

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Manfred Schreiber

Helmini jako původci nádorových onemocnění obratlovců

Helminths as causative agents of vertebrate cancers

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha, 2018

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat především svému školiteli prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za trpělivost, odbornou konzultaci a podnětné rady a připomínky.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 16. 8. 2018

.....

## **Abstrakt**

*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* a *Schistosoma haematobium* byli Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikováni jako karcinogeny 1. skupiny. Infekce opisthorchidními motolicemi může vést ke vzniku cholangiokarcinomu jater a v případě schistosom může vznikat spinocelulární karcinom močového měchýře. Spojitost mezi infekcí helminty a vznikem karcinomů je potvrzena, avšak přesné mechanismy jejich indukce jsou teprve nyní intenzivně studovány. Existují i další druhy helmintů, u nichž se uvažuje o asociaci s nádorovými onemocněními, avšak přímá stimulace karcinogeneze zatím nebyla prokázána. Ke vzniku nádorů může dojít také maligní transformací totipotentních buněk parazitů, které pak metastázuji do různých částí těla hostitele. Některé druhy helmintů však mohou mít i opačný efekt a vykazují proti nádorovou aktivitu. Tato práce se věnuje především helmintům asociovaným se vznikem nádorových onemocnění a dosud popsaným mechanismům karcinogeneze způsobené takovými infekcemi.

**Klíčová slova:** Helminti, motolice, tasemnice, nádory, karcinogeneze, interakce

## **Abstract**

*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, and *Schistosoma haematobium* have been classified as the group 1 of carcinogens by the International Agency for Research on Cancer. Infections with opisthorchid flukes may lead to the development of cholangiocarcinoma of the liver, and those with schistosomes to the squamous carcinoma of the bladder. The link between helminth infections and carcinomas has been confirmed, and the exact mechanisms of carcinoma induction are at present intensively studied. There are some other representatives of helminths that are probably associated with cancers, but their direct effect on the process of carcinogenesis has not been confirmed yet. The formation of tumors can also occur via malignant transformation of totipotent parasite cells that become invasive and metastasize to different parts of the host body. However, some types of helminths may exhibit an opposite effect and show an anti-tumor activity. This review primarily focuses on the helminths associated with the development of cancer and the currently described mechanisms of carcinogenesis caused by such infections.

**Key words:** Helminths, flukes, tapeworms, cancer, carcinogenesis, interactions

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
<b>2. Opisthorchidní motolice</b> .....	2
2.1 Historie .....	2
2.2 Biologie a životní cyklus .....	2
2.3 Rozšíření a prevalence .....	3
2.4 Patogenita .....	3
2.5 Cholangiokarcinom .....	4
2.6 Mechanismy karcinogeneze .....	4
2.6.1 Mechanické poškození .....	4
2.6.2 Exkrece-sekreční produkty .....	5
2.6.3 Chronické záněty .....	7
<b>3. Schistosomy</b> .....	10
3.1 Historie .....	10
3.2 Biologie a životní cyklus .....	11
3.3 Rozšíření a prevalence .....	11
3.4 Patogenita .....	11
3.5 Karcinom močového měchýře .....	12
3.6 Mechanismy karcinogeneze .....	12
<b>4. Potenciálně karcinogenní helminti</b> .....	15
4.1 Helminti člověka .....	15
4.2 Helminti dalších obratlovců .....	17
<b>5. Totipotentní buňky helmintů jako příčina nádorových onemocnění</b> .....	17
<b>6. Helminti a ochrana před nádory</b> .....	18
<b>7. Závěr</b> .....	19
<b>8. Seznam zkratk</b> .....	20
<b>9. Použitá literatura</b> .....	21

## 1. Úvod

Helminty dal do spojení s nádorovými onemocněními již na počátku 20. století Johannes Fibiger. Za jeho objev parazita, kterého pojmenoval *Spiroptera carcinoma* a který údajně způsoboval tvorbu nádorů u myši, dostal roku 1926 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Ačkoliv byla jeho tvrzení později vyvrácena, jeho práce byla podnětem pro další bádání, díky kterým je dnes souvislost mezi infekcí některými druhy helmintů a vznikem nádorových onemocnění potvrzena. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* a *Schistosoma haematobium* jsou v současné době klasifikováni jako karcinogeny 1. kategorie, avšak přesné procesy, kterými přispívají ke vzniku karcinomů, jsou z velké části stále neobjasněny. Všeobecně se usuzuje, že existují tři hlavní mechanismy, které by mohly vést ke vzniku nádorů při infekci helminty; jedná se o (a) mechanické poškození, (b) chronický zánět a (c) stimulaci antigeny a exkrečně-sekrecními produkty parazita. U několika dalších druhů helmintů se spekuluje o jejich karcinogenních vlastnostech, avšak přímý podíl na vzniku nádorů zatím nebyl dostatečně potvrzen. Specifickým případem jsou nádory vzniklé z totipotentních buněk helmintů, které se v imunodeficitních hostitelích mohou transformovat na nádorové buňky. Zdá se však, že mohou existovat i jiné interakce, neboť některé druhy helmintů dokáží pomocí antigenů stimulovat imunitní odpověď hostitele zaměřenou na nádory. Cílem této práce je poskytnout ucelený přehled o helmintech, kteří jsou spojováni s nádorovými onemocněními, a shrnout dosud známé poznatky o mechanismech vedoucích ke vzniku nádorů při infekcích těmito parazity.

## 2. Opisthorchidní motolice

### 2.1 Historie

Možná souvislost mezi nákazou *O. viverrini* a vznikem cholangiokarcinomu (CCA) u člověka byla popsána již v roce 1953 v Thajsku (Viranuvatti & Mettiyawongse, 1953) a vznik CCA u koček nakažených *C. sinensis* byl zdokumentován roku 1965 v Hongkongu (Chang, 1965). U *C. sinensis* se spekuluje, že by mohl způsobovat i adenokarcinom vývodu slinivky (Colquhoun & Visvanathan, 1987). *Opisthorchis viverrini* byl v roce 1994 klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako karcinogen 1. skupiny, tedy prokazatelně karcinogenní pro člověka (IARC, 1994). *Clonorchis sinensis* byl do této kategorie zařazen v roce 2009 (Bouvard et al., 2009).

### 2.2 Biologie a životní cyklus

Životní cyklus obou motolic je velice podobný, zahrnuje dva mezihostitele a definitivním hostitelem jsou rybožraví savci, včetně člověka. Vajíčka se z definitivního hostitele dostanou s trusem do vodního prostředí. Následně jsou požitá prvním mezihostitelem, jímž jsou sladkovodní plži rodu *Bythinia*, u *C. sinensis* je spektrum mezihostitelů širší a zahrnuje několik dalších druhů z různých čeledí (např. *Melaniidae*, *Hydrobiidae*). V plžích se z vajíček líhnou miracidia a dochází k transformaci ve sporocysty, ty dále produkují redie a následně jsou v rediích produkovány cercárie. Tyto poté unikají do vody a penetrují do druhého mezihostitele, kterého představují hlavně kaprovité sladkovodní ryby, z nichž některé mají v asijských zemích hospodářský význam. *Clonorchis sinensis* také využívá některé druhy korýšů jako druhého mezihostitele. Cercárie encystují jako metacercárie ve svalovině nebo pod šupinami. Definitivní hostitel se pak nakazí při požití syrové nebo nedostatečně tepelně upravené ryby. Metacercárie se dostanou do tenkého střeva, kde excystují, a mladé motolice poté migrují hepatopankreatickým vývodem do žlučovodů. Tam poté během 4 týdnů dospívají a začínají tvořit vajíčka. Dospělé motolice většinou obývají intrahepatální (uvnitř jater) a extrahepatální (mimo játra) žlučovody, ve vzácných případech i žlučník a pankreatický vývod. Oba druhy motolic jsou dlouhověké, *C. sinensis* může u člověka přežít až 26 let (Saijuntha et al., 2014).

### 2.3 Rozšíření a prevalence

*Clonorchis sinensis* je rozšířenější a přibližně 35 milionů lidí je infikováno. Vyskytuje se v Koreji, Číně, východním Rusku a severním Vietnamu. V případě *Opisthorchis viverrini* se odhaduje 10 milionů nakažených. Oblast výskytu zahrnuje Thajsko, Laos, Kambodžu a Vietnam. Nejlépe prozkoumaná je situace v Thajsku. Prevalence je regionálně specifická, na severu dosahuje 19,3 %, zatímco ve středním Thajsku již jen 3,8 % (Jongsuksuntigul & Imsomboon, 1998). Nejvíce nakažených se nachází v provincii Khon Kaen na severovýchodě země. Prevalence zde dosahuje 24,5 %, v některých oblastech až 70,8 %. Khon Kaen zároveň patří k oblastem s nejvyšším počtem případů cholangiokarcinomu na světě (Sriamporn et al., 2004). Podobný trend lze pozorovat i u *C. sinensis* v Koreji, prevalence v severní části země se pohybuje kolem 2 %, v některých jižních oblastech však dosahuje i 30 % (Min et al., 2006). Jedním z důvodů této regionální specifity může být častější konzumace tradičních pokrmů ze syrových ryb jako například *koi pla* v některých oblastech. I přes značnou snahu o potlačení výskytu opisthorchiózy a dostupnosti léků představuje toto onemocnění stále velké zdravotní riziko v jihovýchodní Asii (Andrews et al., 2008).

