

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Produkce antioxidačních enzymů v rámci
hostitelsko/parazitického systému se zaměřením
na modelový organismus tasemnice krysí
(*Hymenolepis diminuta*)**

Diplomová práce

Autor: Ivana Bečvářová

Obor: Zájmové chovy zvířat

Vedoucí práce: Ing. Zuzana Čadková, Ph.D., DiS.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Produkce antioxidantních enzymů v rámci hostitelsko/parazitického systému se zaměřením na modelový organismus tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.04.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zuzaně Čadkové, Ph.D., DiS. za odborné vedení mé diplomové práce, pomoc při zpracování dat a za mnoho cenných rad v průběhu výzkumu.

Produkce antioxidantních enzymů v rámci hostitelsko/parazitického systému se zaměřením na modelový organismus tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá parazito-hostitelskou interakcí. Parazité gastrointestinálního traktu mohou způsobovat dlouhodobé infekce. Kvůli této skutečnosti si parazité vytvořili složitý systém obrany proti působení imunitních mechanismů hostitele. Savčí organismus napadený parazity začne vytvářet imunitní odpověď. Tu zprostředkovávají leukocyty. Jedním z hlavních leukocytů jsou eozinofily, které produkují reaktivní formy kyslíku (ROS). Hlavním antioxidantním enzymem parazitů je superoxid dismutáza a na tento enzym jsme se v naší studii zaměřili. Do naší studie jsme zařadili i vliv olova na produkci superoxid dismutázy.

Cílem diplomové práce byla detekce a stanovení aktivity vybraného antioxidantního enzymu – superoxid dismutázy (SOD) produkovaného tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) v *in vitro* kultivačních podmínkách.

Pro náš pokus byl vybrán často používaný modelový druh tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Finálním hostitelem byl zvolen Potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*) kmen Wistar a mezhospitem Potemník moučný (*Tenebrio molitor*). Analýza byla provedena na 14 vzorcích. Ověřovali jsme dvě hypotézy. První hypotéza byla vliv kultivační metody, kdy byli použity *in vitro* epiteliální buňky střeva IEC-4 a IEC-6 a kultivační medium. V Petriho miskách bylo připraveno samotné kultivační medium nebo epitelové buňky. Do poloviny studovaných vzorků byl přidán kontaminant v podobě dusičnanu olovnatého o koncentraci 19,5 mgPb/ml. Do takto připravených Petriho misek byli následně vloženy celé tasemnice.

Z výsledku studie vyplývá, že nejvyšší hodnot bylo dosaženo dle předpokladů při kultivaci *H. diminuta* za přítomnosti buněk a xenobiotik (olova). Ovšem průkazně se aktivita SOD lišila jen mezi vzorky, které obsahoval epiteliální buňky s celou tasemnicí a přidaným Pb a medium s celou tasemnicí a Pb. U zbylých vzorků nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kultivačními podmínkami. Druhá hypotéza se týkala množství vyprodukované superoxid dismutázy v předem určených částech tasemnice. Pokus byl koncipován stejně jen s rozdílem, že do media nebo na buňky jsme umístili předem určené části tasemnice. Jednalo se o kraniální nebo kaudální část parazita.

Nejproduktivnější byla neočekávaně kaudální část parazita s xenobiotiky (Pb) kultivovaná v médiu bez buněk. Prokazatelně se aktivita SOD lišila jen mezi variantami medium s kraniální částí parazita a mediu s kaudální částí parazita. U zbylých vzorků byla potvrzena nulová hypotéza nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kaudální a kraniální částí.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že není signifikantní rozdíl mezi námi stanovenými kultivačními médii. Stejného výsledku jsme dosáhli i při množství vyprodukované superoxid dismutázy, kdy nebyl potvrzen signifikantní rozdíl mezi přední a zadní částí parazita.

Klíčová slova: SOD, S/E produkty, IEC-4 a IEC-6 buňky, *H. diminuta*

Antioxidant enzymes in host/parasite system – case study of model organism rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*)

Summary

This thesis addresses the interaction between a parasite and a host. Parasites of gastrointestinal tract could be the cause of long-term infection. Due to this fact, the parasites have developed a complex system of defense against the action of the host's immune mechanisms. A mammalian organism infested with parasites begins to prepare an immune response. This is mediated by leukocytes. One of the major leukocytes is eosinophils, which produces reactive oxygen species (ROS). The main antioxidant enzyme of the parasites is superoxide dismutase. In our research we focused on this enzyme and we included effect of lead on superoxide dismutase production.

The aim of the diploma thesis was to detect and determine the activity of a selected antioxidant enzyme - superoxide dismutase (SOD) produced by a rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) in in vitro culture conditions.

The frequently used regime species of the tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) was chosen for our experiment. The final host was the laboratory rat (*Rattus norvegicus*) of the Wistar strain and the intermediate host was the mealworm (*Tenebrio molitor*). The analysis was performed on 14 samples. We tested two hypotheses. The first hypothesis was influenced by culture methods using in vitro gut epithelial cells IEC-4 and IEC-6 and culture medium. Culture medium or epithelial cells were prepared to be performed in petri dishes. A contaminant in the form of lead nitrate at a concentration of 19.5 mgPb / ml was added to a half of the studied samples. The entire tapeworms were placed in the Petri dishes afterwards.

The result of the study shows that the highest values were obtained as expected in the culture of *H. diminuta* in the presence of cells and xenobiotics (lead). However, the SOD activity was found to differ only between samples that contained the whole tapeworm and the epithelial cells with added Pb; and medium with the whole tapeworm and Pb. No significant difference was found between the culture conditions in the remaining samples.

The second hypothesis concerned the amount of dismutase seuphoxides produced in predetermined parts of the tapeworm. The experiment was created in the same way with the only difference - we placed a predetermined part of the tapeworm in the media or onto the cells. It was a cranial or caudal part of the parasite. The most productive was the unexpectedly caudal part of the parasite with xenobiotics (Pb) cultured in cell-free medium. Demonstrably, SOD activity differed only between variants of the medium with the cranial part of the parasite and the medium with the caudal part of the parasite. In the remaining samples the null hypothesis was confirmed and no significant difference was found between the caudal and cranial parts.

The results of this diploma thesis show, that there is no significant difference between our culture medium. We achieved the same result regarding the production of superoxide dismutase, no significant difference between the anterior and posterior part of the parasite was confirmed.

Keywords: SOD, S / E products, IEC-4 and IEC-6 cells, *H. diminuta*

Obsah

1 Úvod.....	11
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	12
3 Literární rešerše	13
3.1 Volné radikály	13
3.2 Antioxidanty	13
3.2.1 Supeoxid dismutáza	14
3.2.2 Glutation transferáza, glutacion peroxidáza a katalasa	14
3.3 Charakteristika tasemnic	15
3.3.1 Morfologie a fyziologie	15
3.3.2 <i>Hymenolepis diminuta</i> (Rudolphi 1819).....	15
3.3.3 Životní cyklus	16
3.3.4 Hymenopidoza.....	17
3.4 Hostitelsko-parazitická interakce	18
3.4.1 Antioxidační enzymy produkované parazitem	18
3.5 Vylučované enzymy u dalších druhů parazitů	19
3.6 Xenobiotika.....	20
3.6.1 Olovo	20
3.6.2 Působení olova na živý organismus.....	20
3.6.3 Parazit a olovo.....	21
3.7 Metody kultivace parazitů.....	21
4 Materiál a metodika.....	23
4.1 Materiál.....	23
4.2 Metodika	23
4.2.1 Biologický materiál.....	23
4.2.2 Izolace tasemnice <i>Hymenolepis diminuta</i>	24
4.2.3 Stanovení produkce SOD na buněčné linii	24
4.3 Statistické vyhodnocení dat.....	26
5 Výsledky	27
5.1 Vliv kultivačních podmínek na aktivitu SOD.....	27
5.2 Aktivita SOD produkovaná v různých částech tasemnice	28
6 Diskuze	30
6.1 Superoxid dismutáza.....	30
6.1.1 Produkce SOD závislá na kultivačním mediu	30
6.1.2 Produkce SOD různými částmi tasemnice.....	31
7 Závěr.....	33

8	Literatura.....	34
----------	------------------------	-----------

.

1 Úvod

Hostitelsko-parazitický vztah se v posledních letech dostává do popředí zájmů. Většina druhů tasemnic vytváří dlouhodobé infekce (Skrzycki et al. 2011). Mechanismus, kterým se parazité dokážou bránit působení hostitelských leukocytů, vyvolal zájem mezi akademiky. Jedním z obranných mechanismů hostitele je produkce volných radikálů, které mohou být odvozeny od kyslíku (Vajragupta et al. 2004). Hostitelské leukocyty, především eozinofily, produkují značné množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Mají za úkol odstranit parazita ze střeva hostitel. Leukocyty obsahují enzymy, které jsou schopné produkovat ROS pro boj s infekčními agens. Jedním z enzymů NADPH-oxidáza fagocytů, která katalyzuje přeměnu O_2 v reaktivní formu kyslíku. Takto přeměněný O_2 je již schopný napadat infekční agens (Chiumiento & Bruschi 2009). Ovšem parazité si vyvinuli účinné obranné mechanismy, mezi které patří také antioxidační enzymy. Mezi hlavní parazitické antioxidační enzymy patří například superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza. Úkolem antioxidačních enzymů je neutralizace a odvod ROS (Dzik 2006).

Superoxid dismutáza vytváří první linii obrany před poškozením kyslíkovými radikály (Younus 2018). Podílí se na odstranění nadbytečného superoxidového radikálu. Deaktivace radikálu je velmi důležitá, zejména kvůli jeho možné redukci na velmi reaktivní hydroxylový radikál (Racek & Holeček 1999). Produkované enzymy chrání parazita. Zabraňují přímé interakci mezi ROS a tegumentem parazita, tím se eliminuje produkce lipidových peroxidů, které by jinak produkovaly cytotoxické karbonyly. Karbonyly jsou molekuly napadající buněčnou strukturu parazita a mají za následek jeho smrt (Chiumiento & Bruschi 2009).

Do diplomové práce jsme také zařadili vliv kontaminantu. Těžké kovy mají prokazatelně tendenci k akumulaci v živých organismech (Alrikaby et al. 2020). V organismu má Pb tendence ke katalyzaci oxidačních reakcí. Následně začne generovat reaktivní formy kyslíku (Chiumiento & Bruschi 2009).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem diplomové práce je detekce a stanovení aktivity vybraného antioxidantního enzymu – superoxiddismutázy (SOD) produkovaného tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) v *in vitro* kultivačních podmínkách.

Vědecká hypotéza

Produkce a aktivita antioxidantního enzymu SOD u *H. diminuta* je závislá na způsobu kultivace parazita a konkrétní části strobily.

