodnes vysoká expozice helmintům a nízký výskyt autoimunitních onemocnění (Lerner et al., 2015; Wiria et al., 2012). Tento fakt je vysvětlován tzv. „Old Friends“ hypotézou a „Biome depletion“ teorií.

Základem obou teorií je Hygienická hypotéza, která jako první podala tvrzení o souvislosti nárůstu alergických a autoimunitních onemocnění se zvýšenou hygienou a ztrátou druhové diverzity v lidském mikrobiomu (Strachan, 1989). Avšak název Hygienická hypotéza je zavádějící a nepřesný. Může vyvolat dojem, že zvyšující se incidence autoimunitních onemocnění je způsobena hygienou. Hygienická hypotéza byla dále rozvedena a upřesněna dvěma následně formulovanými paradigmaty a to „Old Friends“ hypotézou a „Biome depletion“ teorií. Podle těchto hypotéz je nárůst autoimunitních onemocnění a změny v imunoregulaci způsobeny porušením koevolučních vztahů lidského organismu a parazitů, komensálů či mutualistů (helminti, prvoci, viry, bakterie), které vznikaly po dlouhá tisíciletí.

Především v 19. století, v době průmyslové revoluce (tj. druhá epidemiologická transmise), došlo k razantní změně ve způsobu života lidí. Přejít na moderní životní styl vedl ke změně hygienických standardů, plošné desinfekci pitné a užitkové vody, nadměrnému užívání antibiotik, deficitu vitamínu D, ke zvýšení stresu a v neposlední řadě k eliminaci helmintů. Následkem těchto změn je snížení rozmanitosti mikrobiomu v lidském organismu (Parker et al., 2013; Rook, 2012; Sharief et al., 2012). „Biome depletion“ teorie také zdůrazňuje důležitou roli diverzity lidského mikrobiomu a přítomnosti helmintů pro správnou funkci imunitního systému (Bilbo et al., 2011; Parker et al., 2013; Parker, 2014).

Na základě výše zmíněných hypotéz, imunomodulační účinky helmintů začaly být testovány v souvislosti s léčbou autoimunitních onemocnění, především nespecifických střevních zánětů (inflammatory bowel diseases-IBD), jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (Helmy, 2015; McSorley et al., 2013; Smallwood et al., 2017; Weinstock & Elliott, 2014). Jedná se o onemocnění střev projevující se transmulárním granulomatózním zánětem s chronickou recidivou (Gabalec 2009a, 2009b; Kaser et al., 2010).

Vývoje kaskády imunitních reakcí vedoucích k indukci prozánětlivé (Th1) imunitní odpovědi, a tedy k zánětlivým onemocnění střev, se mimo jiné účastní cytokin tumor necrosis factor alpha – TNF α (Nielsen et al., 2013; Ordás et al., 2009). Již v roce 1991 byl prokázán jako důležitý prozánětlivý cytokin objevující se v séru pacientů s IBD (Maeda et al., 1992; Murch et al., 1991).

1.2 Mechanismy imunomodulace helmintů

Hlavní podstata imunomodulační schopnosti helmintů je zabránit jejich vyloučení z těla hostitele případně jejich usmrcení ještě v těle hostitele. Dosud bylo popsáno více mechanismů interakce helmintů s imunitním systémem hostitele (Ditgen et al., 2014; McSorley et al., 2013; Weinstock & Elliott, 2014; Yasuda & Nakanishi, 2018). Samotná přítomnost střevního parazita u hostitele vyvolává změny, které vedou k aktivaci dendritických buněk, CD4+ T buněk, makrofágů, eosinofilů, bazofilů, žírných buněk, B buněk a s nimi spojenou produkcí protilátek (IgE, IgG1, IgG4). Aktivované CD4+ T buňky typu 2 (Th2 buňky) se podílí na vývoji protizánětlivé (Th2) imunitní odpovědi a s ní spojené produkci cytokinů, jako je IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 (Cortés et al., 2017; Ditgen et al., 2014; Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Mcsorley & Maizels, 2012; Wang et al., 2017). Působením Th2 imunitní odezvy dochází k alternativní aktivaci makrofágů a ovlivnění prozánětlivých (Th1) procesů v organismu. Právě protizánětlivých imunitních procesů v organismu je využíváno při léčbě autoimunitních onemocnění (Ditgen et al., 2014; Elliott & Weinstock, 2012; Maizels et al., 2018; Weinstock & Elliott, 2013).

1.2.1 Th2 imunitní odpověď a střevní epiteliální buňky

Důležitou roli ve vývoji Th2 imunitní odpovědi v rámci střevních helmintů hrají nejen imunitní buňky, ale i epiteliální buňky střeva (Cortés et al., 2017; Elliott & Weinstock, 2012; Saenz et al., 2008). Tyto buňky jsou schopné sekrece cytokinů TSLP, IL-17e (IL-25) a IL-33, které jsou zodpovědné za vývoj Th2 imunitní odpovědi a s ní související produkci protizánětlivých cytokinů (Cortés et al., 2017; Saenz et al., 2008).

IL-17e (IL-25) patří do rodiny interleukinů 17. Střevní epiteliální buňky a tzv. chomáčkové buňky („tuft cells“), vnořené mezi epiteliemi, při parazitární infekci produkují množství IL-25 (Cortés et al., 2017; Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Saadoun et al., 2011). Tento následně aktivuje přirozené lymfoidní buňky typu 2 (ILC2). ILC2 produkují protizánětlivé cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13 a podporují další vývoj Th2 imunitní odpovědi (Cortés et al., 2017; Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Maizels et al., 2018).

IL-33 řadíme do cytokinové rodiny interleukinů 1. Je exprimován a produkován různými typy buněk, jako např. dendritickými buňkami, makrofágy, plicními epiteliálními buňkami, buňkami centrální nervové soustavy, buňkami lymfatických uzlin a střevními epiteliálními buňkami (Cortés et al., 2017; Saenz et al., 2008). Bylo prokázáno, že tento interleukin působí nejen jako extracelulární ligand, ale také jako intracelulární signální molekula. Intracelulárně je tento cytokin konstitutivně exprimován a působí jako transkripční represor (Hodzic et al., 2017). Při parazitární infekci IL-33 uvolněný z epiteliálních buněk vyvolává sekreci Th2 typu cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13) u Th2 buněk, makrofágů, bazofilů a ILC2 (Cortés et al., 2017; Liew et al., 2016; Saenz et al., 2008).

1.3 Helmintho-terapie v praxi

Na základě Hygienické hypotézy (Strachan, 1989) a následných paradigmat vznikajících v průběhu 20. století vznikla myšlenka sledovat imunomodulační účinky helmintů s cílem terapie autoimunitních onemocnění - helmintho-terapie (Bilbo et al., 2011; Parker et al., 2012; Rook, 2012). V rámci helmintho-terapie jsou využívány dva základní přístupy: (i) analýza imunomodulačních účinků helmintů při kolonizaci střeva hostitele, popřípadě pacienta, živým červem; (ii) testování vlivu bioaktivních látek (exkreční/sekreční produkty, extrakty) z různých životních stádií helmintů v rámci imunitní odpovědi experimentálních modelů *in vivo* a *in vitro* (Cheng et al., 2015; Hernandez et al., 2013; Liu et al., 2017; Nascimento Santos et al., 2017; Wang et al., 2017; Wu et al., 2017; Yasuda & Nakanishi, 2018).

1.3.1 Využití exkrečních/sekrečních produktů a extraktů z helmintů

Imunomodulační schopnosti helmintů jsou úzce spojeny s nejen s kontaktem samotného helminta s tkáněmi hostitelského organismu (Ditgen et al., 2014). Bylo popsáno, že dochází k ovlivňování hostitelova organismu také pomocí modulačních látek obsažených v E/S produktech a experimentálně připravených extraktech z dospělců nebo jejich různých vývojových stádií (Smallwood et al., 2017; Wu et al., 2017). Složky E/S produktů a extraktů se mohou lišit v rámci každého jednotlivého parazita a jeho vývojových stádií. Obecně lze říci, že se jedná především o bioaktivní proteiny, glykoproteiny, peptidy, glykany, glykolipidy aj. (Bień et al., 2016; Maizels et al., 2018; Nascimento Santos et al., 2017; Wu et al., 2017). Kolonizace hostitele živým červem s sebou může nést některá rizika, např. nekontrolovatelné šíření infekčních stádií do vnějšího prostředí, patologické změny v hostitelském organismu aj. (Parker et al., 2012). Proto je vliv E/S produktů a extraktů z helmintů intenzivně testován a je snahou najít vhodné bioaktivní látky, nebo jejich kombinaci, které by mohly být potenciálně

využity při helminto-terapii (Parker et al., 2012; Maizels et al., 2018; Nasciemnto Santos et al., 2017, Shepherd et al., 2015; Smallwood et al., 2017).

Modulace imunitní odpovědi hostitele E/S produkty a extrakty z helmintů, jako je např. *Ancylostoma caninum*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Necator americanus*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Heligmosomoides polygyrus* aj., je testována v rámci experimentálních zánětlivých onemocnění na zvířecích modelech, především myších (Maizels et al., 2018; Smallwood et al., 2017; Sobotková et al., under review; Wu et al., 2017). Také je analyzován imunomodulační účinek E/S produktů a extraktů z helmintů (*F. hepatica*, *S. mansoni*, *T. spiralis*, *Trichuris suis*, *Taenia crassiceps* aj.) *in vitro* u různých buněčných linií např. dendritických buněk, makrofágů, epiteliálních buněk, a to jak myších, potkaních tak lidských (Sobotková et al., under review; Wu et al., 2017).

1.3.2 Kolonizace hostitele živým červem

Vliv infekce živým helmintem na imunitní procesy v hostitelském organismu je v laboratorních podmínkách testován především *in vivo* na experimentálních zánětlivých onemocněních zvířecích modelů (Ditgen et al., 2014; Hernandez et al., 2013; Sobotková et al., under review). V návaznosti na tyto experimentální studie vznikají klinické studie zaměřené na testování účinků kolonizace helmintem u pacientů trpících různými autoimunitními onemocněními (Cheng et al., 2015; Helmbly, 2015; Liu et al., 2017).

1.3.2.1 Experimentální zánětlivá onemocnění *in vivo* u zvířecích modelů

Více než 10 let jsou imunomodulační účinky helmintů testovány u různých experimentálně vyvolaných onemocněních autoimunitní nebo zánětlivé etiologie především *in vivo* na zvířecích modelech (Hernandez et al., 2013; Kahl et al., 2018; Wang et al., 2017). Jedná se o experimentální modelová onemocnění představující např. nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), roztroušenou sklerózu, revmatoidní artritidu, alergie aj. (Sobotková et al., under review). Nejčastěji využívaným zvířecím modelem jsou různé linie myši (Helmbly, 2009; Hernandez et al., 2013; Smallwood et al., 2017; Wang et al., 2017). Data získaná z experimentů na zvířecích modelech nemusí být vždy zcela srovnatelná s modulací autoimunitních onemocnění u lidí. Patologie experimentálních onemocnění u zvířecích modelů a autoimunitních onemocnění u lidí není zcela shodná. Nicméně tento typ experimentů je důležitým základem pro následné klinické studie (Kahl et al., 2018; Smallwood et al., 2017).

1.3.2.2 Využití živých helmintů v rámci helminto-terapie lidí

Kolonizace živým helmintem (*Necator americanus*) a s ní spojené úspěšné potlačení sezónní alergie bylo poprvé popsáno již v roce 1976 (Turton, 1976). Na podkladě poznatků o imunomodulační schopnosti helmintů u zvířecích modelů a teorií zabývajících se příčinami vzniku autoimunitních onemocnění se začaly provádět klinické studie. Tyto testují vliv přítomnosti živého helminta na průběh některých autoimunitních onemocnění lidí (např. Cheng et al., 2015; Evans & Mitre, 2015; Liu et al., 2017; Smallwood et al., 2017; Wammes et al., 2014). Ačkoli již byly provedeny úspěšné klinické studie, které potvrdily, že přítomnost helminta pozitivně ovlivňuje průběh autoimunitních onemocnění (Correale & Farez, 2007; Evans & Mitre, 2015; Siniscalco & Antonucci, 2013; Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b), není helminto-terapie v klinické praxi standardně využívána.

Na základě pozitivních výsledků klinických studií vzniká stále větší komunita lidí, tzv. „self-treaters“, kteří využívají komerčně dostupné preparáty obsahující vajíčka či larvy helmintů k individuální léčbě autoimunitních onemocnění (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017; Smyth et al., 2017). Skupina „self-treaters“ nyní čítá několik tisíc lidí, kteří poskytují velmi cenné poznatky o vlivu helmintů na řadu autoimunitních onemocnění (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017). Velmi významní komerčně dostupní zástupci helmintů v souvislosti s helminto-terapií u lidí jsou *T. suis*, *N. americanus*, *Trichuris trichiura* a *Hymenolepis diminuta*, které je věnována samostatná kapitola 1.5 (Cheng et al., 2015).

Trichuris suis

T. suis řadíme mezi Nematoda, řád Enoplida. Vývojový cyklus této hlístice je přímý, dospělci jsou lokalizováni především v tlustém a slepém střevě. Přírodním hostitelem je prase domácí a prase divoké, člověk je pouze náhodným hostitelem (Roberts et al., 2013). Přítomnost tohoto helminta v těle hostitele spouští kaskádu reakcí vedoucích k protizánětlivé Th2 imunitní odpovědi a s ní spojené produkci příslušných cytokinů (Summers et al., 2003; Wammes et al., 2014).

Potenciální terapeutický účinek *T. suis* byl testován v klinických studiích u pacientů trpících autoimunitními onemocněními, jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, revmatoidní artritida nebo roztroušená skleróza (Smallwood et al., 2017; Wammes et al., 2014). Pacientům byla podávána vajíčka *T. suis* (*T. suis* ova -TSO) a bylo prokázáno zlepšení jejich zdravotního stavu nebo remise onemocnění (Benzel et al., 2012; Smallwood et al., 2017; Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b).

Dnes jsou komerčně připravována a distribuována vajíčka *T. suis* pod komerčním názvem TSO® společností Tanawisa. Vajíčka jsou získávána z exkrementů infikovaných prasat. Pod přísným dohledem jsou dále upravována tak, aby v organismu hostitele nedospěla a nedošlo tak k šíření parazita do vnějšího prostředí (Cheng et al., 2015). Tento přípravek je individuálně využíván jedinci trpícími např. Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou, revmatoidní artritidou, roztroušenou sklerózou, autismem či potravinovými alergiemi. Až u 80 % pacientů bylo v průběhu užívání přípravku TSO® zaznamenáno zlepšení průběhu onemocnění nebo dokonce jeho remise (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017). Jako většina léčivých přípravků může užívání TSO® vyvolat vedlejší účinky, které jsou úzce spojeny s dávkováním přípravku a zdravotní kondicí každého jedince. U uživatelů se mohou objevit gastrointestinální potíže, nicméně ve většině případů vedlejší účinky pozorovány nebyly (Bager et al., 2011; Sandborn et al., 2013; Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b).

Necator americanus

Tuto hlístici řadíme do kmene Nematoda, řád Strongylida. *N. americanus* má přímý vývojový cyklus, dospělci jsou lokalizováni v tenkém střevě definitivního hostitele, člověka (Roberts et al., 2013). U hostitele přítomnost *N. americanus* vyvolá vývoj protizánětlivé imunitní odpovědi a jí odpovídající produkci cytokinů (Gaze et al., 2012; McSorley et al., 2011).

V rámci klinických studií byl *N. americanus* testován u pacientů s Crohnovou chorobou, astmatem a celiakií (Smallwood et al., 2017; Wammes et al., 2014). Také probíhaly studie u pacientů s roztroušenou sklerózou, ale výsledky zatím nejsou známy (Smallwood et al., 2017). Část pacientů s Crohnovou chorobou po léčbě vykazovala zlepšení klinického obrazu onemocnění (Croese et al., 2006). V případě astmatu a celiakie nebylo zaznamenáno významné zlepšení klinického průběhu onemocnění, ačkoli pacienti s celiakií po léčbě vykazovali vývoj protizánětlivé imunitní odpovědi (Croese et al., 2013; Daveson et al., 2011; Feary et al., 2009; McSorley et al., 2011).

Larvy *N. americanus* jsou komerčně dostupné u různých společností (Symmbio, Your Symbionts, Worm Therapy, Autoimmune Therapies). Jsou využívány skupinou „self-treaters“ k léčbě více než 50 různých autoimunitních onemocnění jako je např. roztroušená skleróza, zánětlivé onemocnění střev, alergie aj. (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017). Zlepšení klinického průběhu onemocnění bylo zaznamenáno u 40-100 % uživatelů. Z fyziologické podstaty vývoje *N. americanus* v těle hostitele jsou nejčastějšími nežádoucími příznaky při kolonizaci touto hlísticí únava, anemie, kožní alergie a vyrážky, bolest břicha, průjem.

Avšak projevy vedlejších příznaků záleží na infekční dávce a na individuálním zdravotním stavu každého jedince (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017).

Trichuris trichiura

T. trichiura je hlístice (Nematoda) patřící do řádu Enoplida. Vývojový cyklus *T. trichiura* je přímý, definitivním hostitelem jsou především lidé a lidoopy. Dospělci jsou lokalizováni v tlustém a slepém střevě (Roberts et al., 2013). Přítomnost této hlístice u hostitele indukují protizánětlivou imunitní odpověď (Broadhurst et al., 2010; Broadhurst et al., 2012).

T. trichiura byl testován v rámci klinických studií zaměřených na helminto-terapii u pacientů s roztroušenou sklerózou. U pacientů užívajících vajíčka *T. trichiura* (*T. trichiura* ova-TTO) došlo ke zlepšení průběhu onemocnění nebo k jeho remisi (Correale & Farez, 2011).