### 2.4 Patogenita

Nákaza *O. viverrini* většinou probíhá asymptomaticky, jen 5-10 % pacientů se silnou nákazou vykazuje příznaky jako slabost, nadýmání a bolesti v oblasti jater (Upatham et al., 1984), a proto málokdy dochází ke včasnému objevení a léčbě nákazy. Jelikož jsou tyto motolice dlouhověké, mohou v lidském organismu přežívat až 26 let, což může přispívat ke vzniku karcinomu. Patologické změny zahrnují těžké záněty, deskvamaci epitelu, hyperplázii (zmnožení buněk) epitelu, metaplázii (změna jedné diferencované tkáně v jinou) pohárkových buněk a periduktální fibrózu. Při přetrvávající těžké infekci může po 7 až 15 letech dojít vlivem těchto změn ke vzniku cholangiokarcinomu (Riganti et al., 1989; Hitanant et al., 1987). Vhodným modelem pro studium těchto jaterních motolic je syrský zlatý křeček. V experimentu s křečky nakaženými *O. viverrini* byly pozorovány patologické změny žlučovýchodů. V raných stádiích infekce zahrnovaly akutní zánětlivou reakci žlučovýchodů, včetně malých primárních žlučovýchodů, kam se dospělé motolice z důvodu velikosti nemohou dostat, a silnou infiltraci stěn žlučovýchodů lymfocyty. Jak se motolice měnily v dospělce, stimulovaly vznik hyperplázie a adenomatózních formací epitelu žlučového (nezhoubných nádorů žlázového epitelu). Také se objevila granulomatózní odpověď na vajíčka a dospělce (Vajrasthira et al., 1978). Granulomatózní zánět je však u lidí pozorován jen občas (Riganti et al., 1989).

## 2.5 Cholangiokarcinom

Cholangiokarcinom je druhý nejčastější typ jaterního nádoru na světě, tvoří přibližně 10 % až 15 % případů. Vzniká maligním zvrhnutím epitelálních buněk žlučovodu. Má velmi špatnou prognózu, jelikož je velmi agresivní a ochotně metastázuje. Většina pacientů má v době diagnózy již neoperovatelný nádor (viz review Ustundag & Bayraktar, 2008). CCA způsobený infekcí *O. viverrini* nese řadu genetických, epigenetických a transkripčních odlišností oproti CCA vzniklém nezávisle na této motolici. To poukazuje na jedinečný patogenetický proces při vzniku CCA způsobeného *O. viverrini* (Jusakul et al., 2015). V západním světě roste riziko vzniku tohoto nádoru u pacientů se sklerotizující cholangitidou (Ehlken et al., 2017), zatímco v asijských zemích jsou pravděpodobně největším rizikovým faktorem jaterní motolice *O. viverrini* a *C. sinensis*. Jsou tu však i další faktory, které mohou podporovat vznik CCA. Mezi prokázané patří například žlučové kameny. Méně prozkoumané potenciální faktory jsou žloutenkové viry HCV a HBV, cukrovka, cirhóza, obezita, pití alkoholu a kouření tabáku (Tyson & El-Serag, 2011). Dalším faktorem může být pozměněná mikrobiální flóra žlučníku (Plieskatt et al., 2013); jedním z druhů, který byl nalezen v játrech pouze u křečků infikovaných *O. viverrini*, je *Helicobacter pylori* (Chng et al., 2016). Tato bakterie se obvykle vyskytuje v žaludku lidí a byla IARC klasifikována jako karcinogen 1. skupiny (IARC, 1994). *Helicobacter pylori* byl nalezen ve střevě *O. viverrini* a je možné, že oba druhy spolu žijí v obligátním mutualistickém vztahu (Deenonpoe et al., 2015). Zdá se, že koinfekce těchto dvou druhů vede k závažnějším projevům patologických změn a zvyšuje pravděpodobnost vzniku CCA (Dangtakot et al., 2017).

## 2.6 Mechanismy karcinogeneze

### 2.6.1 Mechanické poškození

Epitel žlučovodu může být poškozován přísavkami, kterými se dospělé motolice přichycují na stěny žlučovodu, již v časných fázích infekce. Takto vzniklé léze mohou vést k vývoji vředů, do kterých se mohou dostat vajíčka, což při chronické infekci vede ke granulomatóznímu zánětu a následně k periduktální fibróze žlučovodu (Sripa, 2003). Tyto vředy také umožňují přímý kontakt buněk se žlučovými kyselinami, které mohou přispět k malignímu zvrhnutí (Bernstein et al., 2009). Dlouhodobě se opakující tvorba vředů, zánětu a hojení může vést k defektům v DNA, a tím ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku CCA.



## 2.6.2 Exkrementně-sekrecní produkty

Při interakcích parazita s hostitelem se uplatňují molekuly, které se nachází na povrchu tegumentu nebo jsou parazitem uvolňovány do prostředí - jedná se o takzvané exkrementně-sekrecní produkty (ESP). Tyto slouží k mnohým specializovaným funkcím, například při modulaci imunitního systému hostitele. Mezi ESP patří například polysacharidy, glykolipidy a proteiny (Lightowers & Rickard, 1988). ESP produkované *O. viverrini* (OvESP) jsou buňkami hostitele ochotně přijímány do cytoplasmy, což bylo pozorováno na kultuře buněk lidských cholangiocyty. U těchto buněk ošetřených OvESP dochází ke zvýšené proliferaci a sekreci prozánětlivých cytokinů, avšak přidáním inhibitorů endocytózy je sekrece těchto cytokinů značně potlačena. To naznačuje účast receptorů cytoplasmatické membrány při internalizaci OvESP do buněk (Chaiyadet et al., 2015). Jedním z kandidátů jsou Toll-like receptory (TLR), tedy receptory schopné rozeznávat cizorodé struktury a běžně se vyskytující na povrchu buněk imunitního systému a epitelálních buněk. Při stimulaci lidských cholangiocyty OvESP totiž dochází ke zvýšené expresi TLR, hlavně pak TLR-4 (Ninlawan et al., 2010). Aktivace TLR byla pozorována i u myši nakažených *C. sinensis*, zde dochází ke zvýšení exprese TLR-2 a TLR-4. Proteiny tvořící tyto receptory byly detekovány v cytoplasmě a na membráně endotelálních buněk, fibroblastů a epitelálních buněk žlučového nakažených myši (Yan et al., 2015). Důležitost TLR byla zkoumána na lidských buňkách nádoru tlustého střeva, které nedokáží tvořit TLR-4 (Chaiyadet et al., 2017). Jelikož jejich schopnost přijímat OvESP byla výrazně nižší než u lidských cholangiocyty, dá se předpokládat, že TLR, a zvláště pak TLR-4, jsou zásadní pro endocytózu ESP těchto parazitů.

ESP těchto dvou motolic dokáží přispět ke vzniku nádoru regulací exprese genů hostitelských buněk. Při studii zkoumající vliv exkrementně sekrecních produktů *C. sinensis* (CsESP) na regulaci genů lidských CCA buněk byla zjištěna zvýšená exprese některých genů spojených s karcinogenezí, a naopak snížená exprese některých genů spojených s indukci apoptózy. Ze 23 920 sledovaných genů bylo v přítomnosti CsESP prokázáno ovlivnění exprese u 435 genů. (Pak et al., 2009). OvESP také stimulují změny v expresi, a to zejména těch genů, které se týkají buněčné proliferace. Nejvíce byla zvýšena exprese *pcp*, *eps 8* a *tgfb 1 i 4*, což jsou geny pro signální molekuly dráhy transformujícího růstového faktoru (TGF- $\beta$ ), která se podílí na regulaci buněčného dělení, zároveň jsou tyto molekuly však součástí signální dráhy epidermálního růstového faktoru (EGF). Je tedy pravděpodobné, že OvESP mohou pomocí TGF- $\beta$  nebo EGF signální dráhy ovlivňovat proliferaci fibroblastů. Nadměrná proliferace fibroblastů vede k fibróze, která může vést ke vzniku CCA (Thuwajit, 2006). Další způsob,

jakým ESP mohou ovlivňovat buněčný cyklus, byl demonstrován na lidských embryonálních ledvinových epiteliálních buňkách. Po aplikaci CsESP se zvýšily hladiny cyklinu E, které naznačují přechod z G1 do S-fáze. Zároveň byla zvýšena exprese transkripčního faktoru E2F1, který hraje klíčovou roli v kontrole buněčného cyklu a také reguluje aktivitu některých tumor-supresorových genů (Kim et al., 2008). ESP motolic mohou také ovlivňovat reakce nádorových buněk na vnější stimuly, například u lidských CCA buněk vystavených CsESP byla zjištěna rezistence k parthenolidu. Parthenolid je seskviterpen, který dokáže vyvolat apoptózu v nádorových buňkách. Z tohoto důvodu by měl být brán v potaz vliv ESP parazitů při chemoterapeutické léčbě nádorů u osob infikovaných helminty (Kim et al., 2009).