H01: Aktivita SOD produkovaných *H. diminuta* v různých kultivačních podmínkách se průkazně neliší.

H02: Aktivita SOD produkovaných v různých částech strobily *H. diminuta* se průkazně neliší.

3 Literární rešerše

3.1 Volné radikály

Volné radikály lze definovat jako molekuly nebo molekulární fragmenty, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů v atomových nebo molekulárních orbitalech (Halliwell & Gutteridge, 1999; Chiumiento & Bruschi 2009). Nepárový elektron, který obsahují volné radikály, jim dodává značnou míru reaktivity. Je schopný vázat se na jiné radikály nebo odebrat elektron z okolních molekul, a tím dokončí původní párování elektronu. Molekuly, kterým chybí elektron, se stávají nestabilními a hledají další elektron, takže se samy změny na volné radikály a spustí domino efekt nestability. Mechanismus je nezvratným způsobem zodpovědný za poškození buněčných struktur (Chiumiento & Bruschi 2009). U živočichů jsou volné radikály často dovozeny od molekul kyslíku, dusíku nebo síry. Volné radikály tohoto typu jsou součástí skupin molekul nazývaných reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) a reaktivní formy síry (RSS) (Vajragupta et al. 2004). Jednou z hlavních tříd radikálů jsou radikály odvozené od kyslíku (Miller et al. 1990). Produkované reaktivní formy kyslíku jsou především superoxidový aniont, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a singletový kyslík (Vajragupta et al. 2004; Assady et al. 2011). Všechny buňky v těle jsou chronicky vystavené působení oxidantu z exogenních a endogenních zdrojů, ale buňky jsou vybaveny účinným antioxidačním systémem (Mayne 2003). Organismus, který si vybudoval obranné mechanismy, dokáže efektivně volné radikály zhašet. Jedná se především o antioxidační enzymy (Fridovich 1995).

Mitochondrie jsou za fyziologických podmínek hlavním zdrojem vzniku kyslíkových radikálů (Fridovich 1995). Dalším významným zdrojem ROS jsou buňky imunitního systému. Především se jedná o složku nespecifické imunity. Imunitní buňky obsahují enzymy, které dokážou transformovat O_2 na superoxid pomocí například NADPH-oxidázy. Reaktivní formy kyslíku poté buňka využije pro boj s infekčními agens. Tento proces je také známý jako respirační vzplanutí (Chiumiento & Bruschi 2009).

3.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou sloučeniny, které se účinně podílejí na odvádění volných radikálů a na potlačení reaktivních forem kyslíku. Bariery vytvořené antioxidanty jsou široce rozšířeny, a zahrnují tak enzymatické i neenzymatické systémy. Mezi nejdůležitější enzymatické antioxidanty jsou řazeny superoxid dismutáza (SOD), glutationperoxidáza (GPx), a kataláza (CAT). Pro úplnost zmíníme i neenzymatické faktory, které mohou fungovat jako antioxidanty. Jedná se o redukovaný glutation, vitamín C, vitamín E, β -karoten, celuroplastin a bilirubin (Assady et al. 2011).

Antioxidanty neutralizují volné radikály tím, že přijmou nebo předají elektron, aby došlo k eliminaci nepárového stavu radikálu. Antioxidanty mohou tedy přímo reagovat s volnými radikály a eliminovat je za vzniku nových volných radikálů. Ty jsou již méně reaktivní než radikály, které neutralizovali (Lü et al. 2010). Mnoho antioxidantů může přímo reagovat s ROS nebo indukovanými meziprodukty (ROS) a ukončit tak řetězovou reakci, a tím zastavit poškození vyvolané ROS (DeFeudis et al. 2003). Reaktivní formy kyslíku mají také užitečné

buněčné funkce například redoxní signalizace. Funkce antioxidantních systémů tedy nespočívá v úplném odstranění oxidantů, ale udržování jejich optimální úrovně (Rhee 2006).

3.2.1 Supeoxid dismutáza

Superoxid dismutáza (SOD) je jedním z nevýznamnějších antioxidantních enzymů (Matosková et al. 2014; Younus 2018). Jedná se o skupinu metaloenzymů a nachází se u všech živých organismů. SOD tvoří první linii obrany před poškozením způsobenými ROS (Younus 2018). Podílí se na odstranění nadbytečného superoxidového radikálu. Deaktivace radikálu je velmi důležitá, zejména kvůli jeho možné redukci na reaktivní hydroxylový radikál (Racek & Holeček 1999). Nachází se v cytosolu, mitochondriích a také v extracelulárním prostředí (Chiumiento & Bruschi 2009).

Formy SOD

V savčích buňkách existují 3 typy superoxid dismutázy. Označují se SOD1, SOD2 a SOD3. Hlavní rozdíly plynou z lokalizace enzymu a obsahu stopových prvků. SOD1 je lokalizován v cytoplasmě, SOD2 v mitochondriích a SOD3 se nachází v extracelulárním prostoru. Superoxid dismutáza 2 obsahuje ionty manganu a SOD1 a SOD3 obsahuje měď a zinek (Fridovich 1995).

Obdobné formy superoxid dismutázy vykazují i všechny eukaryotické organismy (Henkle-Dührsen & Kampkötter 2001).

Mechanismus působení SOD

SOD katalyzuje přeměnu superoxidu na volný kyslík a peroxid vodíku, který může být dále rozkládán katalázou. Superoxidový aniont má redukční i oxidační vlastnosti. Při procesu dismutace jedna jeho molekula poskytne elektron druhé, takže se superoxid zároveň redukuje i oxiduje. Výsledkem je kyslík a peroxid vodíku, který je méně reaktivní sloučeninou než superoxid.

Chemická rovnice: $2\text{O}_2^{\ominus} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Matošková et al. 2014)

Superoxid dismutáza může mít i prooxidační účinek, protože disociace O_2^{\ominus} produkuje H_2O_2 a ten je pro buňky toxický. Kvůli odstranění nebezpečného peroxidu vodíku je nezbytná přítomnost dalších antioxidantních systémů, jako jsou enzymy CAT a GPx (Nordmann & Ribière 1991).

3.2.2 Glutation transferáza, glutation peroxidáza a katalasa

Dalším významným enzymem je katalasa která, degraduje peroxid vodíku vzniklý pomocí SOD na vodu a kyslík. Enzym je indukován jen při vysokém množství peroxidu vodíku (Chiumiento & Bruschi 2009). Glutation (GSH) je za běžných podmínek lokalizován v jádře, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. GSH se můžeme také nalézt v kovalentní vazbě s proteiny, kde regulují jejich funkce, nebo působí jako koenzym při antioxidantních procesech. Dalším významným působením je vylučování volných radikálů a tvorba substrátu pro GPx a GST (Pompella et al. 2003).

Všechny formy glutathion transferázy (GST) mají za funkci metabolizace produktů pocházejících z oxidativního stresu, detoxikace xenobiotických látek (Hayes et al. 2005).

Funkce glutation peroxidázy je redukce toxických organických peroxidů, které jsou produkovány během peroxidace lipidů. Produkty peroxidace lipidů jsou pro buňku velmi toxické (Pastore et al. 2003).

3.3 Charakteristika tasemnic

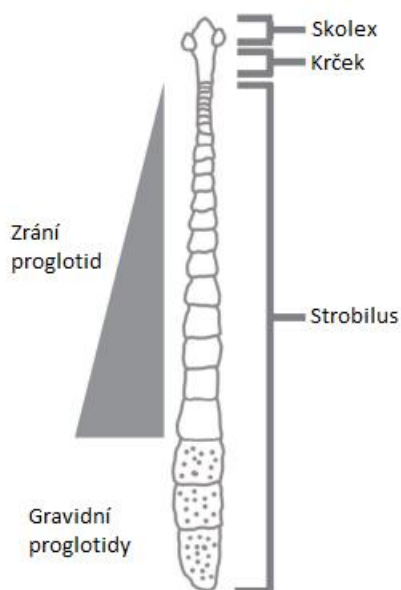
Všechny prozatím nám známé druhy tasemnic parazitují u všech skupin obratlovců a až na výjimky mají tasemnice více hostitelský cyklus. Pohlavně dospělí parazité jsou lokalizováni v různých oddílech trávicího traktu obratlovců. U Tasemnic je možné anatomicky určit tři hlavní části těla: skolex, krček a segmentovaná strobila. Skolex neboli „hlavička“ je místem, kde jsou lokalizované přichytné orgány. U tasemnic se jedná o různé druhy kruhových přísavek, botrii nebo rostelum s háčky. Podporu přichycení tasemnice v trávicím traktu mohou podporovat také výměšky skolexových žláz nebo mikrotrichy (Castro 1996).

3.3.1 Morfologie a fyziologie

Třídě Cestoda obecně chybí zažívací trakt, kvůli této skutečnosti musí přijímat veškeré živiny přes tegument. Jedná se o rozhraní mezi vnějším prostředím a tasemnicí. Tegumentem musí procházet veškeré rozpuštěné látky z vnějšího prostředí, ale také zajišťuje odvod odpadních produktů. Jedná se o přenos iontů a plynů (Threadgold & Robinson 1984; Pappas 2000). Povrch tasemnic je krytý značným počtem mikrotrich, které jsou patrné pod elektronovým mikroskopem. Existují zřetelné rozdíly ve tvaru, velikosti a hustotě mikrotrich v různých fázích životního cyklu, mezi druhy tasemnic nebo i regionální výkyvy. Mikrotrichy jsou morfologicky podobné samčím mikrotrichům, je zde tedy předpoklad, že mají i stejný účel, a to zvětšit povrch pro příjem živin (Threadgold & Robinson 1984).