Dnes jsou skupinou „self-treaters“ využívána komerčně dostupná vajíčka *T. trichiura* (TTO) distribuována společnostmi Autoimmune Therapies a Symbio. Vajíčka jsou užívána jedinci trpícími např. Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou, astmatem nebo alergiemi. U těchto onemocnění bylo během léčby a po léčbě zaznamenáno až 100% zlepšení příznaků onemocnění nebo dokonce jeho remise. Pozitivní vliv na neuropsychická onemocnění a autismus však nebyl potvrzen (Broadhurst et al., 2012; Cheng et al., 2015). Výhodou TTO je relativně nízká cena a především dlouhodobé přežití *T. trichiura* v těle hostitele v řádech až několika let, tudíž není nutná častá reinfekce jako v případě TSO. Přírodním definitivním hostitelem *T. trichiura* je člověk, proto zde může dojít k nekontrolovatelné kolonizaci nebo k rozšíření helminta do vnějšího prostředí. Uživatelé uvedli častější výskyt vedlejších účinků, jako jsou krvavé průjmy, nevolnost, anémie nebo alergické reakce (Cheng et al., 2015).

1.4 Výběr dalších možných kandidátů vhodných pro účely helminto-terapie

V rámci helminto-terapie bylo již testováno mnoho helmintů a to jak ve studiích zaměřených na zvířecí modely, tak v klinických studiích (viz. kapitoly 1.3.1 a 1.3.2). I přes to, že u některých z nich byl prokázán terapeutický potenciál při léčbě autoimunitních onemocnění, stále je potřeba hledat nové kandidáty z řad známých helmintů. Tito by měli splňovat několik kritérií, která byla definována ve studii Lukeš et al. (2014):

- lokalizace dospělců ideálně v zažívacím traktu hostitele;
- vývojový cyklus s nulovou nebo minimální somatickou či viscerální migrací;
- minimální, ideálně nulová patogenita pro definitivního hostitele;

- schopnost získávat infekční stádia k dalšímu využití v helminto-terapii;
- nízká pravděpodobnost šíření infekčních stádií do prostředí;
- dostatečná znalost biologie helminta, jeho hostitelské specifity, vývojového cyklu, patogenity a epidemiologie.

Všechna výše zmíněná kritéria splňuje tasemnice *H. diminuta*. Proto mohla být zvolena jako vhodný kandidát pro účely výzkumů v rámci helminto-terapie.

1.5 *Hymenolepis diminuta*

Hymenolepis diminuta je celosvětově rozšířená tasemnice spadající do třídy Cestoda čeledi Hymenolepididae. Vývojový cyklus této tasemnice je nepřímý. Jejím definitivním hostitelem jsou hlodavci, převážně potkan a krysa (Roberts et al., 2013). Případy kolonizace člověka touto tasemnicí jsou vzácné a vzhledem k minimálním patologickým příznakům nákazy, zřídka prokazatelné (Kalaivani et al., 2014; Nkouawa et al., 2015). V rámci helminto-terapie je v poslední době imunomodulační vliv *H. diminuta*, nebo jejích E/S produktů či extraktů, testována *in vivo* u experimentálních onemocnění zvířecích modelů či *in vitro* u různých buněčných linií (Sobotková et al., under review).

1.5.1 Životní cyklus *Hymenolepis diminuta*

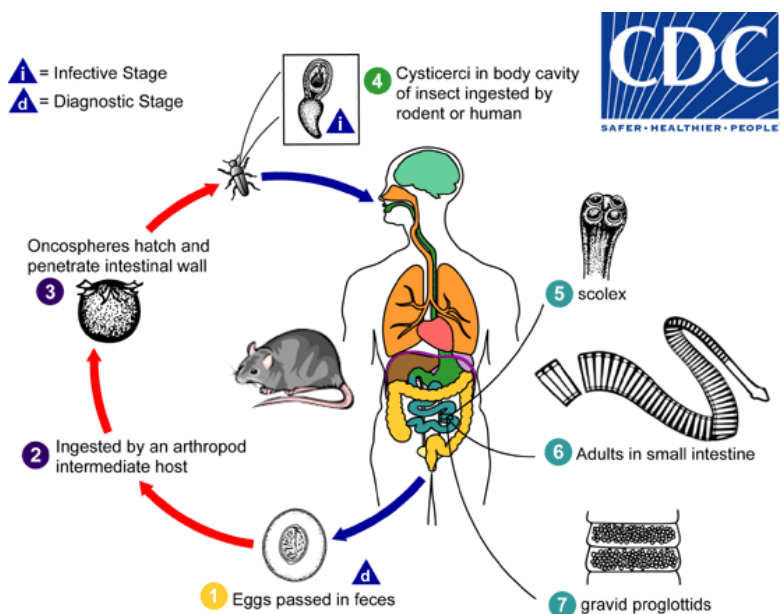
Tasemnice *H. diminuta* má nepřímý, dvouhostitelský vývojový cyklus (Obr.1). Vajíčka tasemnice jsou vylučována z těla definitivního hostitele spolu s exkrementy. Ve vnějším prostředí jsou pozřena mezihostitelem, jimiž jsou nejčastěji bezobratlí a brouci z čeledi potěmnikovití (Roberts et al., 2013). Ve střevě mezihostitele dochází k uvolnění larválního stádia, tzv. onkosféry, a její migraci do tělní dutiny. Zde se přibližně během 10-14 dní vyvíjí larvocysty. Po pozření mezihostitele s infekce schopnými larvocystami dochází k infekci definitivního hostitele (Andreassen et al., 1999). Larvocysty se v tenkém střevě definitivního hostitele pomocí přísavkových orgánů přichycují a v průběhu 18-21 dní dospívají (prepatentní perioda). Po uplynutí této doby jsou v těle definitivního hostitele již přítomny pohlavně dospělé tasemnice schopné produkce vajíček, tj. patentní perioda (Andreassen et al., 1999; Roberts et al., 2013).

1.5.2 Morfologický popis *Hymenolepis diminuta*

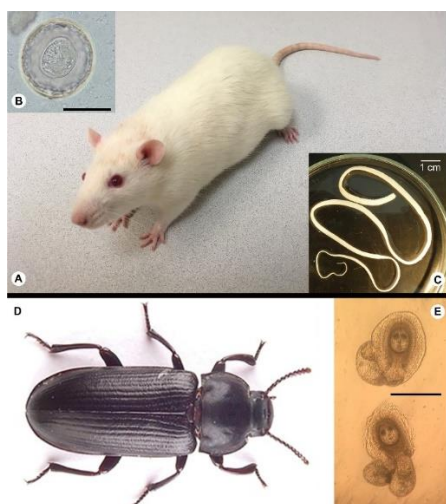
Dospělá tasemnice dorůstá délky obvykle 20-90 cm. Její skolex nese čtyři kruhové přísavky s rostelem bez háčků. Tělo *H. diminuta* je dorzálně zploštělé, složené z jednotlivých proglotid se samčími, samičími pohlavní orgány, koncová proglotida obsahují vajíčka (Hendrix &

Robinson, 2012; Roberts et al., 2013). Vzhledem k absenci zažívací soustavy přijímá *H. diminuta* potravu celým povrchem těla, který je kryt glykokalyxem.

Vajíčka *H. diminuta* jsou kulatá či oválná, silnostěnná, o velikosti 60 až 80 μm . Uvnitř vajíček je onkosféra s hexakantem. Z onkosféry se v těle meziphostitele vyvíjí larvocysty s ocasním přívěskem (cerkomer), jejichž velikost je 150-200 μm (Chevy et al., 2002). Vývojová stádia *H. diminuta* jsou zobrazena na Obr. 2.



Obr. 1: Vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta* (<http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html>)



Obr. 2: Životní stádia *Hymenolepis diminuta* a její hostitelé v laboratorních podmínkách: A- definitivní hostitel SPF (specific pathogen free) outbrední potkan Wistar, B- vajíčko s onkosférou, C- dospělec *H. diminuta*, D- meziphostitel *Tenebrio molitor*, E- larvocysty. Obrázek převzat z Řežábková et al. (under review).

1.5.3 Imunomodulační účinky *Hymenolepis diminuta*

Všeobecně jsou imunomodulační účinky *H. diminuta* testovány především na myším modelu, ačkoli myš není jejím přirozeným definitivním hostitelem. K vypuzení tasemnice z těla myši dochází přibližně 9-14 dní po infekci (Andreassen et al., 1999; Hernandez et al., 2013; McKay, 2010). Naopak o modulačních mechanismech *H. diminuta* v těle přirozeného definitivního hostitele, potkana nebo křavy, je známo méně informací (McKay, 2010; Persaud et al., 2007).

Přítomnost *H. diminuta* v těle definitivního hostitele celkově vede k rozvoji protizánětlivých imunitních procesů, jako je indukce protizánětlivé (Th2) imunitní odpovědi a s ní související produkce cytokinů IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. Také jsou aktivovány eosinofily, žírné buňky, B buňky, které produkují příslušné protilátky (Hernandez et al., 2013; McKay, 2010; Persaud et al., 2007; Webb et al., 2007).

1.5.4 Účinky exkrečních/sekrečních produktů a extraktů *Hymenolepis diminuta*

Dospělec *H. diminuta* produkuje množství E/S produktů, především proteinů, glykoproteinů, glykanů, glykolipidů aj., které mohou hrát důležitou roli v interakci parazita s hostitelem (Bień et al., 2016; McKay, 2010). V mnoha studiích bylo prokázáno, že nejen E/S produkty *H. diminuta*, ale také antigeny obsažené v extraktu z dospělce, indukují protizánětlivou imunitní odpověď a také pozitivně ovlivňují experimentálně indukovaná zánětlivá onemocnění *in vivo* u myších modelů (Matisz et al., 2015; Reyes et al., 2015; Reyes et al., 2016b, Wu et al., 2017).

In vitro testování E/S produktů a extraktů z dospělce *H. diminuta* na různých buněčných liniích (např. dendritické buňky, makrofágy, epiteliální buňky) také potvrdilo snížení experimentálně vyvolaného zánětu a vývoj protizánětlivé imunitní odpovědi a mechanismů k ní vedoucích (Johnston et al., 2010; Lopes et al., 2015; Zawistowska-Deniziak et al., 2017).

Přesto, že některé molekuly obsažené jak v E/S produktech *H. diminuta*, tak v hrubém extraktu z dospělce či larvocysty byly již identifikované, experimenty zaměřené na vliv jednotlivých látek izolovaných přímo z extraktů či E/S produktů *H. diminuta* na modulaci imunitního systému doposud provedeny nebyly (Bień et al., 2016; Sulima et al., 2017, 2018).

1.5.5 Imunomodulace *Hymenolepis diminuta* v rámci experimentálních onemocnění

V průběhu minulého desetiletí začal být intenzivně testován vliv *H. diminuta* na různá modelová zánětlivá onemocnění na myších a potkaních modelech (McKay, 2010; Weinstock

& Elliott, 2013). Obvykle je v rámci terapie experimentálních zánětlivých onemocnění volen tzv. preventivní přístup. Zde je zjišťováno, zda přítomnost helminta v těle hostitele před experimentálním vyvoláním onemocnění pozitivně ovlivní jeho průběh. Méně využívané je testování terapeutického efektu, jehož cílem je zjistit vliv helminta na již probíhající experimentální zánětlivé onemocnění (Parker et al., 2013).

Často je zjišťován vliv živé tasemnice na průběh nebo vývoj experimentálně vyvolaných střevních zánětů, jako je:

- i) DNBS -dinitrobenzensulfonovou kyselinou vyvolaný zánět střev (Hunter et al., 2005; Hunter et al., 2010; Jirků-Pomajbíková et al., 2018; Melon et al., 2010; Persaud et al., 2007; Reyes et al., 2016a; Reyes et al., 2016b);
- ii) DSS – zánět střev vyvolaný dextranem sodným (Reardon et al., 2001);
- iii) oxazolonom indukovaný zánět střev (Hunter et al., 2007; Wang et al., 2010);

Méně často testována je experimentálně vyvolaná artritida pomocí K/BxN (artritogenní sérum) a FCA-Freundovo kompletní adjuvans (Graepel et al., 2013; Shi et al., 2011).

Všeobecně u myších modelů dochází při kolonizaci *H. diminuta* k silné protizánětlivé imunitní odpovědi a rozvoji příslušných cytokinů. Infekce *H. diminuta* tedy napomáhá ochraně proti rozvinutí experimentálního zánětu střev vyvolaného DNBS (Hunter et al., 2005; Melon et al., 2010; Persaud et al., 2007; Reyes, et al., 2016a; Reyes et al., 2016b). Tento ochranný efekt byl pozorován také u FCA indukovaného zánětu kloubů u myší (Shi et al. 2011). Preventivní kolonizace *H. diminuta* snižovala závažnost DSS indukovaného zánětu střev (Reardon et al. 2001). Také byl prokázán pozitivní efekt kolonizace *H. diminuta* na neurokognitivní onemocnění způsobená autoimunitním zánětem (Williamson et al. 2016). V případě oxazolonom vyvolaného střevního zánětu a K/BxN indukované polyartritidy u myší nebyl tento efekt zaznamenán (Graepel et al., 2013; Hunter et al., 2007; Wang et al., 2010).

U potkaního modelu nebyla prokázána ochrana proti rozvoji DNBS indukovaného zánětu (Hunter et al., 2005; Jirků-Pomajbíková et al., 2018). V případě DNBS zánětu indukovaného v patentní periodě kolonizace *H. diminuta*, bylo zaznamenáno snížení zánětu oproti kontrolní skupině potkanů, menší zánět, nižší patologické projevy onemocnění a rychlejší uzdravení (Jirků-Pomajbíková et al., 2018).

1.5.6 Terapeutický potenciál *Hymenolepis diminuta* v rámci helmito-terapie lidí

Potencionální terapeutický účinek *H. diminuta* doposud nebyl v klinických výzkumech testován (Smyth et al. 2017). Účinky *H. diminuta* jsou popsány pouze v sociálně-lékařských studiích, které podrobně popisují použití, přínosy a rizika *H. diminuta* jako helminta potencionálně využitelného v rámci helminto-terapie. Zdrojová data jsou získávána především od skupiny „self-treaters“ (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017; Smyth et al., 2017).

Larvocysty *H. diminuta* jsou komerčně dostupné u společností Biome Restoration LTD a Worm Therapy. Pro terapeutické účely jsou larvocysty získávány z mezihostitelů-brouků. Na základě dostupných informací je úspěšnost infekce a terapeutická efektivita léčby závislá právě na způsobu kultivace larvocyst v mezihostiteli a zvláště pak na jejich fyzické kondici (Cheng et al., 2015; Smyth et al., 2017). Stejně jako v případě TSO je při užívání HDCs nutná reinfekce. Terapeutická dávka závisí na zdravotním stavu uživatele. V průměru se užívá 20-30 HDCs každé 2-4 týdny (Cheng et al., 2015). HDCs jsou užívány jedinci trpícími autoimunitními onemocněními např. alergiemi, astmatem, autismem, zánětlivými onemocněními střev, neuropsychickými onemocněními aj. (Cheng et al., 2015; Liu et al., 2017; Smyth et al., 2017). Až u 95 % uživatelů dochází ke zlepšení průběhu onemocnění vedoucímu k možné remisi. Vedlejší účinky při užívání HDCs nejsou nijak závažné, jedná se především o nevolnost bezprostředně po infekci, velmi vzácně byly popsány žaludeční křeče a zvracení (Cheng et al., 2015; Smyth et al., 2017).

2 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo otestovat imunomodulační účinky extraktů z dospělé, larválních stádií a exkrečních/sekrečních produktů tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) na *in vitro* modelu střevních epitelálních buněk z potkana.

Pro splnění hlavního záměru byly vytyčeny následující dílčí cíle:

- zvolit časové body vhodné pro analýzu imunomodulačního účinku extraktů z *H. diminuta*;
- vybrat optimální koncentraci jednotlivých extraktů s nejsilnějším protizánětlivým účinkem;
- účinek vybraných koncentrací extraktů otestovat na *in vitro* modelu ovlivněným a neovlivněným zánětem;

3 Materiál a metody

3.1 Seznam použitého materiálu a chemikálií

Běžná chemie

- Bikarbonát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- DMEM High Glucose w/ stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate (Biosera, Nuaille, Francie)
- Etanol (Penta, Praha, Česká Republika)
- Chloroform (Penta)
- Kyselina fosforečná 85% (Penta)
- RPMI – 1640 (Sigma-Aldrich)

Speciální chemie

- Caninsulin 40 IU/ml (MSD Animal Health, Wellington, Nový Zéland)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x w/o Calcium w/o Magnesium (Biosera)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (Lach- Ner, s.r.o., Neratovice, Česká Republika)
- Fetal Bovine Serum (South America), Premium (Biosera)
- LPS O111:B4+ (Sigma-Aldrich)
- Penicilin (Biosera)
- Protein Standard, 2 mg/vial BSA (Sigma-Aldrich)
- Streptomycin (Biosera)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)

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

- B2M TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific)
- IL-17re TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific)
- IL-33 TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific)
- TNFa TaqMan gene expression assay for rats (Thermo Fisher Scientific)

Přístroje a příslušenství

- Accublock™ (Labnet, Edison, USA)
- Amicon Stirred Cell (Merck Millipore Massachusetts, USA)
- Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter 10 kDa (Merck Millipore)
- BioRAD T100™ Thermal Cycler (Hercules, Kalifornie, USA)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Durapore®PVDF, Filter membranes (Sigma-Aldrich)
- Eclipse Ts2 (Nikon, Tokyo, Japonsko)
- Esco CelCulture® CO₂ incubator (Esco Micro Pte. Ltd., Singapur)
- Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- LC480 (Roche, Basilej, Švýcarsko)
- NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).
- Sartorius (Göttingen, Německo)
- Sonikátor Hielscher UP 200S, jehla S3-microtip 3 (Teltow, Německo)
- Tissue Culture Flasks 75cm² (Techno Plastic Products AG, Trasadinger, Švýcarsko)
- Tissue Culture Test Plates 12-well (Techno Plastic Products AG)
- Ultrafiltration Discs, 10 kDa NMW (Merck Millipore)

3.2 Udržování kultury helminta v laboratorních podmínkách

Kultura tasemnice *H. diminuta* v laboratorních podmínkách byla udržována dle jejího přirozeného vývojového cyklu.