Komplexní proteomická studie OvESP ukázala, že obsahují několik proteinů spojovaných se vznikem nádorů, jako například granulin, thioredoxin a cystatin (Mulvenna et al., 2010). Mezi nejlépe studované proteiny z této skupiny patří granulin z *O. viverrini* (Ov-GRN-1), který je homologem lidského granulinu. Granuliny jsou skupina proteinů, které fungují jako modulátory růstu buněk a hojení ran. Jsou nejčastěji produkovány epiteliálními a hematopoetickými buňkami (Bateman & Bennett, 1998). Bylo prokázáno, že u jiných typů karcinomů dochází ke zvýšené produkci prekurzoru pro granulin. Ten pozitivně ovlivňuje růst nádoru a jeho invazivitu (Cheung et al., 2004). Ov-GRN-1 je motolicí produkován především v trávicí soustavě a tegumentu. Dále byl objeven na povrchu epiteliálních buněk žlučovodu, a to u křečků experimentálně nakažených *O. viverrini*. Je překvapivé, že byl objeven i ve vedlejších žlučovodech, kde se dospělé motolice nevyskytovaly. Ov-GRN-1 má podobné vlastnosti jako jeho lidský homolog, tedy stimuluje proliferaci myších fibroblastů i lidských CCA buněk a je pravděpodobně hlavním růstovým faktorem zastoupeným v OvESP (Smout et al., 2009). Když byla u dospělých motolic pomocí RNA interference suprimována produkce Ov-GRN-1, došlo k výraznému omezení schopnosti parazitů stimulovat proliferaci lidských cholangiocyty i lidských CCA buněk a zároveň byla snížena jejich životaschopnost (Papatpremsiri et al., 2015), což naznačuje, že Ov-GRN-1 je zřejmě nejdůležitějším růstovým faktorem *O. viverrini* pro hostitelské buňky a může přispívat ke vzniku CCA.

Dalším z exkrečně sekrečních produktů je thioredoxin z *O. viverrini* (Ov-Trx-1). Thioredoxin je oxidoreduktáza, která má mimo buňku povahu růstového faktoru a podporuje růst buněk a tkání (Holmgren & Lu, 2010). Ov-Trx-1 byl detekován ve všech vývojových stádiích motolice a zároveň byl nalezen pouze v infikovaných částech epitelu žlučovodu. Z toho vyplývá, že je důležitý pro parazita v celém jeho cyklu a pravděpodobně ho pomáhá společně s thioredoxin oxidázou chránit před reaktivními radikály kyslíku tvořenými imunitním

systémem (Suttiaprapa et al., 2012). Buňky vystavené Ov-Trx-1 mají sníženou expresi genů, které se podílejí na produkci složek mitogeny aktivované protein-kinázové (MAPK) dráhy. Tato dráha se podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a aktivaci apoptózy buněk, zatímco exprese genů pro inhibitory apoptózy (např. survivin) byla zvýšena. Zároveň se Ov-Trx-1 váže na apoptózu signalizující kinázu 1, která je součástí MAPK dráhy, což naznačuje, že tímhle způsobem by *O. viverrini* mohl inhibovat apoptózu epiteliálních buněk žlučového systému způsobenou oxidativním stresem a přispívat ke vzniku CCA (Matchimakul et al., 2015).

Jedním z identifikovaných mitogenů sekretovaných v rámci OvESP je glutathion S-transferáza z *O. viverrini* (OvGST). GST je pro parazity důležitý enzym, který se podílí na detoxifikaci látek cizorodé povahy. Při aplikaci na myší fibroblasty a na lidské epiteliální buňky žlučového systému došlo ke stimulaci jejich proliferace. Bylo potvrzeno *in vitro*, že se OvGST váže na povrch uvedených buněk, a tím dochází k aktivaci AKT a ERK signálních drah, které spouští proliferaci (Daorueang et al., 2012). Z dalších významných ESP byl například v CsESP objeven těžký řetězec ferritinu (CsFHC). Jedná se o feroxidázový enzym, který je součástí ferritinu. Při působení na lidské Itoovy buňky (jaterní buňky mezenchymálního původu) došlo k tvorbě volných radikálů pomocí NADPH oxidázy, xanthin oxidázy a iNOS. Nárůst počtu volných radikálů podpořil degradaci cytosolického I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibiční jaderný faktor  $\kappa$ B $\alpha$ ), čímž došlo k ukončení inhibice a translokaci podjednotek nukleárního faktoru (NF- $\kappa$ B) do jádra. Jelikož je NF- $\kappa$ B transkripčním faktorem, došlo k regulaci exprese určitých genů. CsFHC zároveň způsobil nárůst exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-6, jejichž tvorba je závislá právě na NF- $\kappa$ B dráze. CsFHC může být důležitý faktor pro vznik chronických zánětů způsobených infekcí *C. sinensis* (Mao et al., 2015), které budou popsány v příští kapitole. Mezi neproteinovou součástí OvESP patří například látky podobné oxysterolu, nalezené u dospělců *O. viverrini* získaných z křečků. Oxysteroly jsou oxidované deriváty cholesterolu. U oxysterolů bylo ukázáno, že mají mutagenní, genotoxické a zároveň prozánětlivé vlastnosti, kterými mohou přispět ke vzniku nádoru (Vale et al., 2013).

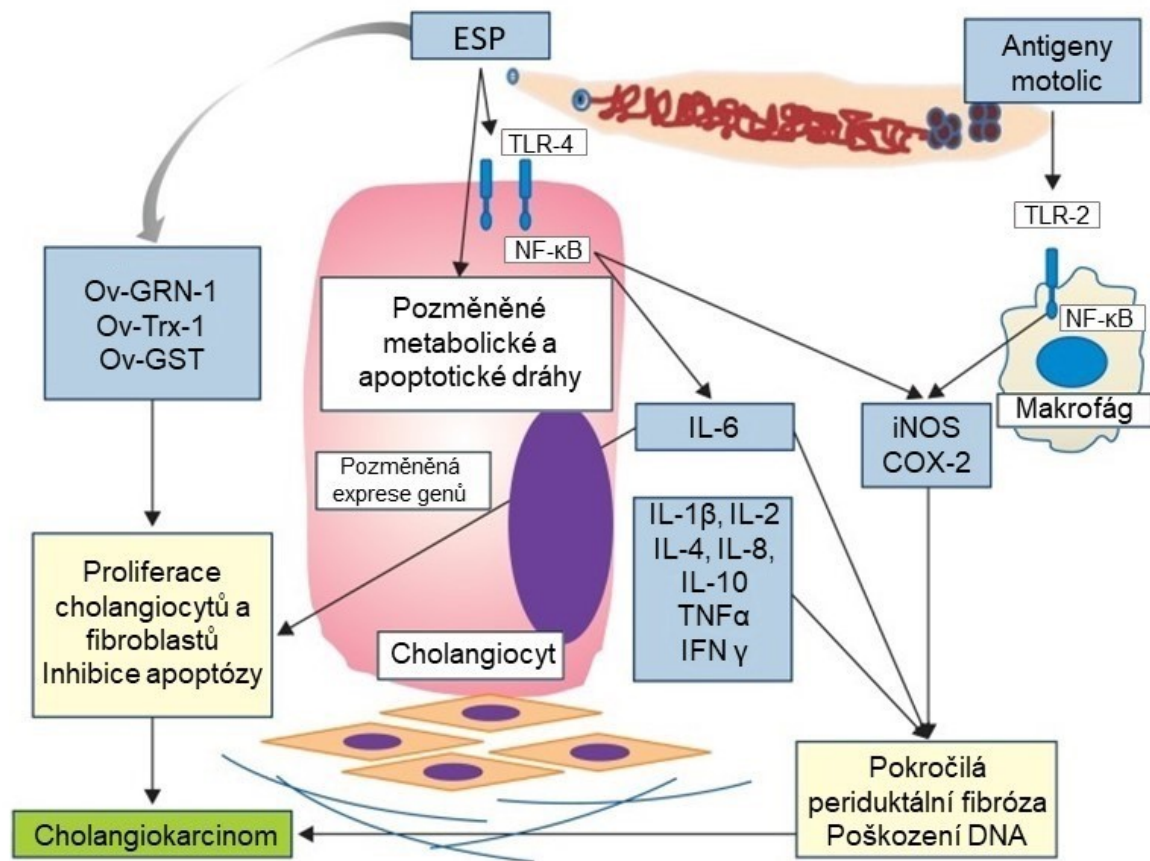
### 2.6.3 Chronické záněty

Imunitní systém vyvinul několik mechanismů, díky kterým dokáže efektivně bojovat s infekcí parazity. Některé druhy helmintů však díky dlouhodobé koevoluci s lidmi vyvinuly vlastní mechanismy, díky kterým dokáží modulovat a unikat imunitní odpovědi. Tento „vyrovnaný“ vztah vede k přežívání parazita v hostiteli, nicméně nevede k závažnějším akutním patologickým projevům ohrožujícím život hostitele, avšak z dlouhodobého hlediska

mohou mít některé imunitní procesy karcinogenní potenciál. Jedním z hlavních procesů přispívajících k tvorbě cholangiokarcinomu je chronický zánět, který je způsobený schopností motolice přežít v hostiteli velmi dlouhou dobu a stimulovat imunitní odpověď. Imunitní reakce je sice namířena proti parazitovi, zároveň však vzniká mnoho vedlejších produktů, které poškozují epitel žlučových cest. Při infekci *O. viverrini* dochází ke spuštění několika imunitních mechanismů, které zahrnují specifickou i nespecifickou imunitní odpověď. U křečků deficitních v T buněčné odpovědi jsou záněty silně omezeny, což naznačuje, že specifická buněčná imunitní odpověď hraje důležitou roli v procesu reakce na ESP parazitů (Flavell & Flavell, 1986). Při infekci *O. viverrini* dochází k tvorbě specifických IgG protilátek. Byla pozorována korelace mezi zvýšeným výskytem IgG a velikostí a disfunkcí žlučového měchýře, je tudíž možné, že protilátky přispívají k patologii žlučového měchýře (Haswell-Elkins et al., 1991). U nakažených křečků se parazitární antigeny objevují v epitelu žlučového měchýře už tři dny po infekci. V pozdějších fázích infekce byly takové antigeny nalezeny jak v tkáních s přímým kontaktem s červy, tak v okolních tkáních obklopujících infekci, včetně primárních žlučových cest, kde motolice normálně nežijí. Dále se vyskytovaly v Kupfferových buňkách, poničených jaterních buňkách a makrofázích. Přítomnost antigenů byla doprovázena silnou infiltrací zánětlivými buňkami, přičemž nejvíce byly zastoupeny mononukleární zánětlivé buňky. To podporuje roli antigenů a specifické buněčné odpovědi v patogenezi při infekci *O. viverrini* (Sripa & Kaewkes, 2000).