3.3.2 *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi 1819)

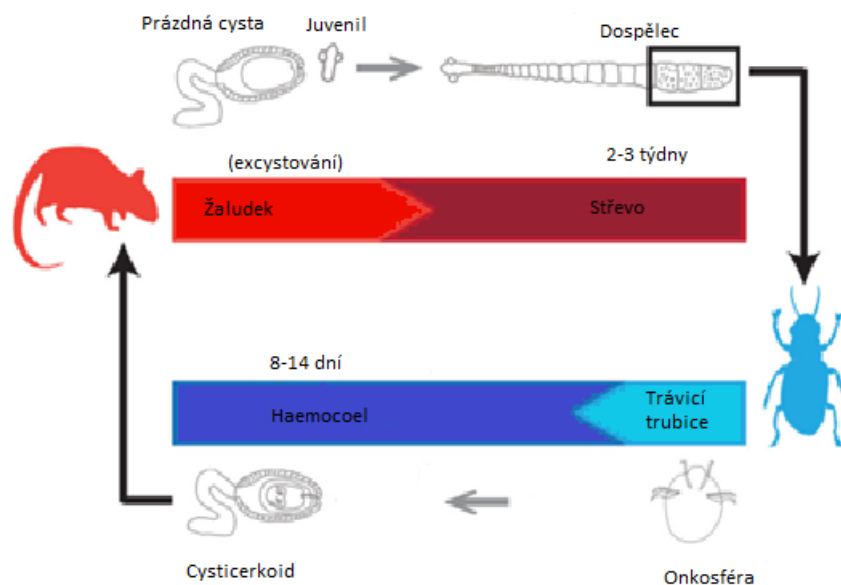
Hymenolepis diminta je kosmopolitně rozšířený druh (Tena et al. 1998). Dospělý jedinec dosahuje délky od 10 až po 60 cm a šířky 3-5 mm. Na skolexu se nachází čtyři přísavky kruhovitěho tvaru. Mezi přísavkami je centrálně lokalizované rostelum bez háček (Tanowitz et al. 2001). Na skolex přímo nasedá krček, který slouží jako růstová zóna tasemnice. Strobila tedy vzniká postupným růstem krčku (Bolla & Roberts 1971). Strobila je tvořena stovkami a tisíci segmentů, které se nazývají proglotidy. Kvůli postupnému růstu od krčku můžeme říct, že čím jsou proglotidy starší, tím dále budou od růstové zóny. Proglotidy jsou zároveň místem uložení rozmnožovacích orgánů obou pohlaví. Nezralé segmenty obsahují základy pro pohlavní orgány. Postupným růstem dochází k dozrání článků a jejich oplození. V dorzální části tasemnice se nachází proglotidy s rozšířenou dělohou, aby mohla pojmout oplozená embrya. Ostatní reprodukční orgány postupně degenerují (Rozario & Newmark 2015).



Obrázek 1. Popis těla tasemnice *Hymenolepis diminuta* (Rozario & Newmark 2015)

3.3.3 Životní cyklus

H. diminuta potřebuje ke svému vývoji mezihostitele, kterými jsou v přirozeném prostředí různé druhy hmyzu. V laboratorních podmínkách se nejhojněji využívá rod *Tenebrio* a *Tribolium* (Shostak 2014) Finálním hostitelem *Hymenolepis diminuta* jsou různé druhy hlodavců. Vývoj tasemnice ve finálním hostiteli má typický průběh. Jakmile jsou proglotidy oplozené a zralé, dochází k odškrcení gravidní části, která posléze odchází se stolicí (Rozario & Newmark 2015). Onkosféry, které opouštějí tělo finálního hostitele, musí být pozřeny vhodným mezihostitelem. Ve střevě hmyzu se onkosféra vylíhne a přechází do hemocoelu, kde rychle dospívá v cysticerkoid (Hurd et al. 2001). Infekční cysticerkoidy mohou v těle hmyzu zůstat po celý život infikovaného jedince. Po pozření finálním hostitelem se cysticerkoid dostane do žaludku, kde proběhne excitace do juvenilní tasemnice. Čerstvě vylíhlé tasemnice mají skolex a krátké tělo bez strobili (Rothma 1959). Juvenilní jedinec se usazuje v tenkém střevě pomocí přísavek, kde zůstává do reprodukční dospělosti. Tasemnice dosahuje sexuální dospělosti za 2-3 týdny a zůstává reprodukčně aktivní po celý život hostitele (Rozario & Newmark 2015).



Obrázek 2. Schéma vývojového cyklu *Hymenolepis diminuta* (Rozario & Newmark 2015).

3.3.4 Hymenopidoza

Infekce parazitem *Hymenolepis diminuta* je u finálních hostitelů převážně považována za bez příznakovou (McKay et al. 1990; Kapczuk et al. 2018). Ovšem vyvolává řadu změn v tenkém střevě například vyšším počet pohárkových buněk (McKay et al. 1990). Parazit je považován ze neinvazivního kvůli již výše zmíněné absenci rostrálních háčků, kterými by mohl narušovat povrch střeva hostitele. Ale může svými metabolity ovlivňovat běžné fungování trávicího traktu např. vyšší sekrece slin, inhibice sekreční aktivity žaludku a také zvýšená aktivita trypsinu v duodenu (Fal & Czaplicka 1991).

Při chronické fázi nákazy dochází v místě napadení ke snížení střevních kluků a na některých místech úplnému vymizení. Byl zaznamenán také zánětlivý otok tenkého střeva a zvýšená lymfatická aktivita (Fal & Czaplicka 1991; Goswami et al. 2011). Zánětlivá reakce tenkého střeva vede k oxidačnímu stresu u finálního hostitele (Shin et al. 2009).

Jedním z hlavních leukocytů hostitelské obrany jsou eozinofily, které se nacházejí ve tkáních sliznic obratlovců (Wynn et al. 2004). Způsobují vylučování reaktivních forem kyslíku. Interakce mezi parazitem a hostitelem také záleží na imunitní odpovědi hostitele. V některých případech dochází k nepřiměřené reakci hostitele na parazita, která postupně vede k degradaci jeho vlastních tkání (Hadas & Derda 2014) Infekce způsobená parazitem aktivuje v hostiteli specifickou i nespecifickou imunitní odpověď. Specifická část imunitního systému zahrnuje humorální i buněčnou složku (Shin et al. 2009).

3.4 Hostitelsko-parazitická interakce

Parazit, jakým je např. *H. diminuta*, způsobuje hostiteli dlouhodobé infekce. Existuje několik možných mechanismů, kterým dokáže parazit přežít v hostiteli po značně dlouhou dobu. Jedním z nich jsou jejich antioxidační enzymy, které mohou sloužit jako obranné mechanismy proti hostitelským kyslíkovým radikálům (Skrzycki et al. 2011). Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkovány hostitelským organismem a zprostředkovávají interakci mezi parazitem a hostitelem (Dzik 2006). Parazitární infekce může v hostiteli vyvolat imunitní odpověď aktivací eozinofilů, bazofilů, makrofágů, neutrofilů, uvolnění cytokynu a produkci protilátek IgE. Výše zmíněné leukocyty obsahují enzymy, které produkují ROS pro boj s infekčními agens. Jedním z enzymů NADPH-oxidáza fagocytů, která katalyzuje přeměnu O₂ v reaktivní formu kyslíku. Takto přeměněný O₂ je již schopný napadat infekční agens (Chiumiento & Bruschi 2009). Volné radikály mohou zapříčinit vyloučení parazita také nepřímo, poškozením buněk střeva, a tím způsobí změnu vnitřního prostředí (Niwa & Miyazato 1996).

Ačkoliv je infekce *Hymenolepis diminuta* obvykle vnímána jako bez příznaková, vyvolává řadu změn ve střevě hostitele. Experimentálně se podařilo zjistit, že hymenolepióza je doprovázená zvýšeným LPO (produkty peroxidace lipidů) změny aktivity antioxidačních enzymů a změna hladiny GSH (glutathion) v gastrointestinálním traktu. Existuje tedy předpoklad snížení účinnosti ochrany střev před oxidačním stresem vyvolaným přítomností parazita. Nerovnováha mezi oxidačním a antioxidačními procesy může hrát hlavní roli v patologii způsobené parazitózou například změna transportu iontů v epitelu nebo morfologické změny gastrointestinálního traktu potkanů (Kosik-Bogacka et al. 2011).

3.4.1 Antioxidační enzymy produkované parazitem

Vylučování antioxidačních enzymů chrání parazita před reaktivními formami kyslíku vznikajícími z hostitelských fagocytů, které jsou stimulované infekcí (Dzik 2006). Gastrointestinální parazité jsou citliví na oxidativní stres, protože dospělá stádia se vyskytují v prostředí chudém na kyslík (Olson et al. 2001).

Tasemnice se vyvinuly podobně jako jiní ploší červi z volně žijících organismů (Olson et al. 2001). Cestoda a převážná většina parazitů produkuje superoxid dismutázu, jedná se o typický znak fakultativních anaerobů (Docampo 1995).

Parazité nejběžněji vylučují superoxid dismutázu, glutathion peroxidázu a katalázu (Dzik 2006). Produkce enzymů zabraňuje přímé interakci mezi ROS a povrchem parazita, tím se zamezí produkci lipidových peroxidů, které by jinak produkovaly cytotoxické karbonyly. Jedná se o molekuly napadající buněčnou strukturu parazita, které mají za následek jeho smrt (Chiumiento & Bruschi 2009).

Podle Skrzycki et al. (2011) je enzymaticky nejproduktivnější přední část tasemnice. Kraniální část tasemnice je nevíce vystavena působení obranných mechanismů hostitele, kvůli přímému kontaktu skolexu se střevem hostitele. Mediální část tasemnice již není tak enzymaticky aktivní. Důvodem nižší aktivity je pravděpodobně vzdálenost tasemnice od místa styku se střevní stěnou, například aktivita SOD je zde až dvakrát nižší než u skolexu. Kaudální část tasemnice je enzymaticky aktivnější než mediální úsek, ovšem nepřevyšuje produkci přední úsek tasemnice (Skrzycki et al. 2011).

Superoxid dismutáza (SOD) katalizuje jak již bylo v práci zmíněno, dismutaci superoxidových radikálů na peroxid vodíku a kyslík. Enzymatická aktivita SOD je u *H. diminuta* značně vysoká (Skrzycki et al. 2011). Nejvyšší naměřená hodnota byla u nezralých proglotidů (Czczot et al. 2013).

Kataláza (CAT) katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na molekulární kyslík a vodu. CAT je umístěná v peroxisomech a v cytosolu (Henkle-Dührsen & Kampkötter 2001). Aktivita katalázy je u *Hymenolepis diminuta* velmi nízká. Při pokusném měření byla na hranici detekce, a to ve všech částech tasemnice (Skrzycki et al. 2011). Nejnížší zaznamenané koncentrace byli lokalizovány u hermafroditických proglotidů a gravidní dělohy (Czczot et al. 2013). Některé parazitické druhy postrádají katalázu úplně (Henkle-Dührsen & Kampkötter 2001).

Glutation peroxidáza je enzym, který katalyzuje redukcí peroxidu vodíku a alkyl hydroxiperoxidy oxidací glutationu (GSH) (Henkle-Dührsen & Kampkötter 2001). Produkce antioxidantních enzymů se může měnit v průběhu života parazita (Skrzycki et al. 2011).

3.5 Vylučované enzymy u dalších druhů parazitů

Parazitě, kteří se vyznačují vysokou antioxidantní aktivitou mohou v hostiteli způsobovat dlouhodobé infekce. Každý druh parazita vylučuje jiné množství antioxidantních enzymů (Smith & Bryant 1989).