3.2.1 Potemník moučný (*Tenebrio molitor*)

Chov: Jako mezipřenositel tasemnice *H. diminuta* byl použit potemník moučný (*Tenebrio molitor*). Brouci byli chováni v teráriu vystlaném pilinami, při teplotě 28 °C a 12 hodinový světelný režim byl zajištěn 18W zářivkou s časovým spínačem. Potemníci byli krmeni 2-3× týdně zeleninou, ovocem či suchým pečivem, voda byla podávána na vatě v Petriho misce.

Infekce: Potemníci byli krmeni po dobu pěti dnů směsí vody a trusu potkanů kolonizovaných tasemnicí, tudíž trus obsahoval její vajíčka. V případě úspěšné infekce byly z těla potemníka po třech týdnech vypreparovány infekce schopné larvocysty, kterými byli infikováni potkani.

3.2.2 Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

Chov: Jako definitivní hostitelé tasemnice *H. diminuta* byli použiti outbrední SPF (specific pathogen free) potkani Wistar (chov Envigo RMS SRL; Holandsko, distribuce Anlab s.r.o., Praha, Česká republika). Potkani byli chováni vždy po dvou zvířatech v boxech (teplota 22 °C až 24 °C, 12 hodinový denní režim) v systému individuálně odvětrávaných jednotek (Green Line Sealsafe Plus Rat, Trigon plus s.r.o., Čestlice, ČR) bariérového chovu ve standardních podmínkách akreditovaného zvěřince Parazitologického ústavu (Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice). Kompletní granulovaná krmná směs a voda byla potkanům podávána *ad libitum*.

Infekce: Potkani byli infikováni larvocystami získanými v daný den infekce z kolonizovaných brouků. Potemníci byli usmrceni dekapitací, následně byla tělní dutina na ventrální straně mediálně rozstřížena. Larvocysty byly z těla brouka vyplaveny na Petriho misku pomocí stříčky s PBS o pH 7,4. Larvocysty byly následně přeneseny pipetou na čistou Petriho misku a znovu promyty dostatečným množstvím PBS. Samotná infekce potkanů probíhala dva po sobě jdoucí dny. Potkani byli infikováni perorálně pomocí jícnové sondy vždy 10-15 larvocystami ve 200 µl PBS roztoku. Úspěšnost infekce byla kontrolována přítomností vajíček tasemnice v trusu 16-21. den po infekci, pomocí modifikované Sheatherovy flotační metody (Sheather, 1923) a světelné mikroskopie. Při úspěšné infekci byla v trusu potkanů detekována silnostěnná, příčně pruhovaná oválná či kulatá vajíčka o velikosti 60-80 µm

s charakteristickými morfologickými znaky pro *H. diminuta*, tj. onkosféra se zřetelným hexakantem v jeho středu.

3.3 Příprava exkrečních/sekrečních produktů z helminta

3.3.1 Kultivace *Hymenolepis diminuta* v médiu *in vitro*

Pro účely získání exkrečních/sekrečních produktů (HdES) z *H. diminuta* bylo třeba nejprve vypreparovat tasemnici z tenkého střeva definitivního hostitele, a to v průběhu patentní periody infekce. Potkan byl utracen cervikální dislokací v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Tasemnice byly vyjmuty z tenkého střeva potkana, promyty 2× v 50 ml PBS na Petriho misce a poté v 80 ml roztoku RPMI a PBS (smíchanými v poměru 1:1). Tasemnice z jednotlivých potkanů byly zváženy a přeneseny do RPMI média (připraveno dle návodu výrobce) bez séra, obsahujícího antibiotika (penicilin: 100 U/ml média, streptomycin: 100 µg/ml média). Množství RPMI média bylo vždy 200 ml na 1 g tasemnic. Tasemnice byly poté kultivovány 18 hodin v termoboxu Esco CelCulture® (při 38,8 °C a 5 % CO₂ atmosféře).

3.3.2 Sterilizace a koncentrace HdES

Po 18 hodinách byly tasemnice z média vyjmuty a médium obsahující jejich E/S produkty bylo sterilizováno pomocí filtrační aparatury Sartorius přes Durapore® filtr s velikostí pórů 0,22 µm. Sterilní médium bylo uchováváno na ledu a bezprostředně po sterilizaci koncentrováno na chlazené ultrafiltrační cele Amicon Stirred Cell s membránovým filtrem Ultrafiltration Discs o velikosti pórů 10 kDa dle pokynů výrobce. HdES o velikosti <10 kDa byly následně převedeny do DMEM média pomocí centrifugačních kolonek Amicon Ultra-0,5 dle návodu výrobce. Koncentrace HdES byla změřena metodou dle Bradforda popsané v kapitole 3.6. Nakonec byla koncentrace HdES ředěním v DMEM médiu upravena na koncentraci 300 µg/ml.

3.4 Příprava hrubých extraktů ze stádia dospělé

Po vyjmutí tasemnice z těla potkana (viz výše) byly celé tasemnice 3× omyty v 50 ml PBS obohaceným o antibiotika (100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin), poté promyty v 50 ml sterilního PBS (bez antibiotik) a zváženy. Vždy 2 g tasemnic byly přeneseny do 15 ml zkumavky s 5 ml PBS a na ledu homogenizovány sonikací sonikátorem Hielscher. Sonikace probíhala za podmínek 0,5 impuls a 20 % amplituda, třemi cykly po 2 min sonikace s 3 min pauzou. Takto připravená směs byla odstředěna při 5 300 g, 4°C, 10 minut. Poté byla odebrána interfáze mezi peletou a tukovou suspenzí na povrchu, přenesena do nové zkumavky a opět

odstředěna při 5 300 g, 4 °C, 10 minut. Interfáze byla odebrána stejným způsobem, zkoncentrována a převedena do DMEM média na centrifugačních kolonách Amicon Ultra-0,5 dle návodu výrobce. Koncentrace proteinů v získaném HdEA byla změřena metodou dle Bradforda popsanou v kapitole 3.6. Koncentrace proteinů v HdEA byla opět upravena ředěním v DMEM médiu na koncentraci 300 µg/ml.

3.5 Příprava hrubých extraktů z larválních stádií

Larvocysty vypreparované z tělní dutiny potemníků byly promyty v 10 ml PBS a zmrazeny při -20°C. Teprve po shromáždění dostatečného množství larvocyst (odpovídající cca 100 µl) byly zpracovány následujícím způsobem. Nejprve byla jejich stěna narušena mechanicky v třecí misce pomocí tloučku. Tento hrubý homogenát byl přenesen do 1,5 ml zkumavek a v nich ponořen na dvě minuty do tekutého dusíku. Následovalo rychlé rozmrazení na termobloku nastaveném na teplotu 38 °C až do úplného rozmrazení směsi. Tyto rychlé změny teplot (-196 až +38) byly opakovány 3× v rychlém sledu, s cílem dalšího narušení stěn larvocyst. Homogenát byl dále 2 min na ledu sonikován pomocí sonikátoru Hielscher (jehla S3-microtip 3; 0,5 impuls, 20 % amplituda). Homogenizovaná tkáň byla následně odstředěna při 5 300 g, 4 °C, 10 minut, supernatant byl odebrán a opět odstředěn za stejných podmínek. Nakonec byl supernatant opět odebrán a převeden do DMEM média na centrifugačních kolonách Amicon Ultra-0,5 dle návodu výrobce. Koncentrace proteinů ve výsledném HdEL byla změřena metodou dle Bradforda (viz. kapitola 3.6) a upravena ředěním v DMEM médiu na koncentraci 300 µg/ml.

3.6 Měření koncentrace extraktů

Koncentrace HdES, HdEA a HdEL v médiu byla stanovena spektrofotometrickou metodou měření koncentrace proteinů dle Bradforda. Jejím principem je posun absorpčního maxima (tj. změna zabarvení roztoku), který je důsledkem vazby barviva Coomassie Brilliant blue na molekulu proteinu. Zásobní roztok činidla byl připraven ze 175 ml Coomasie Brilliant Blue G-250, 50 ml 96% etanolu a 100 ml 85% kyseliny fosforečné. Následně byl připraven pracovní roztok obsahující 425 ml destilované vody, 15 ml 96% etanolu, 30 ml 85% kyseliny fosforečné a 30 ml zásobního roztoku činidla. Na mikrotitrační destičku pak bylo nanášeno po 10 µl BSA v koncentracích 5, 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 a 2000 µg/ml, které tvořily kalibrační křivku, a triplikát vzorku o neznámé koncentraci. Ke všem vzorkům bylo poté přidáno 40 µl PBS a 500 µl pracovního roztoku činidla. Na mikrotitrační destičku pak bylo nanášeno po 200 µl všech vzorků a jejich absorbance byla změřena na spektrofotometru

při vlnové délce 595 nm. Výsledná koncentrace HdES, HdEA a HdEL byla stanovena porovnáním jejich absorbance s absorbcí vzorků z kalibrační křivky.

3.7 Tkáňové kultury

Pro zjištění imunomodulačních účinků HdES, HdEA a HdEL byl použit *in vitro* model - střevní epiteliální buněčná linie z potkana - IEC6 (ATCC® CRL-1592™, ATCC®, Manassas, USA).

3.7.1 Rozmražení buněk a kultivace

Aliquoty buněčné linie IEC6 byla uchovávány v tekutém dusíku v kryogenním boxu při teplotě -196°C. Po rozmražení byly buňky kultivovány v kultivačních lahvích Tissue Culture Flasks vždy v 10 ml kompletního růstového média (DMEM, 862 mg/l komplex L-alanyl-L-glutamin obsažen v základním DMEM, 0,1 IU/ml Caninsulin, 10% FBS, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin) v termoboxu při teplotě 37,7°C a 5 % CO₂ atmosféře. Po dosažení konfluencie 80-90%, která byla kontrolována pod mikroskopem, bylo z povrchu buněk odebráno staré médium. Buňky byly opláchnuty dostatečným množstvím PBS vyhřátým na pokojovou teplotu. Pro oddělení buněk ode dna bylo použito 1,5 ml roztoku 0,02 % trypsinu a 0,02% EDTA v PBS. Po 10 minutách došlo k oddělení buněk a bylo přidáno 10 ml čerstvého kompletního růstového média. Z buněčné suspenze bylo odebráno 50µl a bylo přidáno 50µl 0,5% vodného roztoku trypanové modři. Směs byla napipetována v množství 10µl do Bürkerovy komůrky s podložním sklíčkem. Pod světelným mikroskopem při 100× zvětšení byly počítány pouze živé (světle žluté) buňky. Počet buněk (x) v jednom mililitru média byl vypočítán dle vzorce

$$p \cdot 2 \cdot 10^4 = x \text{ buněk/ml}$$

(p je počet buněk ve 25 čtvercích včetně horní a pravé hranice čtverce)

Následně byla buněčná suspenze rozpipetována na 12 jamkové kultivační desky v množství 50 × 10⁴ buněk/ 0,6ml kompletního kultivačního média, tj. 50 × 10⁴ buněk v jedné kultivační jamce. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin v termoboxu, při teplotě 37,7 °C a 5% CO₂ atmosféře do dosažení konfluencie 80-90%, která byla kontrolována mikroskopicky. Poté bylo odebráno staré médium, buňky byly omyty dostatečným množstvím PBS a bylo přidáno 0,6 ml nového média (DMEM, 862 mg/l komplex L-alanyl-L-glutamin obsažen v základním DMEM, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin). Buňky byly opět inkubovány stejným postupem popsaným výše po dobu 24 hodin. Staré médium bylo

odebráno, buňky byly promyty dostatečným množstvím PBS. K buněčné linii bylo přidáváno 0,6 ml média (DMEM, 862 mg/l komplex L-alanyl-L-glutamin obsažen v základním DMEM, 1% FBS) v případě kontrolní skupiny, v případě experimentálních skupin byly buňky stimulovány výše popsaným médiem spolu s potřebnou koncentrací HdES, HdEA nebo HdEL. Takto připravená skupina experimentálních buněk byla jednu hodinu preinkubována v termoboxu při teplotě 37,7 °C a 5% CO₂ atmosféře, následně byl u potřebných skupin buněk vyvolán zánět přidáním 1ug/ml lipopolysacharidů O111:B4+ (viz kapitola 8.10).

3.8 Analýza genové exprese cytokinů

3.8.1 Izolace RNA

IEC6 buněčná linie byla zpracována pomocí kitu HybridR RNA Kit použitého dle návodu výrobce. Koncentrace celkové vyizolované RNA (ng/μl) byla změřena na spektrofotometru NanoDrop.

3.8.2 Reverzní transkripce

Substrátem pro reverzní transkripci byl 1μg vzorku celkové RNA. Ta byla následně převedena na cDNA kitem High Capacity RNA-to-cDNA Kit. Poté byla 20 μl směs inkubována za podmínek 37 °C/60 min, 95 °C/5 min a 4 °C/∞ v PCR cycleru.

3.8.3 Real-time PCR reakce

Real-time PCR reakce probíhala na 96 jamkovém panelu, kdy v každé jamce bylo 20 μl směsi: 14 μl qPCR Mix 5x Hot FirePol® 1 μl specifické fluorescenčně značené sondy a primery pro IL17re, IL-33, TNFα, 5 μl 10× naředěné cDNA. Jednotlivé reakce byly pro každý vzorek provedeny vždy 3×. Jako kontrolní gen (housekeeping gen) byl použit beta-2-mikroglobulin (B2M). Deska s připravenými vzorky byla popsána, přelepena transparentní fólií a vložena do cycleru LC480. Realt-time PCR reakce probíhala za následujících podmínek: 50 °C/2 min, 95 °C/10 min, 50 cyklů 95 °C/15 sek, 60 °C/ 1 min. Následně byla vyhodnocena relativní genová exprese porovnáním C_t hodnoty testovaného vzorku s C_t hodnotou vzorku kontrolního (housekeeping gen). C_t hodnota je hodnota cyklu, ve kterém nastane nárůst fluorescence nad práh pozadí.

3.9 Statistické analýzy

Všechna získaná data byla vyhodnocena pomocí programů GraphPad Prism 6, Excel. Rozdíly mezi experimentálními a kontrolními skupinami buněk byly statisticky vyhodnoceny Studentovým t-testem. Výsledky jsou vyjádřené jako aritmetický průměr ± střední chyba průměru

(mean ± SEM). Hvězdičkami či křížky jsou označeny statisticky významné rozdíly (* $p < 0,1$; # $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; #### $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ##### $p < 0,0001$).

3.10 Design experimentu

V rámci předložené práce byly provedeny celkem čtyři experimenty s označením I, II, IIIa, IIIb. V experimentech byl využíván tzv. preventivním přístup. Bylo zjišťováno, zda E/S produkty nebo extrakty *H. diminuta* pozitivně ovlivní nebo ochrání buněčnou linii před následně experimentálně indukovaným zánětem.

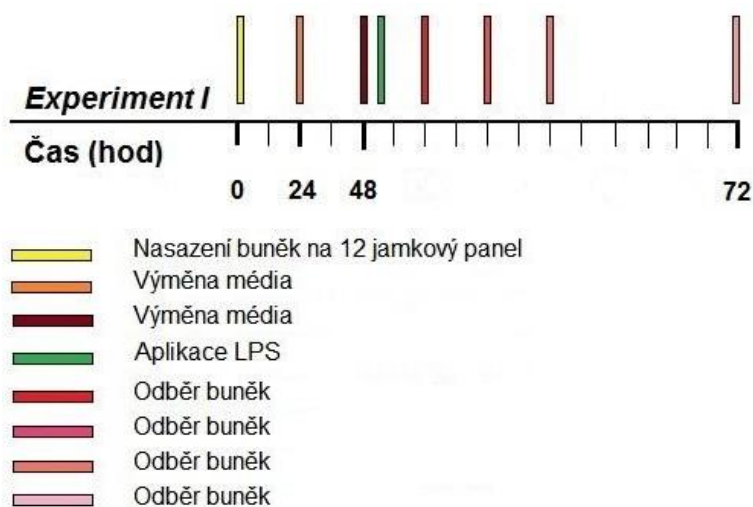
Každý jednotlivý experiment probíhal celkem tři dny vzhledem k časové náročnosti kultivace, přípravy epiteliálních potkaních buněk a inkubace s extrakty *H. diminuta*, popřípadě LPS. Tyto postupy jsou shrnuty v kapitolách 3.7.1 a 3.10.

3.10.1 Experiment I

Experiment I byl zaměřen na zjištění hladiny genové exprese cytokinu TNF α v různých časových bodech, tj. 4, 8, 12 a 24 hod od vyvolání zánětu (přidání LPS) u IEC6 buněčné linie.