Imunitní odpověď proti infekci helminty zahrnuje produkci prozánětlivých cytokinů, které spouští nespecifický zánět. Nejdůležitějším cytokinem produkovaným při infekci *O. viverrini* je interleukin 6 (IL-6). Zvýšená produkce IL-6 byla pozorována v buněčných kulturách exponovaných OvESP i ScESP (Chaiyadet et al., 2015; Nam et al., 2012). Vysoké hladiny IL-6 u lidí infikovaných *O. viverrini* jsou spojovány s rozvinutou periduktální fibrózou a CCA. Při detekování vysokých hladin IL-6 v séru roste pravděpodobnost vzniku periduktální fibrózy 19krát a CCA dokonce 150krát oproti lidem bez IL-6 v séru (Sripa et al., 2012). Navození zánětu není jediný způsob, kterým IL-6 může přispět ke karcinogenezi, dokáže totiž aktivovat expresi lidského progranulinu, čímž může podpořit proliferaci CCA (Frampton et al., 2012). Další prozánětlivé cytokiny, které jsou produkovány při infekcích *O. viverrini* a *C. sinensis*, jsou IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, faktor nádorové nekrózy (TNF $\alpha$ ) a interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), zároveň však dochází i ke zvýšení produkce protizánětlivého IL-10 (Yan et al., 2015; Maeng et al., 2016).

Zánětlivý proces je spuštěn, když vlivem působení OvESP na lidské cholangiocyty dojde k aktivaci NF- $\kappa$ B a expresi a sekreci IL-6 a IL-8. Aktivací NF- $\kappa$ B dochází ke stimulaci cyklooxygenázy 2 (COX-2), což je enzym napomáhající rozvoji zánětu a produkci indukovatelné NO-syntázy (iNOS) (Ninlawan et al. 2010). U *C. sinensis* byl pozorován podobný postup, tedy působením CsESP na lidské CCA buňky se spouští tvorba volných radikálů pomocí NADPH oxidázy, xanthin oxidázy a iNOS. Nárůst počtu volných radikálů způsobil degradaci cytosolického I $\kappa$ B $\alpha$  a translokaci NF- $\kappa$ B podjednotek do jádra, a tím byla zároveň spuštěna NF- $\kappa$ B dependentní exprese prozánětlivých IL-1 $\beta$  a IL-6 (Nam et al., 2012). Lidské CCA buňky vystavené CsESP měly také aktivovanou expresi TLR a tvorba volných radikálů byla značně snížena při expozici protilátkám neutralizujícím TLR1-4, což napovídá, že minimálně TLR1 až 4 se podílí na stimulaci imunitní odpovědi hostitele (Bahk & Pak, 2016). U myších makrofágů stimulovaných OvESP byla za použití průtokové cytometrie a imunocytochemické detekce pozorována exprese TLR-2. Nebyla však pozorována zvýšená exprese TLR-4 jako u lidských cholangiocyty stimulovaných OvESP. Předpokládá se, že exprese TLR-2 ovlivňuje expresi a translokaci NF- $\kappa$ B do jádra, vedoucí k expresi iNOS a COX-2 (Pinlaor et al., 2005). Exprese iNOS je důležitým obranným mechanismem imunitního systému proti parazitům, avšak nadměrná exprese vede k nadprodukcí oxidu dusnatého (NO) a vzniku oxidativního stresu. Při tomto procesu dochází k tvorbě reaktivních dusíkatých sloučenin, jako například NO $_x$  a peroxynitritu, přičemž tyto sloučeniny pak poškozují DNA a inhibují proteiny opravující DNA. Vznikají DNA adukty, jako například 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxodG) a 8-nitroguanin, které jsou spojovány s karcinogenezí (Halliwell, 1999; Jaiswal et al., 2000). U křečků infikovaných *O. viverrini* byl potvrzen vznik 8-oxodG a 8-nitroguaninu indukovaných expresí iNOS v jádrech prozánětlivých buněk a epitelu žlučovodů. Dále byla aktivována exprese hem oxygenázy-1 (HO-1) v Kupfferových buňkách a žlučovodech, což mělo za následek ukládání železa okolo žlučovodů, a to může být jeden z dalších faktorů způsobujících oxidativní stres vedoucí k poškození DNA epitelálních buněk žlučovodů (Pinlaor et al., 2004).



**Obr. 1.** Schéma předpokládáných procesů vedoucích ke vzniku CCA při infekci opisthorchidními motolicemi. Upraveno dle Prueksapanich et al. (2018).

### 3. Schistosomy

#### 3.1 Historie

Spojitosť mezi infekcí motolicí druhu *Schistosoma haematobium* a karcinomem močového měchýře byla poprvé popsána počátkem 20. století v Egyptě (Ferguson, 1911). Studie ze 70. let ze Zambie ukazovaly, že 65 % pacientů s karcinomem močového měchýře mělo zároveň urogenitální schistosomózu (UGS) a 75 % těchto nádorů tvořil spinocelulární (vzniklý na podkladě dlaždicového epitelu) karcinom (SCC). (Bhagwandeem 1976). V roce 1994 pak byla *S. haematobium* klasifikována IARC jako karcinogen 1. skupiny (IARC 1994). Jednotlivé případy poukazují i na možné spojení UGS s jinými druhy nádorů, jako například adenokarcinomem prostaty nebo spinocelulárním karcinomem děložního hrdla (Basílio-de-Oliveira et al., 2002; Helling-Giese et al., 1996).

### 3.2 Biologie a životní cyklus

Životní cyklus *S. haematobium* zahrnuje jednoho meziphostitele a konečným hostitelem je člověk či jiní primáti. Z vajíček se líhnou miracidia poté, co dojde ke zředění moči vodou. Miracidia se volně pohybují a penetrují plže rodu *Bulinus*. V plžích dochází k transformaci v mateřskou sporocystu, která tvoří mnoho dceřiných sporocyst, a vývoj v plži je ukončen cercáriemi. Cercárie jsou volně pohyblivé a aktivně si hledají definitivního hostitele, do kterého penetrují kůží. Po odvržení ocásku se mění na schistosomulum, které migruje cévním řečištěm až do žilního pletence kolem urogenitálního traktu, kde dospívá. Dospělci jsou odděleného pohlaví a po spáření klade samička velké množství vajíček, která se stěnou cév dostávají do lumenu močového měchýře (Ross & Yuesheng, 2016).

### 3.3 Rozšíření a prevalence

*Schistosoma haematobium* se vyskytuje v zemích Blízkého východu a na většině afrického kontinentu. Předpokládá se, že až 240 milionů lidí je infikováno lidskými druhy schistosom a 90 % těchto případů je hlášeno ze subsaharské Afriky; z tohoto čísla připadá přibližně 112 milionů případů na *S. haematobium*. Přibližně 70 milionů trpí hematurii a 18 milionů patologickými změnami močového měchýře (van der Werf et al., 2003; Steinmann et al., 2006). Na 100 tisíc nakažených *S. haematobium* připadají přibližně 3-4 případy SCC (Shiff et al., 2006).

### 3.4 Patogenita

Při infekci *S. haematobium* dochází k depozici vajíček především ve stěně a cévách močového měchýře, může být však postižen celý urogenitální systém. Kolem vajíček se tvoří granulomatózní zánět a dochází k aktivaci lymfocytů, polymorfonukleárních leukocytů a eozinofilů. Vzniká fibróza a svalová hypertrofie, v pozdější fázi dochází k tvorbě polypů (vyklenutí sliznice), které obsahují vajíčka. Tyto polypy mohou prasknout a poté dochází k hematurii (krev v moči). Při pitvách pacientů infikovaných *S. haematobium* byla pozorována hyperplázie močového epitelu u 38 %, metaplázie u 31 % a dysplázie u 27 % nakažených (Smith & Christie, 1986).

### 3.5 Karcinom močového měchýře

Ročně je diagnostikováno přibližně 400 000 případů tohoto nádorového onemocnění a 100 000 lidí mu podlehne (Ferlay et al., 2010). Více než 90 % případů ve vyspělém světě spadá pod uroteliální karcinom (UCC), zatímco v oblastech s výskytem UGS převládá spinocelulární karcinom. UCC vzniká z buněk přechodného epitelu močového měchýře a hlavním faktorem pro vznik tohoto karcinomu je kouření tabáku, zatímco pro SCC vznikajícího z buněk dlaždicového epitelu jsou hlavními předpoklady pro vznik nádoru chronický zánět a nákaza *S. haematobium*. Celkově je SCC agresivnější a má horší prognózu. U pacientů s UGS dochází ke vzniku karcinomu v nižším věku (47 let), oproti pacientům bez UGS (54 let) (El-Bolkainy et al., 1981). Na rozdílný způsob vzniku těchto karcinomů ukazují změny v expresi genů, například exprese uroplakinu II, což je membránový protein specifický pro karcinomy močového měchýře, je aktivována pouze u UCC, ale ne u SCC (Wu et al., 1998). V mnoha oblastech s endemickým výskytem UGS je SCC nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a druhým u žen (po karcinomu prsu) a představuje až 30 % všech karcinomů. V některých oblastech však dochází ke změně, neboť bylo například dokázáno, že za posledních 26 let se výrazně snížil podíl SCC v Egyptě díky významnému snížení prevalence UGS. Šestinásobně se zvýšil počet UCC oproti roku 1980 a Egypt se začal přibližovat situaci v západním světě (Felix et al., 2008).