V obecném měřítku jsou helminté dobře vybaveni různými druhy antioxidantních enzymů (Czczot et al. 2012). Skupiny parazitů se od sebe liší množstvím vyprodukovaných enzymů, například motolice *Fasciola hepatica* a *Schistosoma mansoni*. Oba druhy produkují dvě formy SOD, cytosolické a extracelulární. Také produkují glutation transferázu a peroxiredoxin, ale pro dospělá stadia *Schistosoma mansoni* je charakteristická nízká produkce glutation peroxidázy (Mkoji et al. 1988).

V obecném měřítku produkují hlístice nejvíce superoxid dismutázu, katalázu, glutation peroxidázu a transferázu (Czczot et al. 2012). Ve studii Smith & Bryant (1989) byli hodnoceny dva druhy parazitický střevních hlístů. Dospělí jedinci *Nippostrongylus brasiliensis* byli vyloučeni ze střeva hostitele do 10-12 dnů po infekci. Zatím co *Nematospiroides dubius* (*Heligmosomoides polygyrus bakeri*) přetrvali v trávicím taktu hostitele několik měsíců. Výsledek studie prokázal že *N. dubius* produkuje dvojnásobné množství SOD a až čtyřnásobné množství katalázy a glutationreduktázy než *N. brasiliensis* (Smith & Bryant 1989). Pro svalovce (*Trichinella*) je nejvýznamnější enzymem superoxid dismutáza, dalším významným enzymem je glutation transferázu (Czczot et al. 2012).

Produkce enzymů je také ovlivněna stupněm vývoje parazita v hostiteli, od larválních stádií po dospělé. Každý vývojový stupeň má jinou enzymatickou aktivitu. Při stádiu invaze je převážně sledována vyšší produkce enzymů (Dzik 2006).

3.6 Xenobiotika

Xenobiotika jsou definována jako látky bez fyziologické hodnoty nebo látky toxické. Pro parazitické organismy zahrnují xenobiotika sekundární rostlinné metabolity z potravy hostitele, složky imunitní odpovědi hostitele nebo látky znečišťující životní prostředí (Precious & Barrett 1989). Zvířata metabolizují xenobiotika ve dvou fázích. První fáze zavádí hydrolytické, redukční a oxidační reakce do organické molekuly pomocí reaktivních skupin -OH, -SH, CO₂H, -NH₂. Druhá fáze spočívá ve spojení produktů z reakcí první fáze s nízkomolekulárními sloučeninami např. glutation, sacharidy, aminokyseliny (Patrick 2006).

H. diminuta jsou schopné v první fázi hydrolytických a redukčních reakcí. Ale jako i u jiných helmintů, chybí i *H. diminuta* oxidační detoxikace (Munir & Barrett 1985).

3.6.1 Olovo

Olovo je jedním z řady běžných kontaminantů životního prostředí (Ercal et al. 2001). Vzhledem k jeho biologicky nerozložitelné povaze a nepřetržitému používání v průmyslu se jeho koncentrace hromadí v životním prostředí se zvyšujícími se riziky. Ve vyspělých zemích je používání olova do jisté míry kontrolováno, ale v rozvojových zemích se olovo požívá stále ve vysoké míře (Wani et al. 2015). Jedná se o látku, která je v prostředí velmi perzistentní. Stejně jako ostatní, v prostředí stálé kontaminanty např. rtuť, arsen nebo kadmium i olovo způsobuje poškození buněk a jejich nukleových kyselin (Ercal et al. 2001). Olovo je vysoce jedovatý kov, který působí téměř na každý orgán v těle (Wani et al. 2015).

3.6.2 Působení olova na živý organismus

Vnik olova do organismu probíhá nejčastěji vdechnutím nebo přes gastrointestinální trakt (GIT). U inhalovaného olova je vstřebáno do krve 30-40 % z celkového vdechnutého objemu xenobiotik (Pb) (Phillip & Gerson 1994). Při vstřebávání Pb v GIT není efekt tak zřejmý, záleží na výživném stavu a věku jedince. Zhoršenou absorpci olova ve střevě může podporovat dostatek železa (Ziegler et al. 1978). Také zvýšený příjem vápníku u potkanů vedl ke snížené absorpci olova ve střevě (Bogden et al. 1992).

Toxicita olova vede k poškození tkání volnými radikály dvěma samostatnými, ale spolu navzájem souvisejícími cestami. První je tvorba ROS (singletový kyslík, hydroperoxydy, peroxid vodíku atd.), a druhá cesta spočívá v přímém vyčerpání antioxidantních rezerv. Mechanismus působení toxických kovů na organismus tedy spočívá v produkci volných radikálů a snížené dostupnosti antioxidantních enzymatických rezerv (Ercal et al. 2001; Vaziri et al. 2001; Patrick 2006).

Glutation je molekula na bázi cysteinu, kterou produkují lymfocyty. Působí jako důležitý antioxidant. Konjugací glutationu v játrech je odpovědný za detoxikaci určitých léčiv a toxinů (Meister & Anderson 1983).

Některé antioxidanty např. vitamín C, B₆, E a metionin, selen nebo zinek snižují poškození buněk způsobené reaktivními formami kyslíku (Patrick 2006). U lidí bylo prokázáno, že olovo způsobuje zvýšení, ale i snížení hladin antioxidantních enzymů superoxid dismutázy, katalázy, glutation peroxidázy v krvi. Výsledkem studie bylo, že při nižších úrovních expozice olovem docházelo k nárůstu produkce antioxidantních enzymů. Při vysoké expozici Pb

v některých případech docházelo ke snížené expozici enzymů (Han et al. 2005). Studie byla ovšem provedena u lidí, kteří nebyli napadeni parazity a jedná se tedy o případný vliv na finálního hostitele.

3.6.3 Parazité a olovo

Nedávné studie poukázaly na schopnost *H. diminuta* bioakumulovat toxické prvky např. olovo. U pokusných zvířat byla zjištěna vyšší koncentrace Pb v parazitech než ve tkáních hostitele (Sures & Siddall 1999; Sures et al. 2002; Jankovská 2009). Místem absorpce Pb při perorálním požití je tenké střevo. Stejnou lokalizaci mají i parazité *H. diminuta*, je tady možná interakce parazita s Pb v duodenu. Lokalizace ve stejném místě může způsobit rozdílnou akumulaci Pb v orgánech hostitele (Čadková et al. 2014).

Olovo je v těle hostitele schopno z GIT procházet epiteliální membránou paracelulární difúzí a vstupovat do krevního řečiště. V krevním řečišti se váže na membránu erytrocytů a je transportováno oběhovým systémem do různých orgánů v těle. Ionty olova jsou předávány z GIT a portálním oběhem se dostávají do jater. Zde je většina Pb odstraněna z krve a je vylučována do střeva žlučí. Se steroidy obsaženými ve žluči tvoří s ionty těžkých kovů organokovové komplexy, které odcházejí žlučovodem do tenkého střeva (Sures & Siddall 1999). Olovo vázané na žluč může být následně absorbováno tasemnicemi. Tasemnice dokáže absorbovat olovo vázané na žluč pomocí svého tegumentu. Povrch tasemnic (tegument) je ekvivalentní k povrchu střevní sliznice obratlovců (Starling 1975). Další možnou cestou je zpětné vstřebání sliznicí nebo vyloučení se stolicí hostitele. Žluč může mít významnou roli v akumulaci a absorpci olova u parazitů (Sures et al. 1998).

Olovo je jedním z nejčastěji se vyskytujících těžkých kovů a může mít vliv na orgánové soustavy, především na nervový, vylučovací a oběhový systém (ATSDR 2007). Těžké kovy mají tendenci k akumulaci v živých organismech (Alrikaby et al. 2020).

Při pokusu ověřujícím akumulaci olova v hostiteli byli naměřeny vysoké koncentrace akumulovaného xenobiotika (Pb) po perorálním podání kontaminantu, kdy byla většina použité dávky detekována v kostech a ledvinách. Jednalo se ovšem o pokusná zvířata, která nebyla vystavena nákaze helminty. Pokusná zvířata, která již byla experimentálně napadena helminty, vykazovala při nízkých dávkách olova odlišná místa s nejvyšší akumulací. Vysoké koncentrace byly naměřeny ve svalech a stěně střeva (Čadková et al. 2014). Dle některých studií mají střevní parazité schopnost zabránit vstřebávání toxických látek střevní sliznicí (Jankovská et al. 2012) Studie Čadková et al. (2014) toto tvrzení neprokázala a samotná přítomnost parazita nezabránila Pb kumulaci v hostitelském organismu.

3.7 Metody kultivace parazitů

Techniky kultivace parazitů tvoří podstatnou část moderního studia parazitů. Kultivace *in vitro* a *in vivo* umožňuje dynamicky studovat jejich fyziologii, chování a metabolismus, také je možné monitorovat a analyzovat povahu antigenních molekul ve vylučovacích a sekrečních pochodech. Kultivace parazita (*in vitro*) je složitý proces a je důležité mít značný přehled v možných mikrobiologických kulturách. Různí parazité totiž vyžadují různé kultivační podmínky například živiny nebo teplota (Ahmed 2014).

Hymenolepis diminuta je v experimentální parazitologii jeden z nejčastěji používaných druhů (Sulima et al. 2018). Ve srovnání s jinými druhy tasemnic je *H. diminuta* poměrně snadno

kultivovatelná v laboratorních hlodavcích a může být vhodná pro studie založené na moderních molekulárních technikách (Rozario & Newmark 2015). Výhody použití tasemnice krysí jako modelového druhu v laboratorních testech patří nízká patogenita pro finálního hostitele a chybějící autoinfekce (McKay 2010).

Ke kultivaci parazitů lze použít tři typy kultivačních medií. Xenická kultura se používá při primárním růstu parazita. Jedná se o kulturu obsahující neznámou mikrobiotou například vzorky stolice. Další kulturou je monoxenická. Parazité jsou v tomto případě kultivováni s jednou známou bakterií. Tuto metodu lze použít pro primární růst ale také jako přechodnou fázi. Třetí používaným typem je axenická kultura. Jedná se o čistou kulturu bez přidaných bakterií nebo jiných metabolických buněk. Používá se hlavně jako izolační medium pro parazity, ale lze jej využít i pro primární růst (Garcia 2002).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Chemikálie

Flotační roztok o hustotě 1,28 g/cm³, Fyziologický roztok, 70% ethanol, anestetika (ketamin), analgetika (xylazin) Hydrogenuhličitan sodný, Kultivační médium (EMEM s 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu, streptomycinu), dd H₂O, chloroform, tekutý dusík

Materiál

Automatická pipeta, Zkumavky Falcon, Centrifuga, Boxy E4 o rozměrech 1730 cm², Zkumavka Eppendorf, Sítko o velikosti ok 0,5 mm, CO₂ inkubátor, Hmoždír s tloučkem, Mikroskop, Laboratorní nádobí (Petriho misky, kádinky, kultivační láhve)

Biologický materiál

Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*), Potemník moučný (*Tenebrio molitor*), Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*), Buňky střevního epitelu potkana (IEC-4, IEC-6)

4.2 Metodika

4.2.1 Biologický materiál

Finálním hostitelem byl zvolen laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) kmen Wistar, k pokusu byl použit jeden jedinec samčího pohlaví. Modelovým mezihostitelem byl v pokusu použit Potemník moučný (*Tenebrio molitor*). Jednalo se o jednoho až dva jedince, ze kterých bylo získáno přibližně 15 kusů cysticerkoidů, které byly použity k infekci finálního hostitele. Paraziti získaní pro pokus z hostitelského organismu byly tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Přesněji bylo získáno 8 dospělých jedinců, kteří byli dále použiti a umístěni do Petriho misek za přítomnosti buněk střevního epitelu potkana (IEC-4, IEC-6) a kultivačního média.