Experiment I probíhal celkem tři dny (viz Obr. 3) se dvěma skupinami buněk, z nichž každá skupina byla v triplikaci:

- (i) negativní kontrola (IEC6);
- (ii) experimentální skupina (IEC6+LPS);



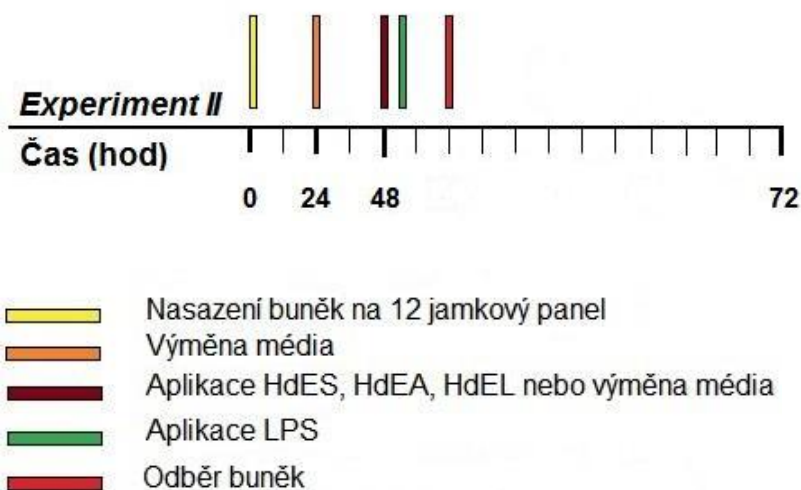
Obr. 3: Plán experimentu I.

3.10.2 Experiment II

Cílem experimentu II bylo zvolit optimální koncentraci HdES, HdEA a HdEL snižující zánětlivý účinek LPS u IEC6 buněk. Protizánětlivý účinek byl zjišťován analýzou genové exprese cytokinu TNF α IEC6 buněk odebraných po čtyřech hodinách inkubace spolu s LPS a HdES, HdEA nebo HdEL o koncentraci vždy 100 μ g/ml, 200 μ g/ml a 300 μ g/ml.

Experiment II probíhal celkem tři dny (viz Obr. 4) se třemi skupinami buněk, z nichž každá skupina byla v triplikaci:

- (i) negativní kontrola (IEC6);
- (ii) pozitivní kontrola (IEC6+LPS);
- (iii) experimentální skupina (IEC6+LPS+HdES nebo HdEA nebo HdEL),
koncentrace HdES, HdEA a HdEL byla zvolena 100 μ g/ml, 200 μ g/ml a 300 μ g/ml;



Obr. 4: Plán experimentu II.

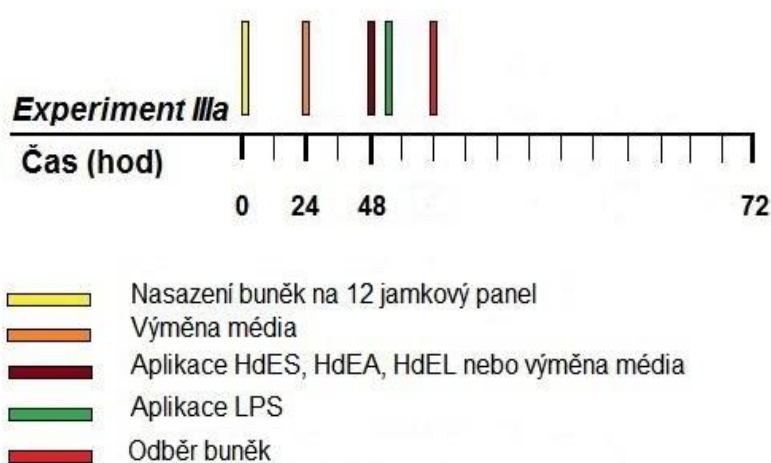
3.10.3 Experiment IIIa

Na základě předchozího experimentu byl proveden experiment IIIa, jehož cílem bylo:

- stanovit genovou expresi cytokinů TNF α , IL-17re a IL-33 u IEC6 buněčné linie inkubované čtyři hodiny společně s HdES, HdEA nebo HdEL, jejichž optimální koncentrace byla zvolena v experimentu II;
- otestovat genovou expresi TNF α , IL-17re a IL-33 u IEC6 buněčné linie inkubované po dobu čtyř hodin společně s LPS a s HdES, HdEA nebo HdEL, jejichž optimální koncentrace byla opět zvolena v experimentu II;

Experiment IIIa probíhal celkem tři dny (viz Obr. 5) se čtyřmi skupinami buněk, z nichž každá skupina byla v triplicaci:

- (i) negativní kontrola (IEC6);
- (ii) pozitivní kontrola (IEC6+LPS);
- (iii) experimentální skupina 1 (IEC6+LPS+ HdES, HdEA nebo HdEL), koncentrace HdEA a HdEL byla zvolena 300 μ g/ml, HdES 200 μ g/ml;
- (iv) experimentální skupina 2 (IEC6+ HdES, HdEA nebo HdEL), koncentrace HdEA a HdEL byla zvolena 300 μ g/ml, HdES 200 μ g/ml;



Obr. 5: Plán experimentu IIIa.

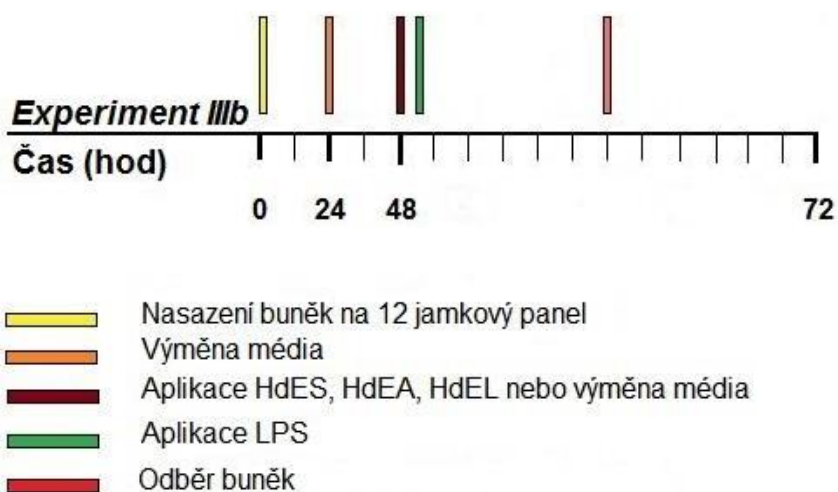
3.10.4 Experiment IIIb

Na základě předchozích experimentů (I a II) byl proveden experiment IIIb, jehož cílem bylo:

- otestovat genovou expresi cytokinů IL-33 a IL-17re u IEC6 buněčné linie inkubované 12 hodin společně s LPS a koncentrací HdES, HdEA nebo HdEL, která byla zvolena v experimentu II;
- otestovat genovou expresi cytokinů IL-33, IL-17re u IEC6 buněčné linie inkubované 12 hodin spolu s HdES, HdEA nebo HdEL, jejichž koncentrace byla zvolena v experimentu II;

Experiment IIIb probíhal celkem tři dny (viz Obr. 6) se čtyřmi skupinami buněk, z nichž každá skupina byla v triplikaci:

- negativní kontrola (IEC6);
- pozitivní kontrola (IEC6+LPS);
- experimentální skupina 1 (IEC6+LPS+ HdES, HdEA nebo HdEL), koncentrace HdEA a HdEL byla zvolena 300 μ g/ml, HdES 200 μ g/ml;
- experimentální skupina 2 (IEC6+ HdES, HdEA nebo HdEL), koncentrace HdEA a HdEL byla zvolena 300 μ g/ml, HdES 200 μ g/ml;



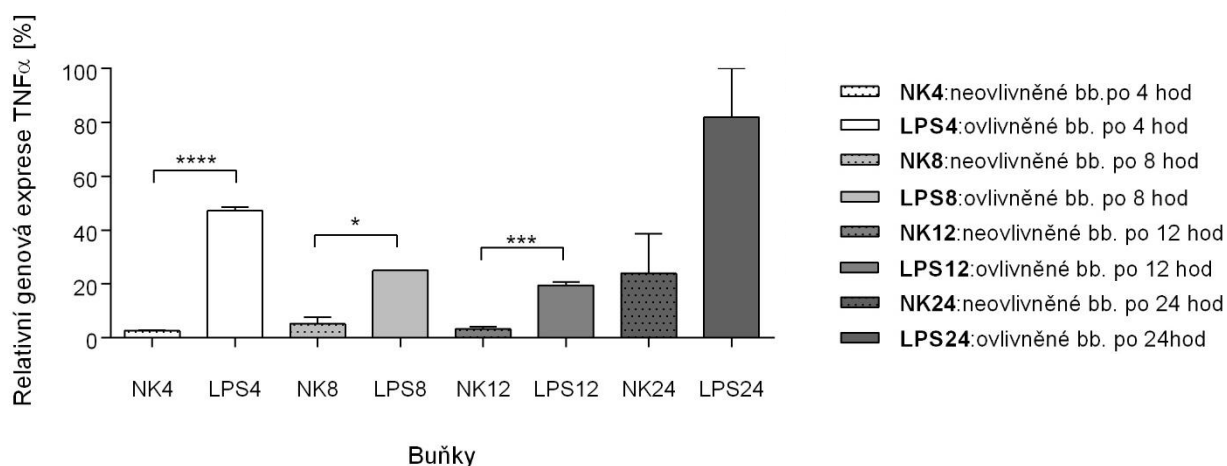
Obr. 6: Plán experimentu IIIb.

4 Výsledky

4.1 Experiment I: Stanovení vhodného časového intervalu pro vyhodnocení změn genové exprese TNF α

Experiment I byl zaměřen na změny genové exprese cytokinu TNF α po vyvolání zánětu u *in vitro* modelu epiteliálních buněk (IEC6 buněčná linie ovlivněná LPS) v různých časových intervalech po 4, 8, 12 a 24 hodinách. Pro zjišťování relativní genové exprese cytokinu metodou real-time PCR ve všech provedených experimentech byla nejprve z epiteliálních buněk izolována RNA, jejíž koncentrace se pohybovala v rozmezí 100-200 ng/ μ l.

Hladina genové exprese TNF α významně vzrostla čtyři hodiny po expozici IEC6 buněk LPS (**** $p < 0,0001$), následně významně klesá po osmi hodinách a velmi významně po 12 hodinách (Obr. 7). Tudíž jako nejvhodnější časový interval pro zjišťování hladiny genové exprese TNF α byl zvolen interval 4 hodiny po indukci zánětu *in vitro* v epiteliálních buňkách a následně pro testování dalších cytokinů (IL-17re, IL-33) intervaly 4 a 12 hodin.



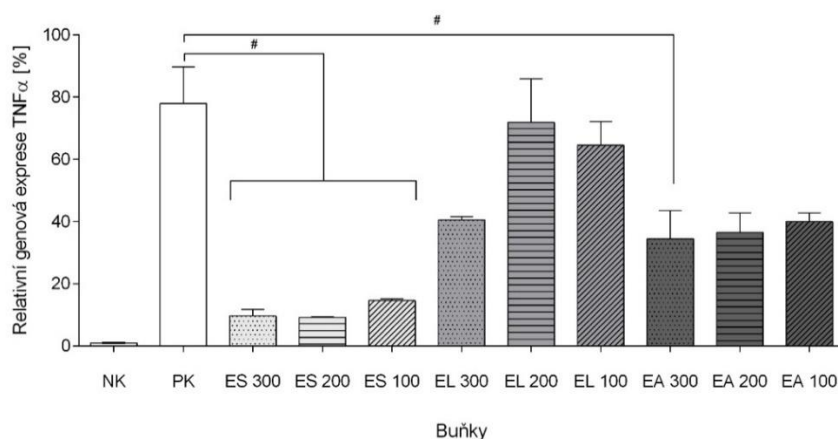
Obr. 7: Změny hladiny genové exprese TNF α v různých časových intervalech po indukci zánětu v IEC6 buněčné linii. Časové intervaly byly zvoleny po 4, 8, 12 a 24 hodinách po indukci zánětu s použitím LPS. Rozdíl mezi negativní skupinou (NK4, NK8, NK12, NK24) a experimentální skupinou (LPS4, LPS8, LPS12, LPS24) každého příslušného experimentu byl statisticky zhodnocen pomocí Studentova t-testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $n=3$). Hvězdičkami jsou označeny prokazatelně významné statistické rozdíly (* $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.2 Experiment II: Stanovení optimální koncentrace extraktů

Tento experiment navázal na výsledky předchozího experimentu (Experiment I), kdy byl stanoven optimální časový interval pro hodnocení změn TNF α (tj. po 4 hodinách od indukce

zánětu v IEC6 buňkách). Hlavním cílem tohoto experimentu bylo zjistit optimální koncentraci extraktů *H. diminuta* (HdES, HdEA a HdEL) s intenzivním protizánětlivým účinkem opět na zánětlivém *in vitro* modelu (IEC6 epiteliální buňky ovlivněné LPS). Tento protizánětlivý účinek jednotlivých extraktů byl vyhodnocen po 4 hodinách od indukce zánětu v buňkách.

Bylo zjištěno, že v porovnání s pozitivní kontrolou (PK; tj. buňky ovlivněné pouze LPS), hladina genové exprese TNF α významně klesá a to ve všech skupinách zánětem ovlivněných buněk (Obr. 8). A to nejen pod vlivem všech typů extraktů, ale i ve všech zvolených koncentracích (100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml). U extraktů HdES a HdEA se jejich protizánětlivý účinek nelišil napříč všemi koncentracemi na rozdíl od HdEL, kdy byl účinek nejvýraznější u koncentrace (300 μ g/ml, EL300; Obr. 8).



- NK: negativní kontrola
- PK: pozitivní kontrola
- ▨ ES 300: IEC6 ovlivněné HdES o koncentraci 300 μ g/ml
- ▨ ES 200: IEC6 ovlivněné HdES o koncentraci 200 μ g/ml
- ▨ ES 100: IEC6 ovlivněné HdES o koncentraci 100 μ g/ml
- ▨ EL 300: IEC6 ovlivněné HdEL o koncentraci 300 μ g/ml
- ▨ EL 200: IEC6 ovlivněné HdEL o koncentraci 200 μ g/ml
- ▨ EL 100: IEC6 ovlivněné HdEL o koncentraci 100 μ g/ml
- ▨ EA 300: IEC6 ovlivněné HdEA o koncentraci 300 μ g/ml
- ▨ EA 200: IEC6 ovlivněné HdEA o koncentraci 200 μ g/ml
- ▨ EA 100: IEC6 ovlivněné HdEA o koncentraci 100 μ g/ml

Obr. 8: Protizánětlivý účinek extraktů získaných z tasemnice *H. diminuta* (HdES, HdEL, HdEA) na *in vitro* IEC6 buňkách ovlivněných LPS. Pro účely tohoto experimentu byly zvoleny různé koncentrace, 100, 200 a 300 μ g/ml. Rozdíly mezi všemi experimentálními skupinami (ES100-300, EL100-300, EA100-300) a pozitivní kontrolou PK (IEC6 buněčná linie ovlivněná LPS) byl statisticky zhodnocen pomocí Studentova t-testu. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; n=3). Křížkem jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($^{\#}p < 0,1$).

4.3 Experiment III: Analýza imunomodulačních účinků extraktů *H. diminuta* na základě změn genové exprese TNF α , IL-17re a IL-33

V rámci experimentů III (IIIa a IIIb) byl testován účinek vybraných koncentrací všech extraktů z *H. diminuta* u *in vitro* buněk (i) neovlivněných (tj. IEC6 buňky bez LPS) a (ii) ovlivněných zánětem (tj. IEC6 buňky ovlivněné LPS). Na základě výsledků experimentu II byly použity následné koncentrace extraktů: HdEA a HdEL byly použity v koncentraci 300 $\mu\text{g/ml}$ a HdES při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Jednotlivé experimenty se lišily v časovém intervalu délky kultivace buněčné linie spolu s extrakty, případně s LPS, a tedy i v čase sklizně buněk a vyhodnocení genových expresí TNF α , IL-17re a IL-33) – v experimentu IIIa byl účinek testován po čtyřech hodinách, v experimentu IIIb byl testován po 12 hodinách.

4.3.1 Experiment IIIa: Analýza protizánětlivého účinku po čtyřech hodinách inkubace

Experiment IIIa byl zaměřen na vyhodnocení účinků extraktů na *in vitro* buňky ovlivněné i neovlivněné zánětem a to po 4 hodinách.