### 3.6 Mechanismy karcinogeneze

Tak jako u CCA způsobeného infekcí *O. viverrini*/*C. sinensis* se předpokládá, že na vzniku SCC asociovaného s nákazou *S. haematobium* se podílí několik různých mechanismů. Jsou však mnohem méně prozkoumány, neboť dlouhou dobu nebyl k dispozici adekvátně fungující laboratorní zvířecí model. Až nedávno byl zaveden myší model, který celkem věrně odráží alespoň některé procesy probíhající při lidské UGS (Fu et al., 2012). Dřívější studie předpokládaly, že k zahájení procesu karcinogeneze je potřeba nitrosaminů tvořených například při bakteriálních infekcích nebo působením jiných karcinogenů, a tedy infekce *S. haematobium* pouze urychluje tvorbu nádoru pomocí indukce proliferace. Toto podporují pokusy prováděné na pavíanech. U pavíánů, kteří byli nakaženi *S. haematobium* a zároveň jim byl aplikován karcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin (BBN), se vyvinul nádor močového měchýře, zatímco u pavíánů infikovaných samotnou *S. haematobium* byly nalezeny pouze záněty močového měchýře a polypy (Hicks et al., 1980). V současné době je již prokázáno, že infekce *S. haematobium* je sama o sobě karcinogenní, avšak nitrosaminové sloučeniny



jsou také důležitým faktorem. Koncentrace nitrosaminových sloučenin v moči je výrazně vyšší u pacientů s UGS/UGS s rozvinutým SCC než u zdravých lidí, což naznačuje, že tvorba nitrosaminových sloučenin v močových měchýřích pacientů s UGS přispívá ke vzniku SCC (Tricker et al., 1989).

Hlavním faktorem vzniku SCC při UGS je pravděpodobně neustálé vylučování vajíček dospělými motolicemi. Vajíčka poté prochází tkání močového měchýře a dochází k neustálému poškozování tkáně a vzniku granulomatózních zánětů, které po několika letech mohou vést ke vzniku fibrózy a SCC (Burke et al., 2009). Antigeny přítomné ve vajíčkách mohou mít také karcinogenní efekty. Při inkubaci uroteliálních buněk s rozpustnými antigeny vajíček *S. haematobium* bylo dokázáno, že již 6,25 µg/ml těchto antigenů stačí ke spuštění proliferace, redukcí apoptózy a zvýšení oxidativního stresu (Botelho et al., 2013a). Při analýze transkriptomu buněk epitelu močového měchýře myši 5 týdnů po injekci vajíček *S. haematobium* (*in vivo*) byla zjištěna změna transkripce několika genů signálních drah spojených s karcinogenezí, mezi nimi například genů pro vaskulární endoteliální růstový faktor a onkogenů. Také byl pozorován pokles exprese genů důležitých pro diferenciaci buněk, což může vést k dediferenciaci buněk, která může být spojena se vznikem nádoru (Khandelwal et al., 2009; Ray et al., 2012).

Podobně jako u opisthorchidních motolic se na karcinogenezi při UGS podílí antigeny a exkrečně sekreční produkty různých vývojových stadií motolice. Pro studium vlivu antigenů na karcinogenezi byl použit celkový antigen *S. haematobium* (ShA) získaný z dospělých motolic. Pro zkoumání účinků ShA byla použita kultura vaječnickových buněk křečka čínského (CHO), kdy u těchto buněk byly po aplikaci ShA pozorovány změny jako zvýšená proliferace, častější přechod do S-fáze a potlačení apoptózy. Za potlačení apoptózy je nejspíše zodpovědná zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2, naopak byla snížena exprese tumorového supresoru p27, což pravděpodobně zapříčinilo nekontrolovanou proliferaci buněk. Invazivita a schopnost migrace buněk byla rovněž pozitivně ovlivněna (Botelho et al., 2009a). Karcinogenní potenciál ShA byl demonstrován na pokusu, při kterém byly CHO buňky vystavené ShA injikovány do podkoží pěti holých imunodeficitních myši. U všech pěti myši došlo ke vzniku sarkomů, což jsou zhoubné nádory pojivové tkáně (Botelho et al., 2009b). Autoři také zkoumali vliv ShA na buňky močového měchýře. Při intravezikulárním podání ShA do CD-1 myši se u 70 % zvířat 40 dní po aplikaci objevila dysplázie uroteliálních buněk (Botelho et al., 2011). Analýza transkriptomu těchto dysplazických uroteliálních buněk odhalila mutace v KRAS genu, který je součástí rodiny ras genů kódujících proteiny aktivní v různých signálních drahách

a přibližně 30 % lidských karcinomů má mutaci v tomto genu (Adjeji et al., 2001). Při bodových mutacích dochází k tvorbě trvale aktivovaného proteinu, což vyúsťuje v neustálou signalizaci a nekontrolovanou proliferaci buněk. Je tedy pravděpodobné, že ShA vyvolává mutace KRAS genu, a tím přispívá ke tvorbě SCC (Botelho et al., 2013b).

Jednou skupinou látek produkovaných *S. haematobium*, které by se mohly podílet na vzniku SCC, jsou metabolity příbuzné estradiolu. U lidí s UGS byly pozorovány zvýšené hladiny estradiolu, hladiny ostatních hormonů však zvýšeny nebyly. To vedlo k myšlence, že takový estradiol nevznikl klasickou cestou, ale je produkován *S. haematobium*. Produkce metabolitů podobných takovým estrogenům byla skutečně dokázána (Botelho et al., 2009c). Jednou skupinou těchto metabolitů, které byly nalezeny v moči pacientů s UGS, jsou katechol estrogen chinony (CEQ). Oxidované CEQ, jako například katechol estrogen-3,4-chinon, jsou karcinogenní, depurují DNA a dochází ke vzniku aduktů (změně nukleotidů) (Cavaliere & Rogan, 2011). Takto vzniklé DNA adukty jsou spojovány se vznikem několika typů lidských karcinomů (Zahid et al., 2006), což koreluje s nálezy CEQ-DNA aduktů v moči pacientů s UGS a UGS+SCC, které se u kontrolních skupin nevyskytují (Gouveia et al., 2015).

Podobně jako u jaterních motolic dochází při infekci *S. haematobium* ke vzniku chronického zánětu a aktivaci imunitní odpovědi, což může přispívat ke vzniku SCC. U pacientů s diagnostikovanou UGS dochází ke zvýšení hladiny prozánětlivého IL-6 (Antony et al., 2015) a TNF $\alpha$  produkovaného monocyty (Raziuddin et al., 1993). U pacientů s SCC byly v porovnání s karcinomy jiného než schistosomálního původu nalezeny zvýšené hladiny 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG); tento DNA adukt spolu s aktivací exprese opravných endonukleáz poukazuje na zvýšenou hladinu oxidativního stresu, což koreluje s pozorovanou zvýšenou expresí iNOS (Salim et al., 2008). Zvýšená hladina oxidativního stresu je také spojována s genetickou nestabilitou chromozomů v buňkách močového měchýře, což může vést k malignímu zvrhnutí těchto buněk (Rosin et al., 1994). Proteomická analýza moči pacientů s UGS také naznačuje, že na vzniku CCA způsobeného *S. haematobium* se podílí oxidativní stres (Bernardo et al., 2016).

## 4. Potenciálně karcinogenní helminti

### 4.1 Helminti člověka

Ačkoliv pouze u tří dříve popsaných helmintů (viz kap. 2. a 3.) byla potvrzena spojitost mezi infekcí a tvorbou nádorů u člověka, spekuluje se, že některé další druhy by mohly mít také karcinogenní efekt na hostitele. Nejpravděpodobnější spojitost lze najít u *Schistosoma japonicum*, která byla IARC klasifikována jako karcinogen skupiny B2, tedy jako možný karcinogen pro člověka (IARC, 2012). Epidemiologické a klinické studie z Číny naznačují, že infekce *S. japonicum* může mít souvislost s karcinomem tlustého střeva a konečníku (Qiu et al., 2005), jednotlivé importované případy byly popsány i v Japonsku (Matsuda et al., 1999). Není příliš prozkoumáno, jakým způsobem by tato motolice mohla přispívat ke vzniku nádorů. U myši nakažených *S. japonicum* byla pozorována snížená aktivita cytochromů P-450, přičemž je známo, že tyto enzymy jsou důležité pro metabolizování karcinogenů. Sníženou aktivitou těchto enzymů docházelo k pomalejšímu odbourávání podávaných karcinogenů, což může usnadňovat vznik nádorů (Matsuoka et al., 1989). Pacienti s karcinomem konečníku mají jiné mutace v tumor supresorovém genu p53 než lidé s tímto karcinomem a zároveň infekcí *S. japonicum*, což naznačuje specifický způsob vzniku nádoru při infekci *S. japonicum* (Zhang et al., 1998). Rozpustný antigen z vajíček (SEA) *S. japonicum* má, podobně jako SEA *S. haematobium*, schopnost aktivovat imunitní systém a mohl by tak stimulovat karcinogenezi způsobenou chronickým zánětem (Ishii et al., 1989).