Chov pokusných zvířat

Pro pokus byli potkani chováni ve standardních boxech E4 o rozměrech 1730 cm². Zvířata byla v boxech umístěna po dvou nebo po třech kusech. Při optimální teplotě 22C°±2C° a 50% vlhkosti. Potkani byli získáni od komerčního dodavatele (firma Velaz s.r.o). Zakoupení hlodavci měli hmotnost 200 g, která je vhodná pro manipulaci. Pokusná zvířata byla napájena a krmena *ad libitum* komerčně vyráběným krmivem ST-1. S občasným podáním ovoce, zeleniny nebo tvrdého pečiva.

Brouci byli získáni z experimentálního chovu Katedry zoologie a rybářství. Hmyz byl chován v platových dobře větratelných nádobách. Potemníkům bylo podáváno krmivo *ad libitum* ve formě obilného šrotu obohaceného o kvasnice.

Získání biologického materiálu

Pro získání dospělých tasemnic bylo zapotřebí nejprve infikovat meziphostitele. V našem případě se jednalo o brouka druhu *Tenebrio molitor*.

Infekce brouků byla zajištěna podáním potkaních výkalů, které obsahovaly infekční onkosféry. Přítomnost infekčních vajíček v trusu byla předem ověřena pod mikroskopem. Trus byl u brouků ponechán a vývoj cysticerkoidů probíhal v inkubátoru při 29 °C 12 dní. Po uplynutí 12 dnů bylo možné již předpokládat výskyt cysticerkoidů v tělní dutině brouků.

Byla tedy provedena dekapitace jedinců s následným odstraněním krovek a křídel. Torzo hmyzu bylo poté vypitváno a obsah těl byl smíchán s cca 0,5 ml fyziologického roztoku v Petriho misce. Směs byla nanesena na podložní sklíčko a vložena do mikroskopu, kde bylo možné pozorovat značné množství cysticerkoidů. Z Petriho misek následoval přenos směsi plastovou pipetou do mikroskopické zkumavky (typ Eppendorf). Cysticerkoidy s fyziologickým roztokem byly pomocí automatické pipety podány potkanům do ústní dutiny.

Pro ověření, jestli infekce potkanů byla úspěšná, byl použit následující postup. 21 dní po infekci byly potkanům odebrány výkaly. Vzorek byl rozmělněn v destilované vodě a přeceděn sítkem o velikosti ok 0,5 mm. Do zkumavky jsme přemístili přeceděnou tekutinu, která byla následně vložena do centrifugy na 5 min a stáčená při rychlosti 1500 RPM. Po dokončení centrifugace byl odstraněn supernatant, nahrazen flotačním roztokem o hustotě 1,28 g/cm³ a celý obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Následně byla zkumavka flotačním roztokem doplněna po okraj (pozitivní meniskus), překryta krycím sklíčkem a opětovně centrifugována při 1200 RPM po dobu 3 min. Po dokončení centrifugace bylo sklíčko sejmuto a umístěno pod mikroskop. Prokázáním úspěšné infekce bylo možné přejít k izolaci tasemnic. Pitva proběhla tři týdny po prokázání infekce. Prodleva mezi prokázáním infekce a pitvou byla naplánovaná tak, aby byla co nejvyšší pravděpodobnost osazení trávicího traktu plně vyvinutými tasemnicemi.

4.2.2 Izolace tasemnice *Hymenolepis diminuta*

Pokusné zvíře bylo uvedeno do sedace inhalací chloroformu. Následně po úvodu do anestezie byla aplikována anestetika (ketamin) a analgetika (xylazin) v injekční formě. Poté byla otevřena hrudní dutina a provedena dislokace aorty. Následovalo rychlé vykrvení zvířete. Pomocí chirurgických nůžek se zpřístupnila břišní dutina a proběhla izolace střeva. Z tenkého střeva byly vybaveny živé tasemnice. Parazité po důkladném opláchnutí od zbytků tráveniny byli na transport umístěni do fyziologického roztoku o teplotě 37 °C.

4.2.3 Stanovení produkce SOD na buněčné linii

Kultivace buněčné linie

Pro testování byla použita buněčná linie kolorektálního karcinomu Caco-2 (ATCC; HTB-37). Tyto linie byly kultivovány v EMEM s 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu.

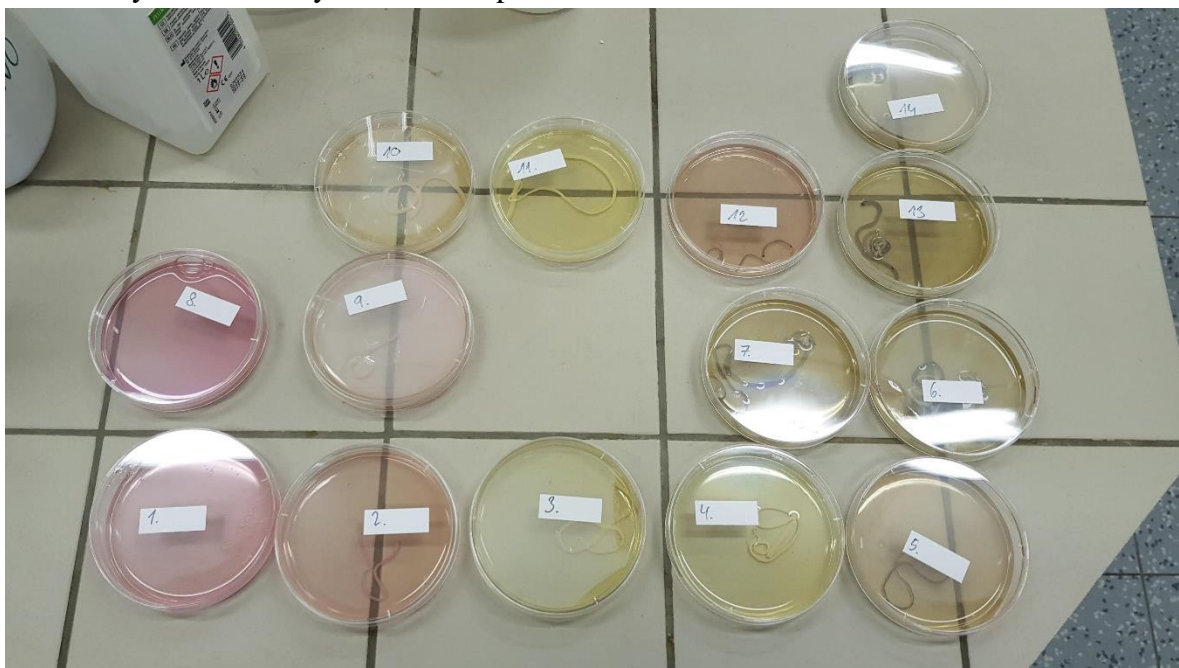
Buněčná linie byla kultivována v kultivačních lahvích přibližně 7 dní, během nichž docházelo k výměně média za čerstvé. Po 6 dnech, kdy byla dosaženo 90 % konfluency, byla buněčná vrstva promyta pomocí PBS. Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu tří minut. Po této době bylo k suspenzi přidáno 5 ml média. Celý tento obsah byl převeden do

centrifugační zkumavky a točen po dobu 10 minut při $150\times g$. Neutralizovaný trypsin byl následně odstraněn a nahrazen čerstvým médiem, ve kterém byly buňky rozředěny. Buněčná suspenze v poměru 1:10 byla přidána do nové kultivační láhve s čerstvým médiem a umístěna do CO₂ kultivačního boxu s teplotou 37 °C.

Zbytek buněčné linie byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení Petriho misek. Do Petriho misek o průměru 12 cm bylo přidáno 10 ml buněčné suspenze v kompletním EMEM médiu o koncentraci buněk 1×10^6 /ml. Připravená Petriho miska je umístěna na inkubaci do CO₂ inkubátoru na 24 hodin, kdy dosáhne 80 % konfluencie vhodné pro další testování.

Produkce SOD na buněčné linii

Po 24 h je odstraněné staré medium a nahrazeno čerstvým kompletním médiem obohaceným o cystein v koncentraci 4,5g/l. Následně byl do Petriho misky přidán 1ml vzorku vodného roztoku dusičnanu olovnatého o koncentraci 19,5 mgPb/ml a následně přidána předem určená část tasemnice nebo případně celý parazit. Obdobný postup, ale bez přidání dusičnanu olovnatého, byl uskutečněn na vzorcích buněčné linie. Takto připravené Petriho misky jsou znovu umístěny do CO₂ inkubátoru a jsou zde ponechány 24 hodin (obrázek 5.). Po uplynutí inkubační doby je tasemnice okamžitě vyjmuta a zamrazena v tekutém dusíku pro další testování. Ze zbylého media byla stanovena produkce SOD.



Obrázek 5. Vzorky tasemnic po 24hodinové kultivaci. Autor: Ivo Doskočil. V experimentu bylo použito 14 vzorků. Z celkového počtu vzorků bylo 7 bez přítomnosti olova a stejný počet zbylých vzorků byl obohacen o kontaminant.

Stanovení aktivity SOD

Stanovení SOD proběhlo pomocí dostupného komerčního kitu (ab65354) (výrobce:Abcam) pro stanovení koncentrace SOD. Odebrané medium bylo centrifugováno při $14\ 000 \times g$ po dobu 5 minut a následně byl odebraný supernatant uložen na ledu do dalšího použití. Do destičky byly postupně přidávány jednotlivé roztoky z kitu, nejdříve bylo přidáno 20 μl vzorků následně roztok WST (200 μl) a 20 μl pracovního roztoku enzymů. U blanku 1 bylo místo 20 μl supernatantu přidáno 20 μl dd H₂O, Blanku 2 byl přidán vzorek ale místo 20 μl roztoku enzymu byl přidán ředící roztok a blank 3 se lišil od blanku 1 v tom, že obsahoval 20 μl ředícího roztoku místo enzymu (tab. 1). Destička byla následně inkubována po dobu 20 minut při 37 °C, následně byla měřena optická densita při 450 nm pomocí Tecan Infinity M200 (tecan, Švýcarsko)

Tabulka 1.