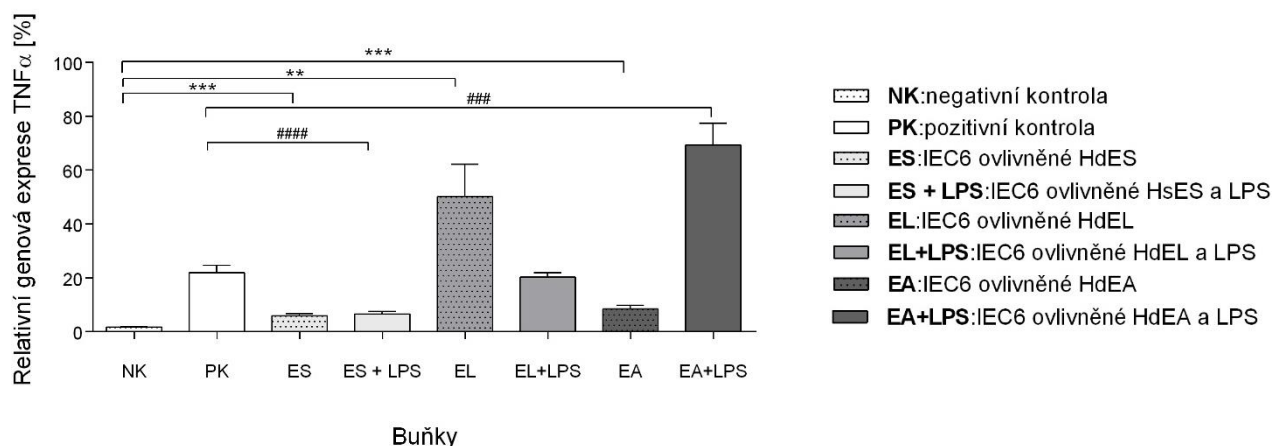
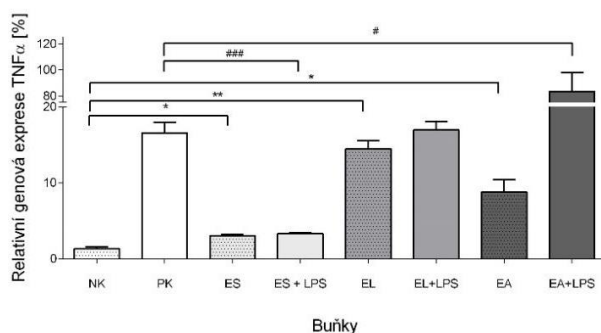
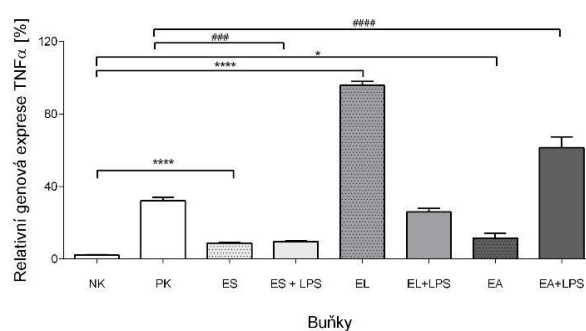
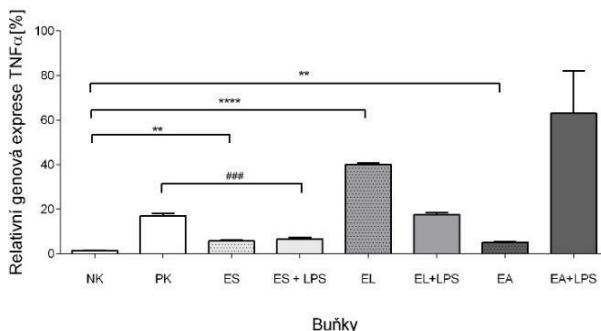
V případě TNF α byly změny v genové expresi zaznamenány zejména ve skupinách ovlivněných zánětem v porovnání s pozitivní kontrolou (PK; IEC6 buňky ovlivněné pouze LPS). Protizánětlivý účinek, tj. pokles genové exprese TNF α vůči PK, byl velmi výrazný při použití HdES (#### $p < 0,0001$), zatímco u extraktů HdEA a HdEL toto působení zaznamenáno nebylo (Obr. 9). Naopak HdEA vyvolal u zánětlivých epiteliálních buněk velmi významné zvýšení genové exprese TNF α , tedy zesílení zánětlivé reakce. Extrakt HdEL zánětlivé buňky nikterak neovlivnil, protože v porovnání s PK zde nedošlo k žádnému statisticky prokazatelnému rozdílu v genové expresi TNF α (Obr. 9).

V rámci tohoto experimentu jsme také sledovali účinek extraktů na zánětem neovlivněné epiteliální buňky. V případě HdES a HdEA byl zaznamenán pouze malý, ale významný nárůst genové exprese TNF α v porovnání s negativní kontrolou, tj. neovlivněné IEC6 buňky (Obr. 9). Naopak přítomnost extraktu HdEL velmi významně zvyšoval genovou expresi TNF α v buňkách (** $p < 0,001$) a lze tedy konstatovat, že indukuje zánětlivou imunitní reakci (Obr. 9).

V případě sledování genové exprese IL-17re byla nejvyšší hladina zaznamenána u kontrolních skupin (neovlivněné epiteliální buňky) ve dvou z celkově třech experimentů (Obr. 10 B, C). V případě jednoho experimentu, znázorněném na Obr. 10 A, genová exprese IL-17re významně, vůči kontrolním skupinám, vzrůstá u všech experimentálních skupin

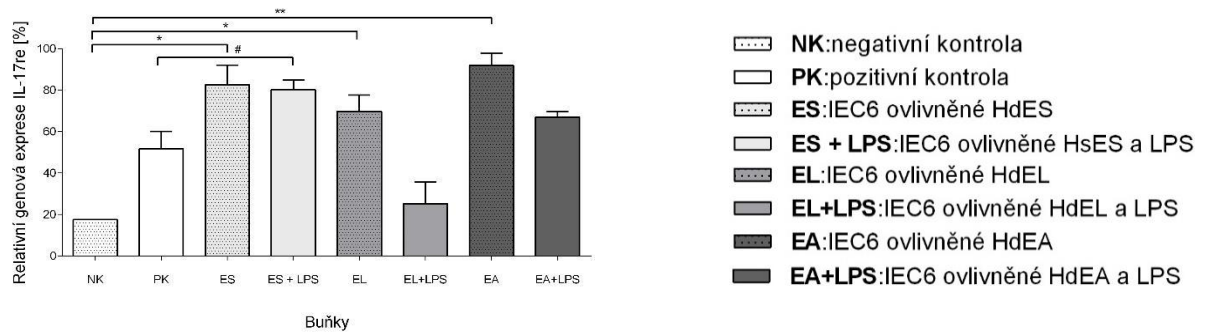
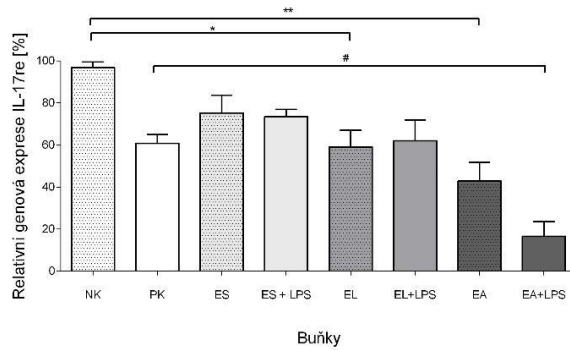
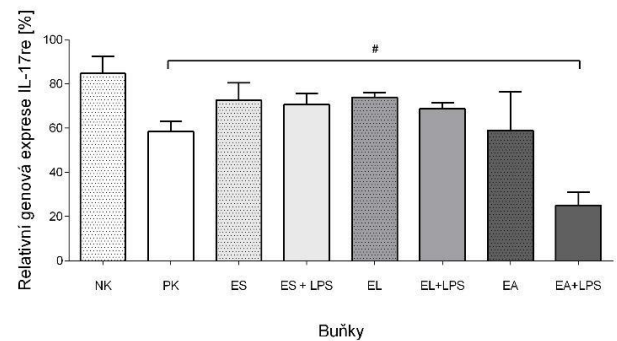
kromě buněk ovlivněných HdEL a LPS. Rozdíl v genové expresi IL-17re v kontrolních skupinách mezi experimenty může být zapříčiněn metodickou chybou. V tuto chvíli není možné říct, který výsledek je správný.

V rámci cytokinu IL-33 byl zaznamenán velmi významný nárůst jeho genové exprese u skupiny epitelálních buněk ovlivněných HdEA a to v porovnání s pozitivní kontrolou, tj. neovlivněné epitelální buňky (Obr. 11).

A**B****C****D**

Obr. 9: Protizánětlivý účinek extraktů z tasemnice *H. diminuta* (HdES, HdEL, HdEA) měřený na základě změn genové exprese TNF α na *in vitro* buňkách neovlivněných nebo ovlivněných LPS. (A)

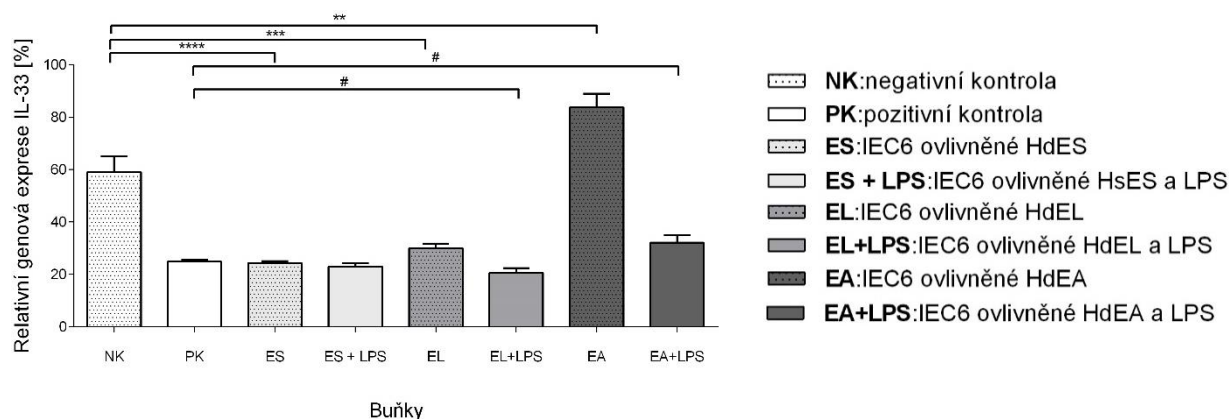
souhrnný graf třech nezávislých měření B-D. (B-D) tři nezávislé experimenty. Křížkem jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly (### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$) mezi skupinami buněk ovlivněných LPS a extrakty (ES+LPS, EL+LPS, EA+LPS) a pozitivní kontrolou (PK; buněčná linie ovlivněná LPS). Hvězdičkami jsou označeny prokazatelně významné statistické rozdíly (* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) mezi skupinami buněk ovlivněných pouze extrakty (ES, EL, EA) a skupinou negativní kontroly (NK; epiteliální buňky). Všechny tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí Studentova t-testu a jsou vyjádřené jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $n=9$ (A); $n=3$ (B-D)).

A**B****C**

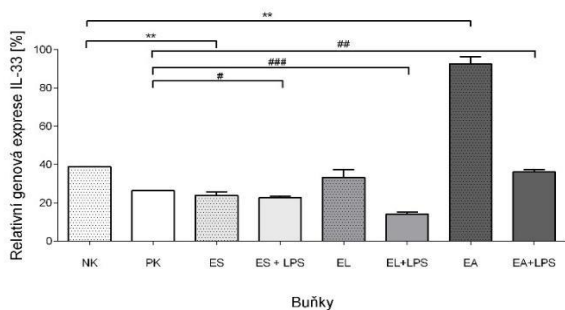
Obr. 10: Účinek extraktů z tasemnice *H. diminuta* (HdES, HdEL, HdEA) měřený na základě změn genové exprese IL-17re na *in vitro* buňkách neovlivněných nebo ovlivněných LPS.

(A-C) tři na sobě nezávislá měření. Křížkem jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($p < 0,1$) mezi skupinou pozitivní kontroly (PK; buňky ovlivněné LPS) a experimentálními skupinami buněk ovlivněných LPS a extrakty (ES+LPS, EL+LPS, EA+LPS). Hvězdičkami jsou označeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($*p < 0,1$; $**p < 0,01$) mezi skupinou negativní kontroly (NK; epitelální buňky) a skupinami buněk ovlivněných pouze extrakty (ES, EL, EA). Všechny tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí Studentova t-testu, jsou vyjádřené jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $n=3$).

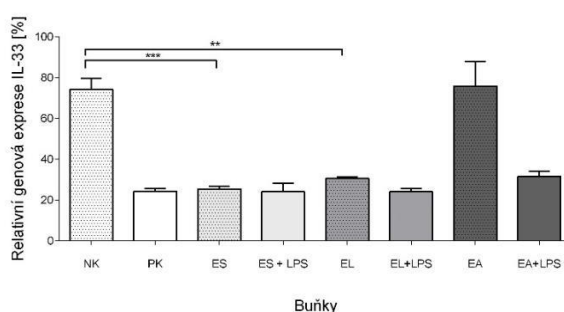
A



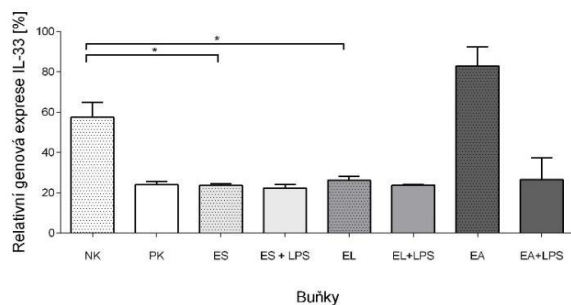
B



C



D



Obr. 11: Účinek extraktů z tasemnice *H. diminuta* (HdES, HdEL, HdEA) měřený na základě změn genové exprese IL-33 na *in vitro* buňkách neovlivněných nebo ovlivněných LPS.

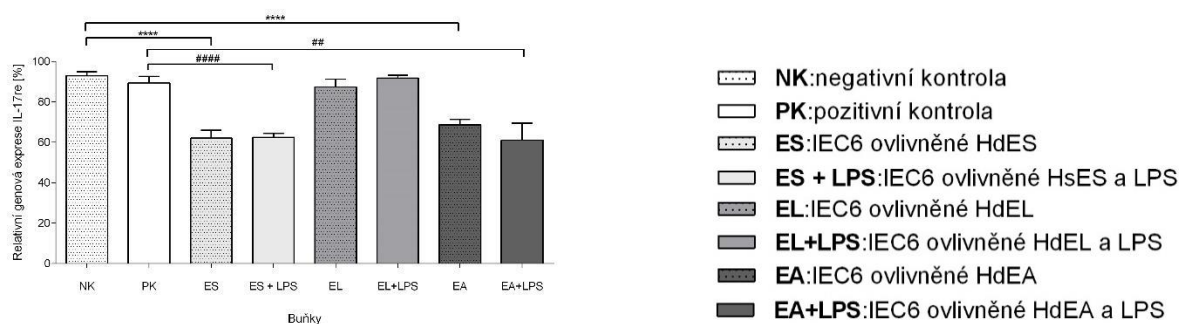
(A) souhrnný graf třech nezávislých měření B-D. (B-D) tři nezávislé experimenty. Křížkem jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($\#p < 0,1$; $\#\#p < 0,01$; $\#\#\#p < 0,001$) mezi skupinou pozitivní kontroly (PK; buňky ovlivněné LPS) a experimentálními skupinami buněk ovlivněných LPS a extrakty (ES+LPS, EL+LPS, EA+LPS). Hvězdičkami jsou označeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($*p < 0,1$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$) mezi skupinou negativní kontroly (NK; epiteliální buňky) a skupinami buněk ovlivněných pouze extrakty (ES, EL, EA). Všechny tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí Studentova t-testu, jsou vyjádřené jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $n=3$).

4.3.2 Experiment IIIb: Analýza protizánětlivého účinku po 12 hodinách inkubace

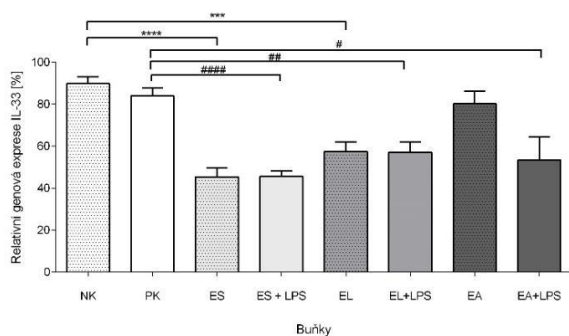
V případě experimentu IIIb byl zjišťován vliv extraktů na základě změn genových expresí pouze IL-17re a IL-33 po 12 hodinách kultivace buněčné linie spolu s extrakty při koncentraci zvolené v experimentu II - HdES byl použit v koncentraci 200 μ g/ml, a HdEA a HdEL v koncentraci 300 μ g/ml.

Genová exprese IL-17re i IL-33 v obou případech dosahuje svého maxima pouze u negativní kontroly (neovlivněné epiteliální buňky). Tudíž zde došlo k poklesu genové exprese IL-33 i IL-17re u buněk ovlivněných jak LPS, tak všemi extrakty z *H. diminuta* (Obr. 12).

A



B



Obr. 12: Účinek extraktů z tasemnice *H. diminuta* (HdES, HdEL, HdEA) měřený na základě změn genové exprese IL-33 a IL-17re na *in vitro* buňkách neovlivněných nebo ovlivněných LPS. Křížkem jsou značeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($\#p < 0,1$; $\#\#p < 0,01$; $\#\#\#p < 0,001$) mezi skupinou pozitivní kontroly PK (buňky ovlivněné LPS) a experimentálními skupinami buněk ovlivněných LPS a extrakty (ES+LPS, EL+LPS, EA+LPS). Hvězdičkami jsou označeny prokazatelně významné statistické rozdíly ($***p < 0,01$; $****p < 0,001$) mezi skupinou negativní kontroly NK (epiteliální buňky) a skupinami buněk ovlivněných pouze extrakty (ES, EL, EA). Všechny tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí Studentova t-testu, jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (mean \pm SEM; $n=6$).

5 Diskuze

V posledních desetiletích byl zvláště u lidí žijících ve vyspělých zemích zaznamenán prudký nárůst prevalence autoimunitních onemocnění, jako jsou například nespecifické střevní záněty revmatoidní artritida, roztroušená skleróza a alergie (Agmon-Levin et al., 2011; Lerner et al., 2015; Molodecky et al., 2012; Wiria et al., 2012). Nárůst těchto onemocnění je v poslední době velmi úzce spojován s nevyvážeností střevního mikrobiomu (tzv. dysbióza), přičemž bývá zdůrazňován význam řady mikroorganismů, včetně helmintů, které jsou naprosto nezbytné pro vývoj a regulaci imunitního systému zdravého člověka (Bilbo et al., 2011; Parker & Ollerton, 2013; Rook, 2012).

Helminti jsou považováni za výrazné manipulátory hostitelské imunity. Během stamiliónů let koevoluce s hostitelským organismem si vyvinuly řadu důmyslných mechanismů, které odklánějí nebo přesměrovávají imunitní odpověď hostitele, zejména tak, aby zastavili zánětlivé mechanismy vedoucí k jejich přímé likvidaci (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Grecis, 2015; Harnett & Harnett, 2017; Wang et al., 2017; Weinstock & Elliott, 2013; Yasuda & Nakanishi, 2018; Zacccone & Hall, 2013). Tato zjištění vedou k rozvoji nové terapeutické strategie, zvané helminto-terapie, jejíž podstatou je využití kontrolované expozice nepatogenním či mírně patogenním červem (Lukeš et al., 2014; Sobotková et al., under review) s cílem aktivovat protizánětlivé, nebo potlačit prozánětlivé imunitní odpovědi lidského organismu (Harnett & Harnett, 2017; Maizels et al., 2018).