*Schistosoma mansoni* je poslední ze schistosom, u kterých je popsána souvislost s tvorbou nádorů. Byly však popsány pouze jednotlivé případy infekce *S. mansoni* ve spojení s adenokarcinomem prostaty, karcinomem tlustého střeva a karcinomem močového měchýře (Basílio-de-Oliveira et al., 2002; Salim et al., 2010; Kiremit et al., 2015), které mohou být shodou náhod. Podobně jako u *S. japonicum* byla popsána schopnost modulace imunitní odpovědi pomocí rozpustného antigenu vajíček *S. mansoni* (Cheever et al., 2002). Změny v expresi tumor supresorového genu p53 (Madbouly et al., 2007) a apoptózu regulujícího genu bcl-2 (Zalata et al., 2005) u pacientů s karcinomem tlustého střeva a infekcí *S. mansoni* naznačují, že změnou exprese onkogenů a aktivací chronického zánětu by *S. mansoni* mohla přispět ke vzniku nádorů.

Díky blízké příbuznosti s *O. viverrini* se spekuluje o schopnosti motolice *Opisthorchis felinus* také přispívat ke vzniku cholangiokarcinomu. Souvislost mezi infekcí *O. felinus* a CCA je ale málo prostudována. Některé studie však ukazují, že antigeny *O. felinus* dokáží

stimulovat imunitní odpověď (Saltykova et al., 2014). Navíc byla u křečků nakažených *O. felineus* potvrzena tvorba hyperplázií a dysplázií žlučových a když byli tito křečci zároveň vystaveni dimethylnitrosaminu, došlo u nich následně k tvorbě CCA (Maksimova et al., 2015). Tyto nálezy naznačují, že by *O. felineus*, stejně jako *O. viverrini* a *C. sinensis*, mohl přispívat k tvorbě nádorů.

Potenciální riziko pro vznik nádorových onemocnění představuje i neurocysticercóza (NCC) způsobená larválními stadii (cysticerky) tasemnice *Taenia solium*. NCC je spojována se vznikem mozkového gliomu (nádor gliových buněk), u kterého se předpokládá, že velké množství gliových buněk obklopujících kalcifikované cysticerky a modulace imunitní odpovědi *T. solium* může vést k malignímu zvrnutí (Del Brutto et al., 1997). Je zajímavé, že u pacientů s NCC dochází k poškození DNA periferních lymfocytů, které nejsou v kontaktu s larvami (Herrera et al., 2000), přičemž zvýšený počet mutací byl pozorován hlavně na chromozómech 7, 11 a 14. Chromozómy 7 a 14 kódují geny pro receptory na T a B lymfocytech, takže je možné, že vlivem dlouhodobého působení antigenů parazita dochází k neustálé stimulaci lymfocytů, což vede ke zvýšenému počtu translokací na těchto chromozómech (Herrera et al., 2001). K přeskupování těchto chromozomů dochází i ve zdravých jedincích (Limpens et al., 1995), avšak zvýšená frekvence translokací a nestabilita genomu je spojována se vznikem krevních nádorových onemocnění (Bonassi et al., 2000). Antigeny *T. solium* produkované během NCC tedy dokáží ovlivňovat stabilitu chromozomů periferních lymfocytů, čímž by mohly přispívat ke vzniku nádorových onemocnění.

Několik případů pacientů s karcinomem tlustého střeva trpělo zároveň infekcí *Strongyloides stercoralis*, avšak nebyla potvrzena kauzalita mezi těmito onemocněními (Catalano et al., 2017; Tomaino et al., 2015). U jednoho případu byla potvrzena přítomnost *S. stercoralis* přímo v nádorové tkáni adenokarcinomu žaludku (Seo et al., 2015), a proto je tedy hypoteticky možné, že stimulací imunitní odpovědi by tento parazit mohl přispívat ke vzniku nádorů. Epidemiologická studie z Japonska sice poukazuje na větší pravděpodobnost vzniku karcinomu při infekci *S. stercoralis*, avšak nebyla nalezena žádná signifikantní souvislost s konkrétním typem karcinomu (Tanaka et al., 2016). Existuje také možná souvislost mezi koinfekcí *S. stercoralis* a HTLV-1 (lidský T-lymfotropní virus typu 1) a vznikem nádorových onemocnění, jelikož tento retrovirus způsobuje lymfom T-buněk a byl IARC klasifikován jako karcinogen 1. skupiny (IARC, 2012), přičemž pacienti infikovaní *S. stercoralis* měli výrazně vyšší virovou zátěž HTLV-1 (Gabet et al., 2000), což by mohlo přispívat ke vzniku karcinomu.

## 4.2 Helminti dalších obratlovců

Role helmintů, u kterých není člověk přirozeným hostitelem, je při vzniku nádorových onemocnění prozkoumána jen okrajově. Potenciálně karcinogenní může být například *Fasciola gigantica*, kdy je tento parazit přežvýkavců spojován s výskytem leiomyomů (nádory hladké svaloviny) u dobytka. Tuři infikovaní *F. gigantica* měli snížené hladiny glutathion peroxidázy, která je důležitá pro odbourávání volných radikálů ovlivňujících vznik nádorů (viz kap. 2.6.3) (Bahrami et al., 2014), a zároveň u ovcí nakažených příbuznou motolicí *Fasciola hepatica* byla detekována zvýšená hladina volných radikálů (Saleh et al., 2008). Modulaci imunitního systému a následným vlivem oxidativního stresu by *F. gigantica* mohla přispívat ke vzniku leiomyomů u dobytka.

*Platynosomum fastosum* je jaterní motolice kočkovitých šelem a možná spojitost mezi infekcí touto motolicí a vznikem cholangiokarcinomu byla popsána již v roce 1981 (Santos et al., 1981). Studie provedené v pozdějších letech potvrdily tento předpoklad, neboť při pitvách koček infikovaných *P. fastosum* byly nalezeny různé stupně patologických změn vedoucích ke vzniku CCA, od periduktální fibrózy, hyperplázie a dysplázie epitelu žlučového až k plně vyvinutým nádorům (Andrade et al., 2012).

## 5. Totipotentní buňky helmintů jako příčina nádorových onemocnění

Totipotentní buňky lze ve významné míře nalézt u helmintů, při jejichž vývoji je důležité asexuální rozmnožování či reparace poškozených tkání. Za specifických podmínek však může dojít k jejich uplatnění se jako původců nádorových onemocnění hostitelských organismů. U pacienta nakaženého HIV (virus lidského imunodeficitu) byly nalezeny nádory v lymfatických uzlinách a plicích, které byly tvořeny nediferencovanými buňkami tasemnice *Hymenolepis nana*. Tyto buňky měly morfologické znaky a genetické mutace, které jsou typické pro buňky karcinomů; podobné morfologické znaky byly nalezeny i u totipotentních zárodečných buněk larev tasemnice *Echinococcus multilocularis* sloužících k asexuálnímu rozmnožování tohoto parazita. Larvy tohoto helminta tvoří cysty v játrech, které se díky totipotentním buňkám chovají jako nádory, a jelikož jsou tyto mateřské cysty schopné tvořit dceřiné cysty i na svém povrchu, může docházet k metastázování do dalších tkání hostitele (Koziol et al., 2014). Jakým způsobem došlo ke vzniku nádorů tvořených *H. nana* není objasněné, ale je možné, že vlivem imunodeficitu hostitele došlo k nekontrolované proliferaci a nashromáždění mutací v totipotentních buňkách parazita, které vedly k malignímu zvrhnutí buněk a následnému

metastázování do dalších tkání (Muehlenbachs et al., 2015). Toto je první případ karcinomu člověka vzniklého z buněk odvozených od helminta, avšak některé podobné změny byly pozorovány u imunodeficitních myši nakažených *H. nana*. V těchto myších došlo ke vzniku abnormálně zvětšených cysticerkoidů bez skolexu, které velmi četně metastázovaly po těle hostitele (Lucas et al., 1980). Je také známo několik lidských případů, kdy došlo k diseminaci tasemnice *Taenia crassiceps* na nezvyklá místa po těle hostitele, přičemž se většinou jedná o pacienty s nějakou formou imunodeficitu (François et al., 1998; Goesseringer et al., 2011).