Součást	Vzorek (μl)	Blank (μl)	Blank 2 (μl)	Blank 3 (μl)
Testovaný vzorek	20	0	20	0
ddH ₂ O	0	20	0	20
Pracovní roztok WST	200	200	200	200
Pracovní roztok enzymu	20	20	0	0
Ředící roztok	0	0	20	20

Získaná data byla vyhodnocena podle následujícího vzorce:

$$\text{Aktivita SOD (míra inhibice v \%)} = \frac{(A \text{ blank1} - A \text{ blank3}) - (A \text{ vzorek} - A \text{ blank2})}{(A \text{ blank1} - A \text{ blank3})} \times 100$$

A= absorbance

4.3 Statistické vyhodnocení dat

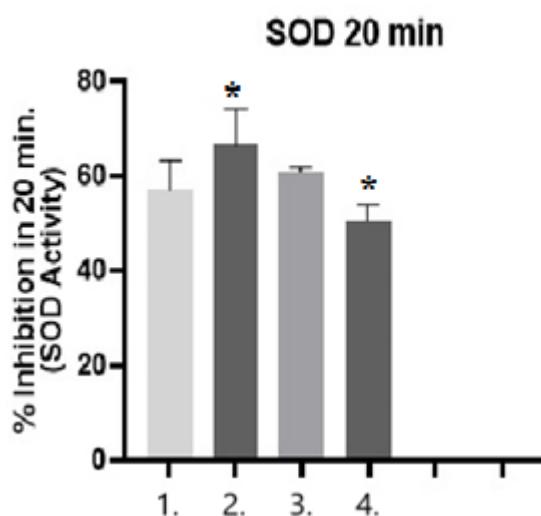
Vyhodnocení získaných dat Statistická analýza byla provedena pomocí Statistického softwaru GraphPad Prims 9.1. Data jsou uvedena \pm směrodatná odchylka průměru a rozdíly v parametrech SOD mezi jednotlivými vzorky byly vyhodnoceny analýzou rozptylu ANOVA. S následným Tukeyho testem, který byl použit pro zjištění významně od sebe se lišících vzorků. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou pro všechny statistické analýzy.

5 Výsledky

Tato diplomová práce se zabývala stanovením produkce superoxid dismutázy ve vzorcích media s tasemnicí, buněk s tasemnicí. Výsledné koncentrace jsou uváděny v procentech. Činidlo použité pro buněčnou proliferaci je ve vodě rozpustná tetrazoilová sůl (WST-1). Ta produkuje ve vodě rozpustné formazanové barvivo, které lze detekovat 450nm po redukci WST-1 superoxidovými anionty. Snížení WST-1 je inhibováno SOD, která katalyzuje dismutaci superoxidového aniontu za vzniku peroxidu vodíku a O₂. Proto byla aktivita SOD vypočítána na základě procentuálního zpomalení redukce WST-1 a to odráží procentní inhibici superoxidových aniontů.

5.1 Vliv kultivačních podmínek na aktivitu SOD

Hodnoty aktivity SOD při různých kultivačních podmínkách jsou uvedeny na obrázku 3. Nejvyšších hodnot bylo dle předpokladů dosaženo při kultivaci *H. diminuta* za přídavku jak střevních buněk, tak xenobiotika (Pb), nicméně průkazně se aktivita SOD lišila jen mezi variantami Buňky + celá + Pb a Medium + celá + Pb. U zbylých vzorků byla potvrzená nulová hypotéza a nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kultivačními podmínkami, viz. tabulka 3.)



Obrázek 3. 1. buňky+celá, 2. Buňky+celá+Pb, 3. medium+celá, 4. medium+celá+Pb. Graf znázorňuje procentuální produkci SOD jednotlivými výše znázorněnými skupinami.

*= signifikantní rozdíl mezi druhy médií.

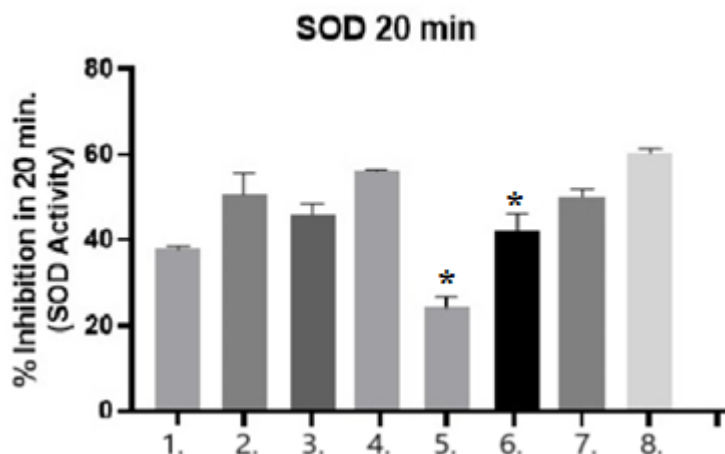
Tabulka 2. Výsledky významnosti media

Tukey test	Mean Diff,	95,00 % CI of diff,	Signifikace	Hodnota p
Buňky + celá vs. Buňky + celá + Pb	-9,544	-23,66 to 4,576	ns	0,368
Buňky + celá vs. Medium + celá	-3,991	-18,11 to 10,13	ns	0,9939
Buňky + celá vs. Medium + celá + Pb	6,499	-7,621 to 20,62	ns	0,8294
Buňky + celá + Pb vs. Medium + celá	5,554	-8,567 to 19,67	ns	0,9289
Buňky + celá + Pb vs. Medium + celá + Pb	16,04	1,923 to 30,16	*	0,0197
Medium + celá vs. Medium + celá + Pb	10,49	-3,631 to 24,61	ns	0,2561

Tabulka 2. určuje statistickou významnost porovnání mezi jednotlivými vzorky. Hvězdičkou je označena míra signifikace. Označení „ns“ ukazuje na neprokázání hladiny významnosti. U testů tedy nebyla prokázána hladina významnosti ($p < 0,05$). V tabulce 2 jsou vzorky označené zkratkami. „Buňky“ je označení pro střevní epitel potkana (IEC-4, IEC-6). „Celá“ je zkratkou pro tasemnice, které nebyly rozděleny na kraniální a kaudální část. Označením „Pb“ jsou definovány vzorky s přítomností olova a „medium“ bylo označeno kultivační medium tasemnic.

5.2 Aktivita SOD produkovaná v různých částech tasemnice

Hodnoty aktivity SOD v různých částech parazita jsou uvedené na obrázku 4. Nejproduktivnější byla neočekávaně kaudální část parazita s xenobiotiky (Pb) kultivovaná v médiu bez buněk. Prokazatelně se aktivita SOD lišila jen mezi variantami Medium + SK vs. Medium + strobila. U zbylých vzorků byla potvrzena nulová hypotéza (nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kaudální a kraniální částí, viz tabulka 4.)



Obrázek 4. Graf znázorňuje produkci SOD jednotlivými výše znázorněnými skupinami.

1. Buňky+SK, 2. Buňky+strobila, 3. Buňky+SK+Pb, 4. Buňky+strobila+Pb, 5. Medium+SK, 6. Medium+strobila, 7. Medium+SK+Pb, 8. Medium+strobila+Pb.

*=signifikantní rozdíl mezi částí tasemnice.

Tabulka 5. Výsledky významností částí parazitů

Tukey test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Signifikace	Hodnota p
Buňky + SK vs. Buňky + strobila	-12,79	-26,91 to 1,327	ns	0,0935
Buňky + SK+ Pb vs. Buňky + strobila +Pb	-10,22	-24,34 to 3,899	ns	0,285
Medium + SK vs. Medium + strobila	-18,01	-32,13 to -3,889	**	0,0076
Medium + SK+ Pb vs. Medium +strobila + Pb	-10,22	-24,34 to 3,901	ns	0,2851

Tabulka 3. hodnotí statistickou významnost mezi jednotlivými vzorky. Hvězdičkou je označena míra signifikace. Označení „ns“ ukazuje na neprokázání hladiny významnosti. U testů tedy nebyla prokázána hladina významnosti ($p < 0,05$). Tabulky 3 obrázek 4 jsou označeny zkratkami. „SK“ je označení kraniální části tasemnice. Pro kaudální část parazita jsme zvolili název „strobila“. Olovo a „buňky“ jsou zde značeny shodně jako v tabulce 2.

6 Diskuze

6.1 Superoxid dismutáza

Předmětem pokusu byl vliv způsobu kultivace na množství vyprodukované superoxid dismutázy. V druhé části pokusu jsme se zaměřili na produkci enzymu v kaudální a kraniální části *Hymenolepis diminuta*. Antioxidační enzymy představují velmi důležitý mechanismus pro přežití parazitů v hostitelském organismu. Slouží jako ochrana před volnými radikály uvolněnými během zánětu vyvolaného imunitním systémem hostitele (Mosser 2003).

6.1.1 Produkce SOD závislá na kultivačním mediu

Ve výsledcích naší studie jsme pozorovali rozdíly v produkci superoxid dismutázy při různých kultivačních metodách. V pokusu jsme porovnali celé tasemnice, které byly umístěny na buňkách střevního epitelu potkana (IEC-4, IEC-6) nebo byly umístěny v kultivačním mediu. Do studie jsme také zařadili vzorky s přidáním olova. Olovo bylo umístěno na epitelální buňky i do samotného media (Tabulka 3.) Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při kultivaci *H. diminuta* za přítomnosti olova jak střevních buněk, tak xenobiotika (Pb). Vysoké hodnoty SOD za přítomnosti olova můžou být vysvětleny tak, že pod vlivem olova dochází k nástupu oxidačního stresu a produkci ROS (Flora 2002). I jiné studie potvrzují vyšší produkci reaktivních forem kyslíku po ošetření vzorků olovem *in vitro* (Monteiro et al. 1991).

Buňky střeva s tasemnicí měly vyšší procentuální aktivitu SOD než medium s *H. diminuta* (Obrázek 3.). Zde se nabízí možnost, že se do výsledné koncentrace SOD zapojily i kultivované střevní buňky. Studie Kosik-Bogacka et al. (2011) ve svých výsledcích poukazuje na celkové snižování produkce SOD po celé délce střeva (jejunu, duodenu, tlustém střevě), při kultivaci *in vivo*. Údaje jsou ovšem měřeny v čase a první test probíhal 8 dní po infekci, kdy byl změřen výrazný pokles produkce SOD (77 % proti kontrolní neinfikované tkáni). Ovšem naše studie vystavovala hostitelské buňky působení parazita jen po dobu 24 h. Je tedy pravděpodobné, že za tento krátký časový úsek nedošlo k výraznému poklesu produkce SOD a mohla se zapojit do celkové koncentrace námi pozorovaných vzorků.