V rámci helminto-terapie je dnes používána zejména kolonizace živými červy (Cheng et al., 2015; Sobotková et al., under review). Vzhledem k určitým nevýhodám, které tento přístup přináší, jsou hledány účinné látky z různých životních stádií helmintů, které mají podobný pozitivní vliv na modulaci imunitního systému a na průběh autoimunitních onemocnění (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Maizels et al., 2018; Nascimento Santos et al., 2017; Shepherd et al., 2015; Smallwood et al., 2017; Wu et al., 2017)

Jedněmi ze základních látek testovaných v rámci terapie helminty jsou jejich exkreční/sekreční produkty (E/S produkty). Bylo prokázáno, že obsahují množství molekul, jako např. bioaktivní proteiny, glykoproteiny, peptidy, glykany, glykolipidy aj., kterými dokáží pozitivně modulovat imunitní systém hostitele (Bieň et al., 2016; Maizels et al., 2018; Nascimento Santos et al., 2017; Shepherd et al., 2015; Wu et al., 2017). Protizánětlivé imunomodulační účinky v rámci helminto-terapie autoimunitních onemocnění byly občas

prokázány taktéž u extraktů z dospělých helmintů a jejich larválních stádií (Maizels et al., 2018; Nascimento Santos et al., 2017; Sulima et al., 2017; Wu et al., 2017).

V rámci této studie byly testovány imunomodulační účinky extraktů z tasemnice *Hymenolepis diminuta*, která splňuje nejen kritéria vhodného terapeutického červa (Lukeš et al., 2014; Sobotková et al., under review), také má příznivý vliv na zánětlivá onemocnění (např. Jirků-Pomajbíková et al., 2018; McKay, 2010; Williamson et al., 2016; Wu et al., 2017). K požadovaným vlastnostem patří jednoduchá kultivace helminta v laboratorních podmínkách, minimální možnost somatické migrace a autoinfekce, nízká patogenita pro hostitele, znalost epidemiologie a biologie helminta (Lukeš et al., 2014; Sobotková et al., under review). Pro účely kultivace *H. diminuta* se v laboratorních podmínkách používají brouci z čeledi potěmnikovití, definitivním hostitelem je potkan, náhodně člověk. Vývoj dospělé tasemnice z larvocysty v těle definitivního hostitele je vázán výhradně na tenké střevo bez jakékoliv somatické migrace (McKay, 2010; Roberts et al., 2013).

Tato studie navazuje na předchozí výzkumy Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. a také na další studie, které prokázaly pozitivní vliv kolonizace *H. diminuta* na zánětlivá střevní onemocnění (např. Jirků-Pomajbíková et al., 2018; McKay, 2010; Parfrey et al., 2017) artritidu (Shi et al., 2011) na neurokognitivní onemocnění způsobená autoimunitním zánětem (Williamson et al., 2016).

Na základě našich předchozích výsledků, kdy jsme sledovali efekt přirozené kolonizace *H. diminuta* (jak larválních stádií, tak dospělce) na střevní zánětlivé onemocnění (Jirků-Pomajbíková et al. 2018), jsme se rozhodli otestovat extrakty z dospělce (HdAE), larválních stádií (HdEL) a E/S produkty (HdES) tasemnice *H. diminuta*. Vliv těchto extraktů byl zjišťován na *in vitro* modelu střevních epitelálních buněk z potkana linie IEC6, jak neovlivněných tak ovlivněných zánětem (tj. ovlivnění s použitím LPS).

Významnou roli v modulaci imunitního systému helminty mají střevní epitelální buňky (Cortés et al., 2017; Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Saenz et al., 2008; Taylor et al., 2009). Tudíž jsme se rozhodli primárně sledovat imunomodulační účinky všech extraktů z *H. diminuta* právě na epitelálních buňkách z přirozeného definitivního hostitele (tj. potkan). Potkan byl vybrán také z důvodu srovnatelnosti této práce s výsledky našich předchozích *in vivo* studií (Jirků-Pomajbíková et al., 2018; Parfrey et al., 2017).

Stanovení vhodného časového intervalu pro vyhodnocení změn stěžejního prozánětlivého cytokinu TNF α

Prvním důležitým krokem bylo analyzovat vývoj genové exprese TNF α u *in vitro* buněčné linie střevních epiteliálních buněk v průběhu času po indukci zánětu. Pro účely tohoto dílčího experimentu byly zvoleny časové intervaly po 4, 8, 12 a 24 hodinách.

TNF α je důležitým prozánětlivým cytokinem, jak v rámci zánětlivých procesů autoimunitních onemocnění střev, tak při LPS indukovaném zánětu (Dave et al., 2015; Nielsen et al., 2013). Výsledky ukázaly, že hladina genové exprese TNF α významně vzrostla čtyři hodiny po ovlivnění epiteliálních buněk pomocí LPS, následně byl zaznamenán postupný pokles (tj. po 8 a 12 hodinách). Po 24 hodinách došlo opět ke vzrůstu genové exprese TNF α , tentokrát nejen u buněk ovlivněných LPS, ale i u buněk neovlivněných (tj. negativní kontrola). Tento prudký nárůst u obou skupin lze vysvětlit omezenou vitalitou a s ní spojenou vysokou úmrtností buněk způsobenou příliš dlouhou kultivací. Ta byla potvrzena i mikroskopicky.

Ve studii Johnston et al. (2010) byla zjišťována hladina TNF α (metodou ELISA) po ovlivnění lidských makrofágů pomocí LPS. Časový interval byl zvolen po 2, 4, 8 a 24 hodinách od indukce zánětu. Bylo zjištěno, že hladina TNF α postupně stoupá a dosahuje svého maxima po osmi hodinách. V případě našich výsledků na epiteliálních buňkách, exprese TNF α po osmi hodinách byla již ve fázi poklesu. Rozdíly mezi výsledky obou studií mohou být vysvětleny použitím odlišných buněčných linií a metod.

Velmi často je genová exprese TNF α u *in vitro* buněčných linií (např. makrofágy, dendritické buňky) měřena po 24 a 48 hodinách od ovlivnění buněk LPS, popřípadě extrakty či produkty z helmintů (Bai et al., 2012; Hiemstra et al., 2014; Hoeksema & Laan, 2016; Zawistowska-Deniziak et al., 2017). Nicméně u epiteliálních buněk tento časový interval je zřejmě pro experimentální účely a hodnocení TNF α nepoužitelný.

Na základě našich výsledků je zjevné, že inkubace potkaních epiteliálních buněk po dobu delší než 24 hodin s LPS není vhodná pro experimentální účely. Tudíž v následujících experimentech jsme se rozhodli zjišťovat hladinu exprese genu pro TNF α čtyři hodiny po ovlivnění buněk extrakty z *H. diminuta* (HdES, HdEA nebo HdEL) a eventuálně LPS. Všeobecně u TNF α dochází k rychlým změnám v jeho genové expresi i zvýšení jeho hladiny v porovnání s ostatními cytokiny (Kapadia et al., 1995). Proto, pro sledování změn v genové expresi dalších cytokinů (IL-17re, IL-33), jsme kromě čtyřhodinového intervalu zvolili také

interval po 12 hodinách od ovlivnění buněk (LPS a extrakty), kdy došlo k zásadnímu poklesu genové exprese TNF α .

Stanovení optimální koncentrace extraktů

Dalším krokem ke splnění hlavního cíle práce bylo najít optimální koncentraci jednotlivých extraktů z *H. diminuta* (HdES, HdEA a HdEL) s protizánětlivým účinkem u *in vitro* modelu epiteliálních buněk. Buňky pro následnou genovou expresi TNF α byly odebírány po čtyřech hodinách od indukce zánětu pomocí LPS.

V literatuře jsou nejčastěji používané koncentrace v rámci testování extraktů *H. diminuta* v rozmezí 5-100 $\mu\text{g/ml}$ (Johnston et al., 2010; Lopes et al., 2015; Reyes et al., 2016b; Zawistowska-Deniziak et al., 2017). U jiných helmintů, např. *Fasciola hepatica*, *Trichuris suis*, *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni*, *Clonorchis sinensis*, *Taenia crassiceps*, jsou využívány koncentrace nižší, tj. v rozpětí 1-80 $\mu\text{g/ml}$ (Bai et al., 2012; Falcón et al., 2010; Hiemstra et al., 2014; Kuijk et al., 2012; Terrazas et al., 2013; Zacccone et al., 2003; Zhao et al., 2018). Na základě výše uvedených poznatků a výsledků naší pilotní studie zaměřené na testování extraktů *in vivo* (publikace v přípravě) byly pro účely této práce vytipovány tři koncentrace extraktů *H. diminuta*, a to 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ a 300 $\mu\text{g/ml}$.

Z výsledků stanovení optimální koncentrace extraktů *H. diminuta* (experiment II) vyplývá, že všechny tři námi vytipované koncentrace HdES mají u IEC6 linie ovlivněné LPS protizánětlivý účinek. V publikaci Johnston et al. (2010) byl pro ovlivnění lidských makrofágů použit extrakt HdES v koncentraci 10, 20, 40, 80 a 100 $\mu\text{g/ml}$ a došlo zde ke statisticky významnému snížení zánětu indukovaného LPS a to nejvíce při použití koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$. Podobný efekt byl pozorován ve studii Zawistowska-Deniziak et al. (2017), kdy byly lidské makrofágy ovlivněny 5 $\mu\text{g/ml}$ HdES. V případě jiných helmintů např. *T. suis*, *F. hepatica* a *T. spiralis* bylo zaznamenáno snížení genové exprese či množství TNF α u myších a lidských dendritických buněk či makrofágů po ovlivnění 1-80 $\mu\text{g/ml}$ E/S produktů (Bai et al., 2012; Falcón et al., 2010; Hiemstra et al., 2014; Hoeksema and Laan, 2016; Kuijk et al., 2012; Laan et al., 2017). S ohledem na *in vitro* buněčný model používaný v naší studii, na základě našich výsledků a poznatků z literatury jsme se v následujících experimentech rozhodli používat HdES o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$.

Pro účely helminto-terapie jsou také testovány extrakty získané z dospělců různých helmintů (Sobotková et al., under review). Obecně rozšířená koncentrace používaná

ke zjišťování imunomodulačních účinků extraktů z dospělců různých helmintů na *in vitro* modelech je 20 až 80 µg/ml (Carranza et al., 2012; Zhao et al., 2018). Konkrétně u extraktu z dospělé *H. diminuta* (HdEA) jsou používány koncentrace v rozmezí 10-100 µg/ml (Johnston et al., 2010; Lopes et al., 2015; Reyes et al., 2016b). Johnston et al. (2010) prokázal protizánětlivý účinek HdEA o koncentraci 100 µg/ml u *in vitro* linie lidských makrofágů. Ve studii Lopes et al. (2015) byl pro ovlivnění potkaních epiteliálních buněk použit HdEA o koncentraci 100 µg/ml, nebyl zde prokázán významný imunomodulační efekt. Na základě výše popsané literatury a s ohledem na naše výsledky, kdy jsme zachytili silný protizánětlivý efekt HdEA při koncentraci 300 µg/ml, jsme se rozhodli tuto používat pro účely dalších experimentů.

Extrakt z larválních stádií *H. diminuta* (HdEL) doposud k testování na *in vitro* buněčných liniích nebyl použit. Ve studii Kuijk et al. (2012) bylo prokázáno snížení produkce TNF α u *in vitro* zánětlivého modelu dendritických buněk. Použit byl extrakt z larválního stádia *T. spiralis* o koncentraci 40 µg/ml. Terrazas et al. (2013) testoval vliv 40 µg/ml E/S produktů larvocyst *T. crassiceps* *in vitro*. Byla zde prokázána modulace myších dendritických buněk k vytvoření Th2 imunitní odpovědi. S ohledem na naše výsledky a odlišný *in vitro* model a druh helminta jsme se přiklonili opět k výběru nejvyšší koncentrace HdEL a to 300 µg/ml.

Analýza imunomodulačních účinků extraktů *H. diminuta* na základě cytokinů TNF α , IL-17re & IL-33

Po vytipování vyhovující koncentrace všech extraktů a určení času vhodného k analýze genové exprese TNF α (po 4 hod), IL-17re a IL-33 (po 4 a 12 hod) proběhlo samotné zjišťování jejich imunomodulačních účinků na *in vitro* modelu se zánětem ovlivněnými buňkami (pomocí LPS). Zároveň jsme sledovali účinek všech extraktů na ničím neovlivněné epiteliální buňky.

Působení E/S produktů na *in vitro* model epiteliálních buněk na základě TNF α

V rámci testování protizánětlivých imunomodulačních účinků helmintů je často sledována aktivita TNF α (Bai et al., 2012; Falcón et al., 2010; Hiemstra et al., 2014; Johnston et al., 2010; Zawistowska-Deniziak et al., 2017). V případě našeho experimentu genová exprese TNF α výrazně klesla u *in vitro* zánětlivého modelu epiteliálních buněk po čtyřech hodinách jejich inkubace s E/S produkty (HdES). Zároveň jsme také sledovali účinky HdES na ničím neovlivněné epiteliální buňky. V tomto případě nedošlo k vytvoření výrazné zánětlivé

imunitní odpovědi, tzn., že bylo zaznamenáno pouze zanedbatelné zvýšení genové exprese TNF α v porovnání s negativní kontrolou (neovlivněné epiteliální buňky). Podobných výsledků dosáhli i autoři studií Johnston et al. (2010) a Zawistowska-Deniziak et al. (2017), kteří prokázali protizánětlivý účinek E/S produktů získaných z *H. diminuta* u *in vitro* zánětlivého modelu lidských makrofágů na základě poklesu genové exprese nebo hladiny TNF α . Obě studie taktéž potvrdily, že pouze HdES nevyvolají u ničím neovlivněných lidských makrofágů výraznou zánětlivou imunitní odpověď.

Podobné imunomodulační účinky byly zaznamenány i u E/S produktů jiných helmintů např. *F. hepatica*, *T. suis*, *S. mansoni*, *T. spiralis* (Bai et al., 2012; Falcón et al., 2010; Hiemstra et al., 2014; Hoeksema and Laan, 2016; Kuijk et al., 2012; Zacccone et al., 2003). Laan et al. (2017) popisuje snížení genové exprese TNF α a protizánětlivé účinky E/S produktů *T. suis* u LPS ovlivněných lidských dendritických buněk. Podobný protizánětlivý efekt E/S produktů *T. suis* byl pozorován u myších střevních epiteliálních buněk (Hiemstra et al., 2014). Také E/S produkty *S. mansoni*, *F. hepatica* a *T. spiralis* snižují LPS vyvolaný zánět u myších dendritických buněk nebo makrofágů (Bai et al., 2012; Falcón et al., 2010; Zacccone et al., 2003).

Ačkoli jsou v literatuře popsány účinky různých helmintů na odlišné *in vitro* modely, výsledky studií korespondují s výsledkem našeho experimentu, tzn., že HdES snižují LPS indukovaný zánět u potkaních epiteliálních buněk, a tak mohou následně aktivovat vývoj systémové protizánětlivé imunitní odpovědi, kterou jsme zaznamenali v naší předchozí studii na potkanech s indukovanou kolitidou a kolonizací *H. diminuta* (Jirků-Pomajbíková et al., 2018).

Působení hrubých extraktů z dospělce na in vitro model epiteliálních buněk na základě TNF α

Kromě účinků E/S produktů z *H. diminuta*, jsme také testovali účinky extraktu z dospělce (HdEA) na potkaní epiteliální buňky a to jak na zánětlivý model, tak ničím neovlivněné buňky. Po čtyřech hodinách inkubace IEC6 s HdEA genová exprese TNF α u buněk ovlivněných zánětem značně převyšovala expresi u pozitivní kontroly (IEC6 ovlivněné LPS). Došlo tedy ke zvýšení zánětlivé imunitní reakce. Pod mikroskopem bylo viditelné velké množství mrtvých buněk. V případě ovlivnění epiteliálních buněk pouze HdEA, bylo zjištěno, že nedochází k zásadnímu zvýšení genové exprese TNF α v porovnání s negativní kontrolou (neovlivněné epiteliální buňky). Samotný hrubý extrakt z dospělce tedy u ničím

neovlivněných epiteliálních buněk nevyvolal výraznou zánětlivou imunitní odpověď. Podobného výsledku dosáhli i autoři ve studii Johnston et al. (2010), kdy samotný extrakt z dospělého u buněčné linie makrofágů nezvýšil zánětlivou reakci. Naopak v případě zánětem ovlivněných makrofágů, HdEA způsobil snížení zánětu po čtyřech hodinách kultivace, tzn., že došlo ke snížení hladiny TNF α v porovnání s pozitivní kontrolou. V případě naší studie byl efekt u potkaních epiteliálních buněk opačný, je tedy pravděpodobné, že extrakt z dospělého *H. diminuta* působí jinak na epiteliální potkaní buňky a jinak na makrofágy. Fakt, že HdEA působí na makrofágy opačným způsobem, než na epiteliální buňky je také podpořen výsledky souběžné studie v naší laboratoři (Řežábková, nepublikovaná data).

Na *in vitro* buněčné linie jsou testovány i hrubé extrakty z dospělců různých helmintů. Například hrubý extrakt *T. suis* má u lidských makrofágů a dendritických buněk ovlivněných LPS protizánětlivé účinky (Hoeksema & Laan, 2016; Kuijk et al., 2012). Imunomodulační protizánětlivý účinek byl popsán i u myších dendritických buněk ovlivněných extrakty z dospělců *C. sinensis* nebo *F. hepatica* (Carranza et al., 2012; Zhao et al., 2018).