## 6. Helminti a ochrana před nádory

Schopnost helmintů podílet se na vzniku nádorů je dobře prokázaná, zdá se však, že někteří helminti dokáží i přesný opak. Jedním z nich může být tasemnice *Echinococcus granulosus*, u které bylo při epidemiologické studii v Turecku zjištěno, že u pacientů s nádorovými onemocněními se skoro nikdy nevyskytuje larvální (cystická) echinokokóza, i když prevalence v populaci je 1-2% (Akgül et al., 2003). Jedním ze způsobů, jak by mohlo díky helmintům docházet k ochraně před nádory, je výskyt podobných (s protilátkami zkříženě reagujících) antigenů. Na povrchu nádorových buněk lze najít O-glykosylovaný Tn antigen (Moreau et al., 1959), přičemž tento antigen je exprimován u většiny lidských karcinomů a je jednou z nejspecifičtějších struktur spojených s lidskými nádorovými buňkami (Hakomori, 1989). Stejný O-glykosylovaný Tn antigen je produkován *E. granulosus* a byl objeven v larvách i dospělých, a dále také v sérech pacientů s hydatidózními cystami (Alvarez Errico et al., 2001). Podobné antigeny vyskytující se na povrchu nádorových buněk byly objeveny i u dalších helmintů, například TF antigen (onkofetální Thomsen-Freidenreich antigen) u *S. mansoni* (Thors et al., 2006) nebo Tk antigen ("zkrácený" sacharidový antigen) u *Taenia hydatigena*, *Mesocestoides vogae* a *Taenia crassiceps* (Ubillos et al., 2007). Jelikož jsou tyto antigeny vysoce imunogenní, je pravděpodobné, že dochází k efektivní imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám díky zkřížené reaktivitě protilátek (Osinaga, 2007). Tato myšlenka byla podpořena pokusem, při kterém séra myši nakažených *S. mansoni* reagují s lidskými buňkami uroteliálního a žaludečního karcinomu (Thors et al., 2006). Vliv *E. granulosus* na nádorové buňky byl zkoumán *in vitro* pomocí protoskolexů z hydatidózních cyst, což jsou zárodky dospělých tasemnic. Při kontaktu buněk fibrosarkomu (nádor vazivových tkání) a ledvinových fibroblastů mladých křečků s protoskolexy došlo u obou typů buněk k zastavení proliferace a zvýšila se apoptóza buněk fibrosarkomu (Darani et al., 2012). Podobná situace byla pozorována *in vivo* u myši s fibrosarkomy, kterým byly aplikovány antigeny vajíček škrkavky *Toxocara*

*canis* - u těchto hostitelů také došlo k inhibici růstu nádoru (Darani et al., 2009). Je tedy pravděpodobné, že *E. granulosus* a některé další druhy helmintů mohou díky zkřížené reakci protilátek vůči podobným/identickým antigenům stimulovat navazující imunitní odpověď hostitele a tím přispět k potlačení nádorových onemocnění.

## 7. Závěr

V této práci jsou shrnuty dostupné poznatky o helmintech jako původcích nádorových onemocnění a mechanismech, které se mohou uplatňovat při karcinogenezi indukované helminty. Poměrně dlouhou dobu bylo známo, že helminti druhu *O. viverrini*, *C. sinensis* a *S. haematobium* způsobují vznik karcinomů u člověka. Předpokládalo se, že hlavními faktory přispívajícími k jejich vzniku jsou chronické záněty a látky produkované parazity, avšak až v posledních letech byly díky proteomickým a dalším moderním metodám objeveny konkrétní molekuly, které pomáhají alespoň částečně objasnit procesy vedoucí ke vzniku nádorů při infekci helminty. Byl potvrzen vliv exkrečně-sekrečních produktů helmintů na zvýšenou proliferaci a potlačení apoptózy buněk, které mohou mít za následek zvýšenou pravděpodobnost vzniku nádorových onemocnění. Některé ESP/antigeny helmintů aktivují imunitní odpověď hostitele, což vede ke vzniku chronického zánětu. Aktivované imunitní procesy namířené proti infekci helminty, například produkce NO a vznik volných radikálů pomocí iNOS, však mohou vést k poškození DNA, a tím přispívat ke karcinogenezi. Některé druhy helmintů však mohou mít i opačný efekt a jsou schopny pomocí antigenů vyvolat imunitní odpověď hostitele zaměřenou na nádory, což může vést k ochraně proti vzniku, či dokonce k regresi již existujících nádorů. Tato vlastnost antigenů helmintů by mohla mít potenciální využití v protinádorových léčbách a vývinu vakcín proti karcinomům. Specifickým případem jsou totipotentní zárodečné buňky helmintů; tyto buňky vykazují abnormální chování v imunodeficitních hostitelích, které může vyústit až v transformaci na nádorové buňky. Problematice totipotentních buněk tasemnic bych se chtěl věnovat i rámci svého magisterského studia a diplomové práce. Ačkoliv část procesů vedoucích ke vzniku nádorů způsobených helminty je již popsána, přesné mechanismy stále nejsou známy, jelikož karcinogeneze indukovaná infekcí je složitá a relativně pomalý proces, který je ovlivňován mnohými vnitřními a vnějšími faktory. Objasnění této problematiky, mohlo být přínosné pro výzkum vzniku a léčby nádorových onemocnění, ale vyžaduje spolupráci parazitologů s jinými biomedicínskými obory, například s buněčnými a nádorovými biology.

## 8. Seznam zkratk

- BBN** – N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamin
- CCA** – cholangiokarcinom
- CEQ** – katechol estrogen chinony
- CsESP** – exkrecečně sekreční produkty *Clonorchis sinensis*
- CsFHC** – těžký řetězec ferritinu *Clonorchis sinensis*
- COX-2** – cyklooxygenáza 2
- EGF** – epidermální růstový faktor
- HO-1** – hem oxygenáza 1
- HTLV-1** – lidský T-lymfotropní virus typu 1
- IARC** – Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
- IFN  $\gamma$**  – interferon gama
- IgG** – imunoglobulin G
- IL** – interleukin
- iNOS** – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
- KRAS** – homolog Kirsten rat sarcoma virového onkogenu
- MAPK** – mitogeny aktivovaná protein-kináza
- NCC** – neurocysticerkóza
- NF- $\kappa$ B** – nukleární faktor kappa B
- OvESP** – exkrecečně-sekreční produkty *Opisthorchis viverrini*
- Ov-GRN-1** – granulin *Opisthorchis viverrini*
- OvGST** – glutathion S-transferáza *Opisthorchis viverrini*
- Ov-Trx-1** – thioredoxin *Opisthorchis viverrini*
- SCC** – spinocelulární karcinom
- SEA** – rozpustný antigen z vajíček
- ShA** – celkový antigen *Schistosoma haematobium*
- TGF- $\beta$**  – transformující růstový faktor beta
- TLR** – Toll-like receptor
- TNF $\alpha$**  – faktor nádorové nekrózy alfa
- UCC** – uroteliální karcinom
- UGS** – urogenitální schistosomóza
- 8-oxodG** – 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin



## 9. Použitá literatura

- Adjei A. A.** (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 1062–1074.
- Akgül H., Tez M., Ünal A. E., Keşkek M., Sayek I., Özçelik T.** (2003). *Echinococcus* against cancer: Why not? *Cancer*, 98, 1998-1999.
- Alvarez Errico D., Medeiros A., Míguez M., Casaravilla C., Malgor R., Carmona C., Nieto A., Osinaga E., Errico A., Casaravilla M.** (2001). Characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Experimental Parasitology*, 98, 100–109.
- Andrade R. L. F. S., Dantas A. F. M., Pimentel L. A., Galiza G. J. N., Carvalho F. K. L., Costa V. M. M., Riet-Correa F.** (2012). *Platynosomum fastosum*-induced cholangiocarcinomas in cats. *Veterinary Parasitology*, 190, 277–280.
- Andrews R. H., Sithithaworn P., Petney T. N.** (2008). *Opisthorchis viverrini*: an underestimated parasite in world health. *Trends in Parasitology*, 24, 497–501.
- Antony J. S., Ojurongbe O., Meyer C. G., Thangaraj K., Mishra A., Kremsner P. G., Velavan T. P.** (2015). Correlation of interleukin-6 levels and lectins during *Schistosoma haematobium* infection. *Cytokine*, 76, 152–155.
- Bahk Y. Y., Pak J. H.** (2016). Toll-like receptor-mediated free radical generation in *Clonorchis sinensis* excretory-secretory product-treated cholangiocarcinoma cells. *Korean Journal of Parasitology*, 54, 679–684.
- Bahrami S., Esmailzadeh S., Oryan A.** (2014). Role of oxidative stress in concomitant occurrence of *Fasciola gigantica* and leiomyoma in cattle. *Veterinary Parasitology*, 203, 43–50.
- Basilio-de-Oliveira C. A., Aquino A., Simon E. F., Eyer-Silva W. A.** (2002). Concomitant prostatic schistosomiasis and adenocarcinoma: case report and review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 6, 45–9.
- Bateman A., Bennett H. P.** (1998). Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *The Journal of Endocrinology*, 158, 145–51.

- Bernardo C., Cunha M. C., Santos J. H., da Costa J. M. C., Brindley P. J., Lopes C., Amado F., Ferreira R., Vitorino R., Santos L. L.** (2016). Insight into the molecular basis of *Schistosoma haematobium*-induced bladder cancer through urine proteomics. *Tumor Biology*, 37, 11279–11287.
- Bernstein H., Bernstein C., Payne C. M., Dvorak K.** (2009). Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 15, 3329–40.
- Bhagwandeem S. B.** (1976). Schistosomiasis and carcinoma of the bladder in Zambia. *South African Medical Journal ( Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Geneeskunde)*, 50, 1616–1620.
- Bonassi S., Hagmar L., Strömberg U., Huici Montagud A., Tinnerberg H., Forni A., Heikkilä P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I. L., Knudsen L. E., Norppa H.** (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60, 1619–1625.
- Botelho M. C., Crespo M., Almeida A., Vieira P., Delgado M. L., Araujo L., Machado J. C., Correia da Costa J. M.** (2009c). *Schistosoma haematobium* and *Schistosomiasis mansoni*: Production of an estradiol-related compound detected by elisa. *Experimental Parasitology*, 122, 250–253.
- Botelho M. C., Oliveira P. A., Lopes C., Correia da Costa J. M., Machado J. C.** (2011). Urothelial dysplasia and inflammation induced by *Schistosoma haematobium* total antigen instillation in mice normal urothelium. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 29, 809–814.
- Botelho M. C., Vale N., Gouveia M. J., Rinaldi G., Santos J., Santos L. L., Gomes P., Brindley P. J., Correia da Costa J. M.** (2013a). Tumour-like phenotypes in urothelial cells after exposure to antigens from eggs of *Schistosoma haematobium*: An oestrogen–DNA adducts mediated pathway? *International Journal for Parasitology*, 43, 17–26.
- Botelho M. C., Veiga I., Oliveira P. A., Lopes C., Teixeira M., da Costa J. M. C., Machado J. C.** (2013b). Carcinogenic ability of *Schistosoma haematobium* possibly through oncogenic mutation of KRAS gene. *Advances in Cancer: Research & Treatment*, 2013.
- Botelho M., Ferreira A. C., Oliveira M. J., Domingues A., Machado J. C., da Costa J. M. C.** (2009a). *Schistosoma haematobium* total antigen induces increased proliferation, migration and invasion, and decreases apoptosis of normal epithelial cells. *International Journal for Parasitology*, 39, 1083–1091.