Z dostupných dat můžeme usoudit, že případná další studie zaměřená tímto směrem by mohla ověřit dlouhodobější infekce *in vitro*. Studie Lopes et al. (2015) při kultivaci tasemnic na střevních buňkách (IEC-6) s 10 % FBS (fetální hovězí sérum), zůstaly tasemnice v kultivačním mediu vitální po dobu 3 týdnů. Rovněž v této studii byla pozorována vyšší vitalita a růst tasemnic při umístění na střevních buňkách než v samotném mediu (10 % FBS). Do pokusu byly také zařazené lidské buňky T84 i zde byla sledována lepší vitalita parazitů umístěných na buňkách než v samotném mediu, ale nedosahovali stejně pozitivních výsledků jako v případě kultivace s potkaními buňkami. Úspěšnost kultivace se shodovala s tolerancí hostitelských druhů.

V naší studii tedy nebyl splněn předpoklad vyplývající z předchozích studií. Při statistickém zpracování dat z naší studie nebyl potvrzený signifikantní rozdíl mezi vzorky epitelálních buněk a media. Prokazatelně signifikantní rozdíl mezi vzorkem s buňkami a vzorkem s médiem byl pouze v případě, že oba vzorky obsahovaly olovo. Rozdíly mezi zbylými vzorky tasemnic umístěných na buňkách střeva a v samotném kultivačním mediu nebyly prokazatelně signifikantní (tabulka 3.). Z toho vyplývá, že nebyla vyvrácena nulová

hypotéza a koncentrace antioxidantních enzymů produkovaných *H. diminuta* v různých kultivačních podmínkách se průkazně neliší.

Ve výsledcích byl patrný procentuální rozdíl mezi kultivačními metodami, ale rozdíl mezi zkoumanými vzorky nebyl u většiny signifikantně prokázán. Možným vysvětlením je malý počet zkoumaných vzorků. Opakování studie s větším počtem vzorků by mohlo přinést průkazné výsledky. Námi uskutečněná studie by mohla mít pozitivní přínos pro další možné testování rozdílu kultivace. Studie by se mohly zaměřit na dlouhodobé kultivace *Hymenolepis diminuta* in vitro, které by byly měřeny v čase a byla by pozorována snižující se nebo zvyšující se hladina SOD v různých kultivačních mediích.

6.1.2 Produkce SOD různými částmi tasemnice

Pro náš pokus byly tasemnice rozděleny na kraniální a kaudální část. Rozdělení tasemnice mělo za úkol prokázat, která část helminta má vyšší enzymatickou aktivitu. Výsledky studie enzymatické aktivity byly následující. Produktivnější byla prokazatelně kaudální část parazita. Ovšem aktivita SOD se prokazatelně lišila jen mezi variantami Medium + SK vs. Medium + strobila. U zbylých vzorků nelze vyloučit nulovou hypotézu, nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kaudální a kraniální částí.

Předchozí studie provedená Skrzycki et al. (2011) prokázala jiné výsledky enzymatické aktivity. Studie došla k závěru, že nejproduktivnější je přední část parazita, která obsahovala primordiální genitálie umístěné v nezralých segmentech. SOD1(cytosolická) i SOD2 (mitochondriální) dosahovali vysokých hodnot. SOD1 vykazovala vysoké hodnoty po celé délce tasemnice, a to jak u mladých (1,5 měsíce) tak u starých (1,5roku) tasemnic. Protože náš výzkum probíhal na pokusných zvířatech mladších než 1,5 roku, srovnávali jsme hodnoty jen mladých tasemnic. Tým Czczot et al. (2013) také došel k závěru že u parazita *H. diminuta* je přední část místem s nejvyšší aktivitu enzymů SOD1 i SOD2. Enzymaticky aktivnější po celém povrchu byla SOD1. SOD2 vykazovala nejvyšší enzymatickou aktivitu v nezralých proglodytech.

Studie Skrzycki et al. (2011) si vysvětloval tento výsledek tím, že kraniální část parazita je nejvíce vystavena působení obranných mechanismů hostitele.

Nejméně enzymaticky aktivní byl detekován mediální úsek parazita. SOD1 i SOD2 vykazovali nižší aktivitu. Mediální části obsahovala rannou dělohu, hermafroditické proglottidy. Pravděpodobné vysvětlení spočívá ve vzrůstající vzdálenosti parazita od styku s hostitelem. Kaudální úsek tasemnice (obsahující zralé gravidní segmenty) ve studii vykazoval vyšší aktivitu než mediální úsek, který nepřevyšoval ale produkci přední úsek tasemnice (Skrzycki et al. 2011). Výsledkem našeho pokusu byla procentuálně nejvyšší enzymatická aktivita naměřena v kaudální části parazita (obrázek 4.), ale statistické zpracování dat neprokázalo signifikantní rozdíl mezi kraniální a kaudální částí parazita.

Rozdílnost ve výsledcích mohla být způsobena rozdělením tasemnice na dvě části. Zadní část mohla být delší a tím se zvětšil povrch pro případnou enzymatickou aktivitu. Nebo v naší studii mohlo dojít k obohacení kraniální nebo kaudální části o hermafroditické proglottidy a rannou dělohu. Pro další studie by bylo vhodně rozdělit parazita na více částí a tím potvrdit či vyvrátit výsledky naší studie.

Část vzorků z naší studie byla obohacena o xenobiotika (Pb). Olovo je jedním z řady běžných kontaminantů životního prostředí (Ercal et al. 2001). Parazité přicházejí do styku s olovem především prostřednictvím GIT hostitele. Olovo je v těle hostitele schopno z GIT procházet epiteliální membránou paracelulární difúzí a vstupovat do krevního řečiště. V Krevním řečišti se váže na membránu erytrocytů a je transportováno oběhovým systémem do různých orgánů v těle. Ionty olova jsou předávány z GIT a portálním oběhem se dostávají do jater. Zde je většina Pb odstraněna z krve a je vylučována do střeva žlučí. Se steroidy obsaženými ve žluči tvoří s ionty těžkých kovů organokovové komplexy, které odcházejí žlučovodem do tenkého střeva (Sures & Siddall 1999). Olovo, které je vázáno na žluč může být následně absorbována tasemnicí prostřednictvím tegumentu (Sures et al. 1998).

V našem pokusu byla naměřeny vysoké hladiny SOD po přidání olova do studovaných vzorků. Pravděpodobné vysvětlení toho trendu je, že olovo mimo jiných nežádoucích účinků na organismus také prokazatelně způsobuje zvýšenou produkci ROS, zejména superoxidový aniont, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Studie prokazující toto tvrzení byla založená na pokusu, kdy se na zvířecím modelu vyvolala hypertenze způsobená olovem. Byla zahájena léčba pomocí tempolu (lék, který simuluje v těle superoxid dismutázu), lék vstupuje do intracelulárního prostoru a eliminuje superoxidové radikály. Touto medikací se u pokusných zvířat podařilo hypertenzi eliminovat (Vaziri et al. 2001). Tato studie ovšem nebyla založená na parazitech, ale na savcích. Přesněji se jednalo o laboratorní potkany. Známe tady účinek olova na finálního hostitele a z tohoto faktu nadále dovozujeme případný vliv na parazita.

Náš pokus v tomto případě dopadl dle předpokladů, za přítomnosti olova vykazovali vzorky vyšší produkci SOD. Studie by mohla lépe osvětlit parazitické biochemické procesy, které tasemnice produkuje při styku s olovem.

Pokus může být také přínosem pro další případné studie podobného zaměření. I když naše statistické vyhodnocení dat neprokazuje signifikantní rozdíl mezi jednotlivými částmi, bylo by určitě vhodné studii zopakovat na více jedincích a tím potvrdit nebo vyvrátit naše výsledky.

7 Závěr

Závěrem práce bych ráda slovně vypsala odpovědi na vědecké hypotézy, které byly stanoveny na začátku diplomové práce.

Buňky střeva s tasemnicí měli vyšší procentuální aktivitu SOD než medium s *H. diminuta*. Nejvyšších hodnot dosáhli dle předpokladů epitelové buňky střeva s celou tasemnicí a olovem, nicméně průkazně se aktivita SOD lišila jen mezi variantami Buňky + celá + Pb a Medium + celá + Pb. U zbylých vzorků nebyla vyvrácena nulová hypotéza a nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kultivačními podmínkami.

Při ověřování druhé nulové hypotézy byli neproduktivnější částí prokazatelně kaudální část parazita. Ovšem aktivita SOD se prokazatelně lišila jen mezi variantami Medium + SK vs. Medium + strobila. U zbylých vzorků nebyla vyvrácena nulová hypotéza nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi produkcí v kaudální a kranální částí.

Statistická analýza rozdílů v parametrech SOD mezi jednotlivými vzorky byla vyhodnocena pomocí analýzou rozptylu ANOVA. S následným Tukeyho testem, který byl použit pro zjištění významně od sebe se lišících vzorků.

Vzhledem k potvrzení námi stanovených nulových hypotéz navrhuji testy rozšířit o další antioxidační enzymy a zopakovat pokus na větším počtu vzorků, které kvůli nastalé coronavirové krizi nebylo možné uskutečnit.

8 Literatura

Ahmed NH. 2014. Cultivation of parasites. *Tropical Parasitology*. **2**: 80-89.

Alrikaby NJA, Maktoof AA, Hafedh A A. 2020. Bioaccumulation of some heavy elements in different tissue of *Cotugnia polycantha* and two parasites (*Raillietina tetragona* and *Streptopellia senegalensis*) infected with birds. *Eurasian Journal Of Biosciences*. **14**: 395-399.

Assady M, Farahnak A, Golestani A, Esharghian M R. 2011. Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity Assay in *Fasciola* spp. Parasites and Liver Tissue Extract. *Iranian Journal Of Parasitology*. **4**: 17-22.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Toxicological profile for lead. Atlanta, Georgia, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services.

Bogden JD, Gertner SB, Christakos S, Kemp FW, Yang Z, Katz SR, Chu C. 1992. Dietary Calcium Modifies Concentrations of Lead and Other Metals and Renal Calbindin in Rats. *The Journal Of Nutrition*. **7** :1351–1360.

Bolla RI, Roberts LS. 1971. Developmental Physiology of Cestodes. IX. Cytological Characteristics of the Germinative Region of *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*. **2**: 267-277.

Čadková Z, Miholová D, Száková J, Jankovská I, Langrová I. 2014. Is the tapeworm able to affect tissue Pb-concentrations in white rat? *Parasitology*. **6**: 826-836.