Na základě našich výsledků je zjevné, že HdEA u potkaních epiteliálních buněk nevyvolá výraznou zánětlivou imunitní odpověď, stejně tak je tomu i u HdEA ovlivněných lidských makrofágů (Johnston et al., 2010). V literatuře je popsán pokles zánětlivé imunitní odpovědi u *in vitro* zánětlivých modelů po ovlivnění hrubými extrakty z dospělců různých helmintů (Hoeksema & Laan, 2016; Johnston et al., 2010; Kuijk et al., 2012). V naší studii však kombinace LPS a HdEA u potkaních epiteliálních buněk zánětlivou imunitní odpověď razantně zvyšuje na rozdíl od makrofágů (Johnston et al., 2010; Řežábková, nepublikovaná data). Extrakt HdEA je připravován z celé tasemnice a tudíž obsahuje různé látky a molekuly (na rozdíl od HdES), které standardně při přirozené kolonizaci s epiteliálními buňkami střeva hostitele neinteragují. Avšak je evidentní, že HdEA v kombinaci s LPS u IEC6 buněk indukují zvýšení zánětlivé imunitní odezvy a úmrtnost buněk spíše než samotné LPS. K osvětlení příčiny tohoto působení však bude nezbytné provést další testování, případně testovat různé složky extraktu z dospělého *H. diminuta*.

Působení hrubých extraktů z larválních stádií na in vitro model epiteliálních buněk na základě TNF α

Dalším testovaným extraktem byl hrubý extrakt z larvocysty *H. diminuta* (HdEL). Hrubé extrakty z larválních stádií helmintů jsou, v porovnání s hrubým extraktem z dospělého a E/S produkty, testovány velmi zřídka. Nicméně my jsme se rozhodli pro jejich testování na základě

výsledků naší předchozí studie, kdy jsme zaznamenali krátkodobý protizánětlivý efekt u potkanů s kolitidou během prepatentní periody kolonizace *H. diminuta*, tj. v době, kdy jsou ve střevě přítomna larvální stádia (Jirků-Pomajbíková et al., 2018).

Po čtyř hodinové inkubaci epiteliálních potkaních buněk s LPS a HdEL nedošlo ke změně genové exprese TNF α v porovnání s pozitivní kontrolou (IEC6 ovlivněné LPS). Naopak působení HdEL na zánětem ovlivněné buňky vyvolalo velmi významné zvýšení genové exprese TNF α .

Studie zaměřené na vliv extraktů z larvocyst *H. diminuta* na *in vitro* modely doposud nebyly provedeny. Byly testovány extrakty z larválních stádií jiných helmintů. Terrazas et al. (2013) prokázal protizánětlivý účinek při použití produktů z larvocyst *T. crassiceps* u zánětem ovlivněných dendritických buněk z myši. Kontroverzní výsledky byly zaznamenány při použití extraktu z larev *T. spiralis*, kdy u zánětlivého modelu dendritických buněk z myši bylo prokázáno protizánětlivé působení se snížením hladiny TNF α (Kuijk et al. 2012), zatímco u lidských dendritických buněk byl efekt opačný - zvýšení hladiny (Ilic et al., 2011). Z tohoto příkladu je patrné, že lidské a myši buňky na extrakt z larvocyst *T. spiralis* reagují odlišně.

Dle literárních zdrojů a našich výsledků si zvýšení hladiny genové exprese TNF α při použití samotných HdEL nebo v kombinaci s LPS vysvětlujeme přítomností molekul, které u IEC6 buněk mohou stimulovat zánětlivou imunitní odpověď (Sulima et al. 2017). Tyto výsledky víceméně korelují s výsledky naší *in vivo* studie (Jirků-Pomajbíková et al. 2018), kdy po většinu času prepatentní periody u potkanů s experimentálně indukovanou kolitidou nedocházelo ke snižování zánětu v důsledku kolonizace *H. diminuta*. Ke snížení zánětu došlo pouze v jednom časovém bodě, a to šestý den po infekci. V tomto bodě jsme opakovaně detekovali jednorázové zvýšení regulačního cytokinu IL-10, který souvisí s protizánětlivým efektem (Levá, 2017; Parfrey et al., 2017). Tento efekt si zatím nejsme schopni přesně vysvětlit, avšak ve studii Parfrey et al. (2017) byly popsány dvě hypotézy jeho nárůstu a to (i) v okamžiku vylučování některých nezralých *H. diminuta* prostřednictvím Th2 typu imunitní odpovědi; (ii) během přichycování larválních stádií ke stěně střeva. Nicméně HdEL nemá u potkaních epiteliálních buněk evidentní protizánětlivý účinek, proto nebude pro následné experimenty s epiteliálními buňkami dále využíván.

Zhodnocení využití IL-17re pro in vitro experimenty s epiteliálními buňkami

Interleukin IL-17e (označovaný také IL-25) reguluje imunitní reakce epiteliálních buněk a je jimi ve velkém množství produkován při parazitárních infekcích (Saenz et al., 2008; Zhao et al., 2015). U zvířecích modelů, nejčastěji myších, bylo prokázáno zvýšení produkce IL-17e epiteliálními buňkami při infekci různými druhy helmintů např. *Echinostoma caproni*, *T. spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, (Angkasekwinai et al., 2013; Cortés et al., 2017; Finlay et al., 2014; Zhao et al., 2015). V mnoha studiích byl zjišťován účinek IL-17e na vývoj Th2 imunitní odpovědi a bylo zjištěno, že skrze své receptory na imunitních buňkách a přirozených lymfoidních buňkách typu 2 (ILC2) indukuje vznik protizánětlivé Th2 imunitní odpovědi (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman, 2018; Owyang et al., 2006; Maizels et al., 2018; Saadoun et al., 2011; Zhao et al., 2015). Protože nebyla komerčně dostupná TaqMan fluorescenční sonda pro IL-17e, zvolili jsme tedy analýzu genové exprese řetězce e (IL-17re) pro receptor interleukinu IL-17e.

Z našich výsledků je patrné, že genová exprese IL-17re dosahovala maxima po čtyřech i dvanácti hodinách u negativní kontroly, tj. u neovlivněných epiteliálních buněk. U buněk ovlivněných všemi extrakty z *H. diminuta*, popřípadě LPS, došlo k poklesu genové exprese. Tento efekt si vysvětlujeme pravděpodobnou reakcí epiteliálních buněk na přítomnost extraktů či LPS, při které došlo k inhibici genové exprese IL-17re. Lopes et al. (2015) testoval vliv části dospělce *H. diminuta* (skolex + strobila) na myši, potkaní i lidské epiteliální buňky. U potkaních epiteliálních buněk nebylo prokázáno zvýšení genové exprese IL-17e, zatímco u myších a lidských ke zvýšení jeho exprese došlo.

V jednom případě ze tří opakování experimentů (experiment IIIa, Obr. 10 A) zaměřeného na genovou expresi IL-17re po čtyřech hodinách odběru buněk, byl zaznamenán nárůst jeho exprese oproti negativní (epiteliální buňky) i pozitivní kontrole (zánětem ovlivněné buňky), a to ve všech experimentálních skupinách ovlivněných pouze extrakty (HdES, HdEA, HdEL) a zároveň i u buněk ovlivněných zánětem a HdES nebo HdEA. Výsledky třech nezávislých opakování tedy nejsou homogenní, nelze proto v tuto chvíli s jistotou říci, který výsledek je správný. Proto v navazujících experimentech bude potřeba znovu ověřit genovou expresi IL-17re. Pro detailnější analýzu proběhne ověření následně také při zkrácené inkubaci epiteliálních buněk ovlivněných extrakty z *H. diminuta*, v případě zánětlivého modelu také LPS.

Zhodnocení využití IL-33 pro in vitro experimenty s epiteliálními buňkami

Epiteliální buňky jsou jedním z důležitých zdrojů IL-33, zvláště při kolonizacích helminty. Tento interleukin indukuje vývoj protizánětlivé imunitní odpovědi a s ní související produkci Th2 typu cytokinů (Cortés et al., 2017; Liew et al., 2016; Saenz et al., 2008). Jeho působení také snižuje vývoj Th1 a Th17 imunitních procesů (Finlay, Walsh, and Mills 2014; Kazuyo et al. 2010; Lefrançais et al. 2011; Liew, Girard, and Turnquist 2016).

V obou případech sledování genové exprese IL-33, tzn. po čtyřech a dvanácti hodinách od začátku inkubace, byla maximální hladina jeho genové exprese u negativních kontrol (pouze epiteliální buňky), Obr. 11 a 12B, viz kapitoly 4.3.1 a 4.3.2, oproti většině ostatních skupin, a taktéž pozitivní kontrole. Tento efekt je pravděpodobně logický vzhledem k tomu, že IL-33 je epiteliálními buňkami konstitutivně exprimován a působí nejen jako extracelulární ligand, ale také jako intracelulární transkripční represor (Hodzic et al., 2017).

Z našich výsledků je zřejmé, že LPS indukovaný zánět, stejně tak jako všechny extrakty *H. diminuta* inkubované s epiteliálními buňkami 12 hod, a HdES a HdEL (inkubované 4 hod) mohou genovou expresi IL-33 snižovat. Překvapivým výsledkem bylo zvýšení exprese IL-33 po čtyřech hodinách inkubace v případě experimentální skupiny buněk ovlivněných pouze HdEA v porovnání s negativní kontrolou (neovlivněné epiteliální buňky). Je velmi pravděpodobné, že dospělec *H. diminuta* (tedy nějaká jeho složka) je schopná zvýšit genovou expresi IL-33 na rozdíl od HdES a HdEL. Podobný výsledek popisuje i studie Lopes et al. (2015), kde zaznamenali u *in vitro* myších střevních epiteliálních buněk zvýšení IL-33 po kontaktu s částí *H. diminuta* (skolex, strobila). Pokud byly části *H. diminuta* od buněčné linie odděleny filtrem o velikosti pórů 3 µm, ke zvýšení genové exprese IL-33 nedošlo. Zvýšení hladiny IL-33 bylo pozorováno také *in vivo* u myších modelů po infekci *F. hepatica*, *Trichuris muris*, *E. caproni*, *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni* (Finlay et al., 2015; Humphreys et al., 2019; Kalenda et al., 2015; Muñoz-Antoli et al., 2016; Yu et al., 2015).

HdEA byl v případě této práce připraven z celého dospělce *H. diminuta* včetně skolexu a strobil, na základě literatury a našich výsledků se tedy můžeme domnívat, že k indukci IL-33 dochází při kontaktu skolexu *H. diminuta* se střevní sliznicí.

Na základě námi zjištěných dat a informací z odborné literatury je zřejmé, že nejsilnější protizánětlivý účinek u potkaních epiteliálních buněk ovlivněných LPS mají

HdES. Předpokládáme také, že významnou roli v imunomodulaci má i HdEA a to na základě zvýšení genové exprese IL-33 při jeho působení na epiteliální buňky. Přímý kontakt helminta s organismem hostitele se zdá být velmi důležitý pro následnou modulaci jeho imunitního systému. Avšak hledání účinných látek pocházejících z různých stádií helmintů je nyní nezbytné pro zmapování imunologických interakcí helminta a jeho hostitele.

6 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo otestovat imunomodulační účinky extraktů z dospělé (HdEA), larválních stádií (HdEL) a exkrečních/sekrečních produktů (HdES) tasemnice *Hymenolepis diminuta* na *in vitro* modelu střevních epitelálních buněk z potkana. Imunomodulační účinek extraktů byl ve všech provedených experimentech analyzován na základě genové exprese TNF α , IL-17re a IL-33.

Prvním důležitým krokem ke splnění hlavního cíle této práce bylo zvolit časové body nejvhodnější pro analýzu účinků extraktů z *H. diminuta*. V případě TNF α by zvolen časový interval čtyři hodiny, v případě IL-17re a IL-33 byly zvoleny dva nejvhodnější intervaly, a to čtyři a 12 hodin od ovlivnění buněk lipopolysacharidy a extrakty.

Dalším krokem bylo zvolit optimální koncentraci jednotlivých extraktů z *H. diminuta* s protizánětlivým účinkem. Nejsilnější protizánětlivý účinek HdES byl zaznamenán při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$, v případě HdEA a HdEL při koncentraci 300 $\mu\text{g/ml}$.

Optimální podmínky zvolené během předchozích experimentů byly následně použity při samotném testování imunomodulačních účinků extraktů z *H. diminuta* na potkaní epitelální buňky. U buněk ovlivněných pouze HdES a HdEA (bez LPS) nebyl zaznamenán razantní vývoj zánětu, tento byl však pozorován v případě použití HdEL.

Na zánětlivém modelu epitelálních buněk byl pak prokázán významný protizánětlivý účinek analyzovaný na základě změn genové exprese TNF α a to při použití HdES. HdEL tento efekt neměl a HdEA naopak zánět zvyšoval.

Gen pro protizánětlivý cytokin IL-33 byl, dle očekávání, nejvíce exprimovaný v neovlivněných buňkách. LPS indukovaný zánět genovou expresí u buněk naopak snižoval. Výrazné zvýšení genové exprese IL-33 po použití HdEA na zánětlivém modelu (s LPS) pak ukazuje na silný imunomodulační účinek tohoto extraktu.

V případě HdEL nebyl zaznamenán žádný pozitivní vliv na modulaci imunitní odpovědi epitelálních buněk.

7 Seznam použitých zkratk

| | |
|------------------|--|
| B2M | beta-2-mikroglobulin |
| BSA | bovine serum albumin; hovězí sérový albumin |
| CD4+ T lymfocyty | lymfocyty mající na svém povrchu CD4 glykoprotein |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid; komplementární deoxyribonukleová kyselina |
| CO ₂ | oxid uhličitý |
| DNBS | dinitrobenzensulfonovou kyselinou experimentálně vyvolaný zánět |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle médium |
| DSS | dextranem sodným experimentálně vyvolaný zánět |
| EDTA | ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt dihydrate; disodná sůl kyseliny ethylenamintetraoctové |
| E/S | exkreční a/nebo sekreční produkty různých životních stádií parazitů |
| FCA | Freund's complete adjuvans; Freundovo kompletní adjuvans |
| FBS | fetal bovine serum; fetální hovězí sérum |
| HDCs | <i>Hymenolepis diminuta</i> cystirecroids; larvocysty <i>H. diminuta</i> |
| HdES | exkreční/sekreční produkty tasemnice <i>Hymenolepis diminuta</i> |
| HdEA | extrakty z dospělce tasemnice <i>Hymenolepis diminuta</i> |
| HdEL | extrakty z larvocyst tasemnice <i>Hymenolepis diminuta</i> |
| IEC6 | střevní epitelální buněčná linie z potkana |
| IL-4 | interleukin 4 |
| IL-5 | interleukin 5 |
| IL-9 | interleukin 9 |
| IL-13 | interleukin 13 |
| IL-17e | interleukin 17e |

| | |
|--------------|---|
| IL-17re | řetězec e pro receptor interleukinu 17e |
| IL-25 | interleukin 25 |
| IL-33 | interleukin 33 |
| ILC2 | innate lymphoid cells 2; přirozené lymfoidní buňky typu 2 |
| k/BxN | arthritogenic serum; sérum vyvolávající experimentální artritidu |
| kDa | kilodalton |
| LPS | lipopolysaccharide; lipopolysacharidy |
| PBS | phosphate buffered saline; fosfátový fyziologický roztok o pH 7,4 |
| PCR | polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce |
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| RNA | ribonucleic acid; ribonukleová kyselina |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute 1640 médium |
| TNF α | tumor necrosis factor α |
| TSO | <i>Trichuris suis</i> ova; vajíčka <i>T. suis</i> |
| TTO | <i>Trichuris trichiura</i> ova; vajíčka <i>T. trichiura</i> |

8 Seznam použité literatury

Agmon-Levin, N., Lian, Z., Shoenfeld, Y. (2011). Explosion of autoimmune diseases and the mosaic of old and novel factors. *Cellular and Molecular Immunology*, 8, 189–192.

Andreassen, J., Bennet-Jenkins, E. M., Bryant, C. (1999). Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*, 42, 223–275.

Angkasekwinai, P., Srimanote, P., Wang, Y., Pootong, A., Sakolvaree, Y., Pattanapanyasat, K., Chaicumpa, W., Chaiyaroj, S., Dong, C. (2013). Interleukin-25 (IL-25) promotes efficient protective immunity against *Trichinella spiralis* infection by enhancing the antigen-specific IL-9. *Infection and Immunity*, 81, 3731–3741.

Bager, P., Kapel, C., Roepstorff, A., Thamsborg, S., Arnved, J., Rønborg, S., Kristensen, K., Poulsen, L. K., Wohlfahrt, J., Melbye, M. (2011). Symptoms after ingestion of pig whipworm *Trichuris suis* eggs in a randomized placebo-controlled double- blind clinical trial. *PloS One*, 6, 1–11.

Bai, X., Wu, X., Wang, X., Guan, Z., Gao, F., Yu, J., Yu, L., Tang, B., Liu, X., Song, X., Wang, X., Radu, B., Boireau, P., Wang, F., 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.

Benzel, F., Erdur, H., Kohler, S., Frentsch, M., Thiel, A., Harms, L., Wandinger, P. K., Rosche, B. (2012). Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Helminthology*, 86, 339–347.

Bień, J., Sałamatın, R., Sulima, A., Savijoki, K., Conn, D. B., Näreaho, A., & Młocicki, D. (2016). Mass spectrometry analysis of the excretory-secretory (E-S) products of the model cestode *Hymenolepis diminuta* reveals their immunogenic properties and the presence of new E-S proteins in cestodes. *De Gruyter*, 61, 429–442.