Castro GA. 1996. Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. In: *Medical Microbiology*. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. Texas.

Czczot H, Skrzycki M, Majewska-Wierzbicka M, Podsiad M, Salamatin R, Grytner-Zięcina B. 2013. The antioxidant defence mechanisms of parasite and host after chronic *Hymenolepis diminuta* infestation of the rat. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*. **1**: 121-123.

Czczot H, Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Salamatin R, Grytner-Zięcina B. 2012. Enzymatic antioxidant system in the cestode *Hymenolepis diminuta* after chronic infection of the rat. *Central European Journal Of Biology*. **6**: 987-995.

DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. 2003. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **17**: 405–417.

Docampo R. 1995. Antioxidant Mechanisms. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. 147–160.

Dzik JM. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimika Polonica*. **1**: 33-64.

- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **1**:529-539.
- Fal W, Czaplicka H. 1991. Effect of experimental *hymenolepiasis* on various tissue reactions. in rats. *Wiadomosci Parazytologiczne* **37**: 331–342.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* **64**: 97–112.
- Garcia LS. 2002. Diagnostic Medical Parasitology. Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology. 274–305.
- Goswami R, Mohan Singh S, Kataria M, Somvanshi R. 2011. Clinicopathological Studies on Spontaneous *Hymenolepis diminuta* Infection in Wild and Laboratory Rats. *Brazilian Journal Of Veterinary Pathology.* **2**: 103-111.
- Hadas E, Derda M. 2014. Pasożyty - zagrożenie nadal aktualne (Parasites are still dangerous). *Problemy Higieny I Epidemiologii.* **1**: 6-13.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford university press. ISBN: 978-0-19871747-8.
- Han S G, Kim Y, Kashon ML, Pack D L, Castranova V, Vallyathan V. 2005. Correlates of Oxidative Stress and Free-Radical Activity in Serum from Asymptomatic Shipyard Welders. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine.* **172**: 1541-1548.
- Henkle-Dührsen K, Kampkötter A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular And Biochemical Parasitology.* **2**: 129-142.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione Transferases. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology.* **45**: 51-88.
- Hurd H, Warr E, Polwart A. 2001. A parasite that increases host lifespan. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences.* **1477**: 1749–1753. doi:10.1098/rspb.2001.1729
- Chiumiento L, Bruschi F. 2009. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitology Research.* **105**: 593–603.
- Jankovská I, Miholová D, Langrová I, Bejček V, Vadlejch J, Koliňová D, Šulc J. 2009. Influence of parasitism on the use of small terrestrial rodents in environmental pollution monitoring. *Environ Pollut.* **157**:2584–2586.
- Jankovska I, Miholova D, Lukesova D, Kalous L, Válek P, Romočuský Š, Vadlejch J, Petřtýl M, Langrová I, Čadková Z. 2012. Concentrations of Zn, Mn, Cu and Cd in different tissues of perch (*Perca fluviatilis*) and in perch intestinal parasite (*Acanthocephalus lucii*) from the stream near Prague (Czech Republic). *Environmental Research.* **112**: 83–85.
- Kapczuk P, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N, Gutowska I, Kupnicka P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. 2018. Selected Molecular Mechanisms Involved in the Parasite–Host

System *Hymenolepis diminuta*–*Rattus norvegicus*. International Journal Of Molecular Sciences. **8**: 2435-2456.

Klion AD, Nutman TB. 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. **113**: 30-33.

Kosik-Bogacka D I, Baranowska-Bosiacka I, Nocen I, Jakubowska K, Chlubek D. 2011. *Hymenolepis diminuta*: Activity of anti-oxidant enzymes in different parts of rat gastrointestinal tract. Experimental Parasitology. **128**: 265-271.

Lopes F, Reyes JL, Wang A, Leung G, McKay D M. 2015. Enteric epithelial cells support growth of *Hymenolepis diminuta* in vitro and trigger TH2-promoting events in a species-specific manner. International Journal For Parasitology. **11**: 691-696.

Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal Of Cellular And Molecular Medicine. **4**: 840-860.

Matosková M, Ruttkay-Nedecký B, Kizek R. 2014 Antioxidat enzymes – biochemical markers of oxidative stress. Journal of Metallomics and Nanotechnologies. **3**: 53-56.

Mayne S.T. 2003. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. The Journal of Nutrition. **3**: 933–940.

McKay DM. 2010. The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. Parasitology. **137**: 385-394.

McKay, D. M., Halton, D. W., McCaigue, M. D., Johnston, C. F., Fairweather, I., Shaw, C. 1990. *Hymenolepis diminuta*: intestinal goblet cell response to infection in male C57 mice. Experimental Parasitology. **1**: 9-20. doi: 10.1016 / 0014-4894 (90) 90003-u.

Meister A, Anderson MD. 1983. Glutathione. Annual Review of Biochemistry. **52**:711-760.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. Free Radical Biology and Medicine. **8**: 95–108.

Mkoji GM, Smith JM, Prichard RK. 1988. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. International Journal for Parasitology. **18**: 661-666.

Monteiro HP, Bechara EJ H, Abdalla D S P. 1991. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. Molecular And Cellular Biochemistry Volume. **103**: 73–83.

Mosser DM, 2003. The many faces of macrophage activation. Journal of Leukocyte Biology. **73**: 209–212.

Munir WA, Barrett J. 1985. The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). Parasitology. **1**: 145-156. doi:10.1017/s0031182000056584

- Niwa A, Miyazato T. 1996. Reactive oxygen intermediates from eosinophils in mice infected with *Hymenolepis nana*. *Parasite Immunology*. **18**: 285–295.
- Nordmann R, Ribière C. 1991. Superoxyde dismutases: rôle biologique; espoir thérapeutique ? *Cah Nutr Diét*. **6**:398–402.
- Olson P D, Littlewood DT, Bray RA, Mariaux J. 2001. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **19**: 443–467. doi: 10.1006/mpev.2001.0930
- Pappas PW. 2000. Allometric growth of the proglottids and strobila of the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Helminthology*. **74**: 259-265.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. **1**: 19-39.
- Patrick L. 2006. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Alternative Medicine Review*. **2** :114-127.
- Phillip AT, Gerson B. Lead poisoning – Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics.1994. *Clin Lab Med*. **14**:423-444.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, de Tata V, Casini AF. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. **66**:1499–503.
- Precious WY, Barrett J. 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today*. **5**: 156–160.
- Racek J, Holeček V. 1999. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*. **93**: 774-780.
- Rhee SG. 2006. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. **5782**:1882–1883.
- Rothma A H. 1959. Studies on the excystment of tapeworms. *Experimental Parasitology*. **4**: 336–364. doi:10.1016/0014-4894(59)90029-3
- Rozario T, Newmark P A. 2015. A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Experimental Parasitology*. **158**: 31–41.
- Shin, M. H., Lee, Y. A., Min, D. -Y. 2009. Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection. *Korean Journal Of Parasitology*. **47**: 125-131. doi: 10,3347 / kjp.2009.47.S.S125.
- Shostak A W, 2014. *Hymenolepis diminuta* Infections In Tenebrionid Beetles As A Model System for Ecological Interactions Between Helminth Parasites and Terrestrial Intermediate Hosts: A Review and Meta-Analysis. *Journal of Parasitology*. **1**: 46-58.
- Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czczot H, Salamatin R, Twarowska J, Grytner-Zięcina B. 2011. *Hymenolepis diminuta*: Experimental studies on the antioxidant system with short and

long term infection periods in the rats. *Experimental Parasitology*. **2**: 158-163. doi: /10.1016/j.exppara.2011.06.014.

Smith NC, Bryant C. 1986. The role of host generated free radicals in helminth infections: *Nippostrongylus brasiliensis* and *Nematospiroides dubius* compared. *International Journal for Parasitology*. **16**:617–622.

Starling JA.1975. Tegumental carbohydrate transport in intestinal helminths: correlation between mechanisms of membrane transport and the biochemical environment of absorptive surfaces. *Transactions of the American Microscopical Society*. **94**:508–523.

Sulima A, Savijoki K, Bień J, Näreaho A, Salamatin R, Conn DB, Młocicki D. 2018. Comparative Proteomic Analysis of *Hymenolepis diminuta* Cysticercoid and Adult Stages. *Frontiers in Microbiology*. **8**:2672. doi: 10.3389/fmicb.2017.02672

Sures B, Scheible T, Bashtar AR, Taraschewski H. 2003. Lead concentrations in *Hymenolepis diminuta* adults and *Taenia taeniaeformis* larvae compared to their rat hosts (*Rattus norvegicus*) sampled from the city of Cairo, Egypt. *Parasitology*. **5**: 483-487.

Sures B, Grube K, Taraschewski H. 2002. Experimental Studies on the Lead Accumulation in the Cestode *Hymenolepis diminuta* and its Final Host, *Rattus norvegicus*. *Ecotoxicology*. **11**:365–368.

Sures B, Jürges G, Taraschewski H. 1998. Relative concentrations of heavy metals in the parasites *Ascaris suum* (Nematoda) and *Fasciola hepatica* (Digenea) and their respective porcine and bovine definitive hosts. *International Journal for Parasitology*. **28**: 1173–1178.

Sures B, Siddall R. 1999. Pomphorhynchus laevis: the intestinal acanthocephalan as a lead sink for its fish host, chub (*Leuciscus cephalus*). *Experimental Parasitology*. **93**:66–72.

Sures B, Siddall R, Taraschewskia H. 1999. Parasites as Accumulation Indicators of Heavy Metal Pollution. *Parasitology Today*. **1**:16-21.

Tanowitz HB, Weiss LM, Wittner M. 2001. Tapeworms. *Current Infectious Disease Reports*. **1**: 77–84.

Tena D, Pérez Simón M, Gimeno C, Pérez Pomata MT, Illescas S, Amondarain I, González A, Domínguez J, Bisquert J. 1998. Human infection with *Hymenolepis diminuta*: case report from Spain. *Journal of Clinical Mikrobiology*. **8**: 2375-2376.

Threadgold L, & Robinson A. 1984. Amplification of the cestode surface: A stereological analysis. *Parasitology*. **3**: 523-535.

Vajragupta O, Boonchoong P, Berliner LJ. 2004. Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards *hydrolysis*. *Free Radical Research*. **38**: 303–314.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. 2001. Compensatory upregulation of nitric-oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **298**:679-685.

Wani AL, Ara A, Usmani A. 2015. Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary Toxicology*. **2**: 55-64.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM. 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev*. **201**:156–167.

Ziegler EE, Edwards BB, Jensen RL, Mahaffey RK, Fomon SJ. 1978. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatric Research*. **12**:29-34.