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.

- Broadhurst, M. J., Ardeshir, A., Kanwar, B., Mirpuri, J., Gundra, U. M., Leung, J. M., Wiens, K. E., Vujkovic-Cvijin, I., Kim, C. C., Yarovinsky, F., Lerche, N. W., McCune, J. M., Loke, P. (2012). Therapeutic helminth infection of macaques with idiopathic chronic diarrhea alters the inflammatory signature and mucosal microbiota of the colon. *PloS Pathogens*, 8, 1–12.
- Broadhurst, M. J., Leung, J. M., Kashyap, V., Mccune, J. M., Mahadevan, U., Mckerrow, J. H., & Loke, P. (2010). IL-22 + CD4 + T cells are associated with therapeutic *Trichuris trichiura* infection in an ulcerative colitis patient. *Science Translation Medicine*, 2, 1–11.
- Carranza, F., Nunez, C. R. F. N., Knubel, C., Correa, S. G., Bianco, I., Maccioni, M., Fretes, R., Triquell, M. F., Motra'n, C. C., Cervi, L. (2012). Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells. *PLoS One*, 7, 1-10.
- Cheng, A. M., Jaint, D., Thomas, S., Wilson, J. K., & 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.
- Correale, J., & Farez, M. (2007). Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 61, 97–108.
- Correale, J., & Farez, M. F. (2011). The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 233, 6–11.
- Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J. G., & Toledo, R. (2017). Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. *Trends in Parasitology*, 33, 678–693.
- Croese, J., Gaze, S. T., & Loukas, A. (2013). Changed gluten immunity in celiac disease by *Necator americanus* provides new insights into autoimmunity. *International Journal for Parasitology*, 43, 275–282.
- Croese, J., O'Neil, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W., Pithard, D., Speare, R. (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*, 55, 136–167.

- Dave, M., Papadakis, K. A., Faubion, W. A., & Clinic, M. (2015). Immunology of inflammatory bowel disease and molecular targets for biologics. *Gastroenterology Clinics of North America*, *43*, 405–424.
- Daveson, A. J., Jones, D. M., Gaze, S., McSorley, H., Clouston, A., Cooke, S., Speare, R., MacDonald, G. A., Anderson, R., McCarthy, J. S., Loukas, A., Croese, J. (2011). Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease – a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS ONE*, *6*, 1-9.
- 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*, 1–15.
- 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.
- Evans, H., & Mitre, E. (2015). Worms as therapeutic agents for allergy and asthma : Understanding why benefits in animal studies have not translated into clinical success. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*, 343–353.
- Falcón, C., Carranza, F., Martínez, F. F., Knubel, C. P., Masih, D. T., Motrán, C. C., Cervi, L. (2010). Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *137*, 36–46.
- Feary, J. R., Venn, A. J., Mortimer, K., Brown, A. P., Hooi, D., Falcone, F. H., Pithard, D. I., Britton, J. R. (2009). Experimental hookworm infection : a randomized placebo-controlled trial in asthma experimental allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, *40*, 299–306.
- Finlay, C. M., Stefanska, A., Boon, L., Bioceros, B. V, & Lavelle, E. C. (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.
- Finlay, C. M., Walsh, K. P., & Mills, K. H. G. (2014). Induction of regulatory cells by helminth parasites : exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological Reviews*, *259*, 206–230.

- Gabalec, M. L. (2009a). Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní Medicína, 11*, 16–20.
- Gabalec, M. L. (2009b). Ulcerózní kolitida – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní Medicína, 11*, 276–281.
- Gaze, S., McSorley, H. J., Daveson, J., Jones, D., Bethony, J. M., Oliviera, L. M., Speare, R., McCarthy, J. S., Engwerda, C. R., Croese, J., Loukas, A. (2012). Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PloS Pathogens, 8*, 1-11.
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research, 7*, 1–12.
- Graepel, R., Leung, G., Wang, A., Villemaire, M., Jirik, F. R., Sharkey, K. A., McDougall, J. J., McKay, D. M. (2013). Murine autoimmune arthritis is exaggerated by infection with the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *International Journal for Parasitology, 43*, 593–601.
- Grencis, R. K. (2015). Immunity to helminths : resistance , regulation , and susceptibility to gastrointestinal Nematodes. *Review in Advance, 9*, 1–25.
- Harnett, M. M., & Harnett, W. (2017). Can parasitic worms cure the modern world's ills ? *Trends in Parasitology, 33*, 694–705.
- 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.
- Helmby, H. (2009). Parasitology international 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.
- Hiemstra, I. H., Klaver, E. J., Vrijland, K., Kringel, H., Andreasen, A., Bouma, G., Kraal, G., van Die, I., den Haan, J. M. M. (2014). Excreted / secreted *Trichuris suis* products reduce barrier function and suppress inflammatory cytokine production of intestinal epithelial cells. *Molecular Immunology, 60*, 1–7.

- Hodzic, Z., Schill, E. M., Bolock, A. M., Good, M. (2017). IL-33 and the intestine: the good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*, *100*, 1–10.
- Hoeksema, M. A., & Laan, L. C. (2016). Treatment with *Trichuris suis* soluble products during monocyte-to-macrophage differentiation reduces inflammatory responses through epigenetic remodeling. *The FASEB Journal*, *5*, 1–11.
- Humphreys, N. E., Xu, D., Hepworth, M. R., Liew, Y., Grecis. (2019). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal Nematodes. *The Journal of Immunology*, *180*, 2443–2449.
- 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.
- Hunter, M. M., Wang, A., & Mckay, D. M. (2007). Helminth infection enhances disease in a murine TH2 model of colitis. *Gastroenterology*, *132*, 1320–1330.
- Hunter, M. M., Wang, A., Parhar, K. S., Johnston, M. J. G., van Rooijen, N., Beck, P. L., Mckay, D. M. (2010). In Vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*, *138*, 1395–1405.
- Ilic, N., Worthington, J. J., & Travis, M. A. (2011). *Trichinella spiralis* antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3 + T cells in vitro. *Parasite Immunology*, *18*, 572–582.
- Jirků-Pomajbíková, K., Jirků, M., Levá, J., Morien, E., & Parfrey, L. W. (2018). The benign helminth *Hymenolepis diminuta* ameliorates chemically induced colitis in a rat model system. *Parasitology*, 1–12.
- Johnston, M. JL., Wang, A., Catarino, M. E. D., Phan, V. C. G., Ball, L., 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.
- Kahl, J., Brattig, N., & Liebau, E. (2018). The untapped pharmacopeic potential of helminths. *Trends in Parasitology*, *34*, 828-842.
- 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.

- Kalenda, Y., Masuda, K., Sayed, E., Nakamura, R., Kato, K., Uematsu, S., Akira, S., Hamano, S. (2015). Role of interleukin-33 during *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology*, *194*, 1–14.
- Kapadia, S., Lee, J., Torre-Amione, G., Birdsall, H. H., Ma, T. S., Mann, D. L. (1995). Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *Journal of Clinical Investigation*, *96*, 1042–1052.
- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology*, *28*, 573–621.
- Kazuyo, M., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S. (2010). Innate production of TH2 cytokines by adipose. *Nature*, *463*, 540–544.
- Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., Pol, S. M. A. Van Der, Heijnen, P., Bruijns, S. C. M., Kringelb, H., Pinellic, E., Kraala, G., de Vriese, H. E., Dijkstra, C. D., Bouma, G., van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology*, *51*, 210–218.
- Laan, L. C., Williams, A. R., Stavenhagen, K., Giera, M., Kooij, G., Vlasakov, I., Kalay, H., Kringel, H., Nejsun, P., Thamsborg, S. M., Wuhrer, M., Dijkstra, C. D., Cummings, R. D., van Die, I. (2017). The whipworm (*Trichuris suis*) secretes prostaglandin E2 to suppress proinflammatory properties in human dendritic cells. *The FASEB Journal*, *31*, 719–731.
- Lefrançois, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J., Cayrol, C. (2011). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 1673–1678.
- Lerner, A., Jeremias, P., & Matthias, T. (2015). The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *International Journal of Celiac Disease*, *3*, 151–155.
- Levá, J. (2017). Sledování změn genové exprese interleukinu 10 u potkana jako modelového organismu v průběhu infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta*. Bakalářská Práce (Bc.). Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Katedra Parazitologie, 24. 5. 2017.
- Liew, F. Y., Girard, J., Turnquist, H. R. (2016). Interleukin - 33 in health and disease. *Nature Publishing Group*, *16*, 676–689.

- 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-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in Parasitology*, *30*, 377–385.
- Maeda, M., Watanabe, N., Neda, H., Yamauchi, N., Okamoto, T., Sasaki, H., Tsuji, I., Akiyama, Tsuji, T., Niitsu, Y. (1992). Serum tumor necrosis factor in inflammatory bowel diseases. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *14*, 451–461.
- Maizels, R. M., Smits, H. H., McSorley, H. J. (2018). Review modulation of host immunity by helminths : the expanding repertoire of parasite effector molecules. *Immunity*, *49*, 801–818.
- Matisz, C. E., Leung, G., Reyes, J. L., Wang, A., Sharkey, K. A., McKay, D. M. (2015). Adoptive transfer of helminth antigen-pulsed dendritic cells protects against the development of experimental colitis in mice. *European Journal of Immunology*, *45*, 3126–3139.
- McKay, D. M. (2010). The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, *137*, 385–394.
- McSorley, H. J., Gaze, S., Daveson, J., Jones, D., Anderson, R. P., Ruysers, N. E., Speare, R., McCarthy, J. S., Engwerda, C. R., Croese, J., Loukas, A. (2011). Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. *PLoS One*, *6*, 3–9.
- McSorley, H. J., Hewitson, J. P., Maizels, R. M. (2013). Immunomodulation by helminth parasites : Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, *43*, 301–310.
- McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth Infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*, 585–608.
- Melon, A., Wang, A., Phan, V., McKay, D. M. (2010). Infection with *Hymenolepis diminuta* is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-7.

- Molodecky, N. A., Soon, I. N. G. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Berkema, H. W., Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *142*, 46–54.
- Muñoz-Antoli, C., Cortés, A., Santano, R., Sotillo, J., Esteban, J. G. (2016). Interleukin-25 induces resistance against intestinal Trematodes. *Scientific Reports*, *6*, 1–12.
- Murch, S. H., Lamkin, V. A., Savage, M., & Macdonald, T. T. (1991). Serum concentrations of tumour necrosis factor in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, *32*, 913–917.
- 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.
- Nielsen, Ole, H., Ainsworth, M. A. (2013). Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, *369*, 754–762.
- Nkouawa, A., Haukisalmi, V., Li, T., Nakao, M., & Lavikainen, A. (2015). Cryptic diversity in hymenolepidid tapeworms infecting humans. *Parasitology International*, *65*, 83–86.
- Ordás, I., Mould, D. R., Feagan, B. G., & Sandborn, W. J. (2009). Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *91*, 635–646.
- Owyang, A. M., Zaph C., Wilson, E. H., Guild, K. J., McClanahan, T., Miller, H. R. P., Cua F. J., Goldschmidt, M., Hunter, C. A., Kastelein, R. A., Artis, D. (2006). Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*, 843–849.
- Parfrey, L. W., Jirků, M., Šíma, R., Jalovecká, M., Sak, B., Grigore, K., Pomajbíková, K. J. (2017). A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system. *PloS One*, *12*, 1–22.
- Parker, W. (2014). The “ hygiene hypothesis ” for allergic disease is a misnomer. *The BMJ*, *349*, 10–11.
- 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., Perkins, S. E., Harker, M., Muehlenbein, M. P. (2012). Review article A prescription for clinical immunology : the pills are available and ready for testing . *Current Medical Research and Opinion*, 28, 1193–1202.
- 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.
- Reardon, C., Sanchez, A. N. A., Hogaboam, McKay, D. M., Weinstock, J. V. (2001). Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Infection and Immunity*, 69, 4417–4423.
- Reyes, J. L., Fernando, M. R., Lopes, F., Leung, G., Mancini, N. L., Matisz, C. E., Wang, A., McKay, D. M. (2016)a. IL-22 restrains tapeworm-mediated protection against experimental colitis via regulation of IL-25 expression. *PloS One*, 12, 1–27.
- 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)b. 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.
- Reyes, J. L., Wang, A., Fernando, M. R., Leung, G., Rooijen, N. Van, McKay, D. M. (2015). Splenic B cells from *Hymenolepis diminuta* – infected mice ameliorate colitis independent of T cells and via cooperation with macrophages. *The Journal of Immunology*, 194, 364–378.
- Řežábková, L., Brabec, J., Jirků, M., Dellebra, M., Kuchta, R., Modrý, D., Parker, W., Jirků Pomajbíková, K. (under review). Genetic diversity of the potentially therapeutic cestode *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology International*.
- Roberts L. S., Janovy J. & Nadler S. (2013). Foundations of Parasitology, 9th ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, 670. pp.
- Rook, G. A. (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42, 5–15.
- Saadoun, D., Terrier, B., & Cacoub, P. (2011). Interleukin-25: key regulator of inflammatory and autoimmune diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3781–3785.

- Saenz, S. A., Taylor, B. C., & Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunology Review*, 226, 172–190.
- Sandborn, W. J., Elliott, D. E., Weinstock, J., Summers, R. W., Silver, N., Harnett, M. D. (2013). Alimentary pharmacology and therapeutics randomised clinical trial : the safety and tolerability of *Trichuris suis* ova in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 38, 255–263.
- Sharief, S., Jariwala, S., Kumar, J., & Muntner, P. (2012). Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: Results from NHANES 2005–2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 1195–1202.
- 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.
- 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.
- Shi, M., Wang, A., Prescott, D., Waterhouse, C. C. M., Zhang, S., McDougall, J. J., Sharkey, K. A., McKay, D. M. (2011). Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant - induced monoarthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 63, 434–444.
- Siniscalco, D., & Antonucci, N. (2013). Possible use of *Trichuris suis* ova in autism spectrum disorders therapy. *Medical Hypotheses*, 81, 1–4.
- 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., Id, S. K., Haley, C., Zhang, M., Holzknicht, 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*, 98, 1–20.
- Sobotková, K., Parker, W., Levá, J., Růžková, J., Lukeš, J., & Jirků Pomajbíková, K. (under review). Knowns and unknowns of helminth therapy, from the parasite perspective. *Trends in Parasitology*.

- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299, 1259–1260.
- Sulima, A., Bie, J., Savijoki, K., Näreaho, A., Conn, D. B., Daniel, M. (2017). Identification of immunogenic proteins of the cysticercoid of *Hymenolepis diminuta*. *Parasites & Vectors*, 10, 1–12.
- Sulima, A., Savijoki, K., Bien, J., Näreaho, A., Salamatin, R., Conn, D. B., Mlocicky, D. (2018). Comparative proteomic analysis of *Hymenolepis diminuta* cysticercoid and adult stages. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–14.
- 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). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54, 87–90.
- Taylor, B. C., Zaph, C., Troy, A. E., Du, Y., Guild, K. J., Comeau, M. R., Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 655–667.
- Terrazas, C. A., Alcántara-hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I., Satoskar, A. R. (2013). Helminth-excreted / secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *The FASEB Journal*, 27, 4547–4560.
- Turton, J. A. (1976). IgE, parasites, and allergy. *Lancet*, 2, 686-686.
- 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, A., Fernando, M., Leung, G., Phan, V., Smyth, D., McKay, D. M. (2010). Exacerbation of oxazolone colitis by infection with the helminth *Hymenolepis diminuta* involvement of IL-5 and eosinophils. *The American Journal of Pathology*, 177, 2850–2859.

- Wang, M., Wu, L., Weng, R., & Zheng, W. (2017). Therapeutic potential of helminths in autoimmune diseases: helminth-derived immune-regulators and immune balance. *Parasitology Research*, *116*, 2065–2074.
- 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: Joel V. Weinstock explains why several clinical trials are deliberately infecting people with helminths to treat autoimmune diseases. *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.
- Williamson, L. L., Mckenney, E. A., Holzknecht, 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.
- Wiria, A. E., Djuardi, Y., Supali, T., Sartono, E., & Yazdanbakhsh, M. (2012). Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: A friend or foe? *Seminars in Immunopathology*, *34*, 889–901.
- Wu, Z., Wang, L., Tang, Y., & Sun, X. (2017). Parasite-derived proteins for the treatment of allergies and autoimmune diseases. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–13.
- Yasuda, K., & Nakanishi, K. (2018). Host responses to intestinal nematodes. *International Immunology*, *30*, 93-102.
- Yu, Y., Deng, W., Lei, J. (2015). Interleukin-33 promotes Th2 immune responses in infected mice with *Schistosoma japonicum*. *Parasitology Research*, *114*, 2911-2918.
- Zaccane, 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.
- Zawistowska-Deniziak, A., Basałaj, K., Strojny, B., Młocicki, D., Stefan, W. (2017). New data on human macrophages polarization by *Hymenolepis diminuta* tapeworm-an *in vitro* study. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–15.
- Zhao, A., Urban, J. F., Sun, R., Stiltz, J., Morimoto, M., Notari, L., Madden, K. B., Yang, Z., Grinchuk, V., Ramalingam, T. R., Wynn, T. A., Shea-Donohue, T. (2015). Critical role of IL-25 in Nematode infection-induced alterations in intestinal function. *The Journal of Immunology*, 185, 6921–6929
- Zhao, L., Shi, M., Zhou, L., Sun, H., Zhang, X., He, L., Tang, Z., Wang, C., Wu, Y., Chen, T., Shang, M., Zhou, X., Lin, Z., Li, X., Yu, X., Huang, Y. (2018). *Clonorchis sinensis* adult-derived proteins elicit Th2 immune responses by regulating dendritic cells via mannose receptor. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 12, 1-20.