- Botelho M., Oliveira P., Gomes J., Gartner F., Lopes C., Correia da Costa J. M., Machado J. C.** (2009b). Tumourigenic effect of *Schistosoma haematobium* total antigen in mammalian cells. *International Journal of Experimental Pathology*, 90, 448–453.
- Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Cogliano V., WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group.** (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *The Lancet. Oncology*, 10, 321–322.
- Burke M. L., Jones M. K., Gobert G. N., Li Y. S., Ellis M. K., McManus D. P.** (2009). *Immunopathogenesis of human schistosomiasis. Parasite Immunology*, 31, 163-176
- Catalano C., Aron J., Bansal R., Leytin A.** (2017). Colorectal cancer associated with *Strongyloides stercoralis* colitis. *Case Reports Journal*, 4, 4–6.
- Cavaliere E. L., Rogan E. G.** (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125, 169–180.
- Chaiyadet S., Smout M., Johnson M., Whitchurch C., Turnbull L., Kaewkes S., Sotillo J., Loukas A., Sripa B.** (2015). Excretory/secretory products of the carcinogenic liver fluke are endocytosed by human cholangiocytes and drive cell proliferation and IL6 production. *International Journal for Parasitology*, 45, 773–781.
- Chaiyadet S., Smout M., Laha T., Sripa B., Loukas A., Sotillo J.** (2017). Proteomic characterization of the internalization of *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products in human cells. *Parasitology International*, 66, 494–502.
- Chang H. P.** (1965). Pathological changes in the intrahepatic bile ducts of cats (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 89, 357–364.
- Cheever A. W., Lenzi J. a, Lenzi H. L., Andrade Z.** (2002). Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 917–940.
- Cheung S. T., Wong S. Y., Leung K. L., Chen X., So S., Ng I. O., Fan S. T.** (2004). Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research*, 10, 7629–36.

- Chng K. R., Chan S. H., Ng A. H. Q., Li C., Jusakul A., Bertrand D., Wilm A., Choo S. P., Tan D. M. Y., Lim K. H., Soetinko R., Ong C. K., Duda D. G., Dima S., Popescu I., Wongkham C., Feng Z., Yeoh K. G., Teh B. T., Yongvanit P., Wongkham S., Bhudhisawasdi V., Khuntikeo N., Tan P., Pairojkul C., Ngeow J., Nagarajan N. (2016).** Tissue microbiome profiling identifies an enrichment of specific enteric bacteria in *Opisthorchis viverrini* associated cholangiocarcinoma. *EBioMedicine*, 8, 195–202.
- Colquhoun B. P., Visvanathan K. (1987).** Adenocarcinoma of the pancreas associated with *Clonorchis sinensis* infection. *Canadian Medical Association Journal (Journal de l'Association Medicale Canadienne)*, 136, 153–154.
- Dangtakot R., Pinlaor S., Itthitetrakool U., Chaidee A., Chomvarin C., Sangka A., Wilailuckana C., Pinlaor P. (2017).** Coinfection with *Helicobacter pylori* and *Opisthorchis viverrini* enhances the severity of hepatobiliary abnormalities in hamsters. *Infection and Immunity*, 85, 9-17.
- Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. (2012).** Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma. *Parasitology International*, 61, 155–161.
- Darani H. Y., Shirzad H., Mansoori F., Zabardast N., Mahmoodzadeh M. (2009).** Effects of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model. *Korean Journal of Parasitology*, 47, 175–177.
- Darani H. Y., Soozangar N., Khorami S., Taji F., Yousofi M., Shirzad H. (2012).** Hydatid cyst protoscolices induce cell death in WEHI-164 fibrosarcoma cells and inhibit the proliferation of baby hamster kidney fibroblasts in vitro. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 1–4.
- Deenonpoe R., Chomvarin C., Pairojkul C., Chamgramol Y., Loukas A., Brindley P. J., Sripa B. (2015).** The carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* is a reservoir for species of *Helicobacter*. *Asian Pacific journal of Cancer Prevention*, 16, 1751–8.
- Del Brutto O. H., Castillo P. R., Mena I. X., Freire A. X. (1997).** Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Archives of Neurology*, 54, 1125–1128.
- Ehlken H., Zenouzi R., Schramm C. (2017).** Risk of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 33, 78-84.

**El-Bolkainy M. N., Mokhtar N. M., Ghoneim M. A., Hussein M. H.** (1981). The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer*, *48*, 2643–2648.

**Felix A. S., Soliman A. S., Khaled H., Zaghoul M. S., Banerjee M., El-Baradie M., El-Kalawy M., Abd-Elseyed A. A., Ismail K., Hablas A., Seifeldin I. A., Ramadan M., Wilson M. L.** (2008). The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes & Control*, *19*, 421–429.

**Ferguson A. R.** (1911). Associated bilharziosis and primary malignant disease of the urinary bladder, with observations on a series of forty cases. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *16*, 76–94.

**Ferlay J., Shin H.-R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M.** (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, *127*, 2893–2917.

**Flavell D. J., Flavell S. U.** (1986). *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasite Immunology*, *8*, 455–466.

**Frampton G., Invernizzi P., Bernuzzi F., Pae H. Y., Quinn M., Horvat D., Galindo C., Huang L., McMillin M., Cooper B., Rimassa L., DeMorrow S.** (2012). Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut*, *61*, 268–277.

**François A., Favennec L., Cambon-Michot C., Gueit I., Biga N., Tron F., Brasseur P., Hemet J.** (1998). *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *The American Journal of Surgical Pathology*, *22*, 488–92.

**Fu C.-L., Odegaard J. I., Herbert D. R., Hsieh M. H.** (2012). A novel mouse model of *Schistosoma haematobium* egg-induced immunopathology. *PLoS Pathogens*, *8*, e1002605.

**Gabet A.-S., Mortreux F., Talarmin A., Plumelle Y., Leclercq I., Leroy A., Gessain A., Clity E., Joubert M., Wattel E.** (2000). High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene*, *19*, 4954–4960.

**Goesseringer N., Lindenblatt N., Mihic-Probst D., Grimm F., Giovanoli P.** (2011). *Taenia crassiceps* upper limb fasciitis in a patient with untreated acquired immunodeficiency syndrome and chronic hepatitis C infection – the role of surgical debridement. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 64, 174–176.

**Gouveia M. J., Santos J., Brindley P. J., Rinaldi G., Lopes C., Santos L. L., Correia Da Costa J. M., Vale N.** (2015). Estrogen-like metabolites and DNA-adducts in urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer. *Cancer Letters*, 359, 226–232.

**Hakomori S.** (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Advances in Cancer Research*, 52, 257–331.

**Halliwell B.** (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*, 443, 37–52.

**Haswell-Elkins M. R., Sithithaworn P., Mairiang E., Elkins D. B., Wongratanacheewin S., Kaewkes S., Mairiang P.** (1991). Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 84, 213–218.

**Helling-Giese G., Sjaastad A., Poggensee G., Kjetland E. F., Richter J., Chitsulo L., Kumwenda N., Racz P., Roald B., Gundersen S. G., Krantz I., Feldmeier H.** (1996). Female genital schistosomiasis (FGS): relationship between gynecological and histopathological findings. *Acta Tropica*, 62, 257–267.

**Herrera L. A., Ramirez T., Rodríguez U., Corona T., Sotelo J., Lorenzo M., Ramos F., Verdorfer I., Gebhart E., Ostrosky-Wegman P.** (2000). Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 61–65.

**Herrera L. A., Rodríguez U., Gebhart E., Ostrosky-Wegman P.** (2001). Increased translocation frequency of chromosomes 7, 11 and 14 in lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Mutagenesis*, 16, 495–497.

**Hicks R. M., James C., Webbe G.** (1980). Effect of *Schistosoma haematobium* and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine on the development of urothelial neoplasia in the baboon. *British Journal of Cancer*, 42, 730–755.

**Hitanant S., Trong D. T., Damrongsak C., Chinapak O., Boonyapisit S., Plengvanit U., Viranuvatti V.** (1987). Peritoneoscopic findings in 203 patients with *Opisthorchis viverrini* infection. *Gastrointestinal endoscopy*, 33, 18–20.

**Holmgren A., Lu J.** (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 120–124.

**IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.** (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, 7-14 June 1994, 61, 1–241.

**IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.** (2012). A review of human carcinogens. *Biological Agents*, 100, 1-441.

**Ishii A., Matsuoka H., Aji T., Hayatsu H., Wataya Y., Arimoto S., Tokuda H.** (1989). Evaluation of the mutagenicity and the tumor-promoting activity of parasite extracts: *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 224, 229–233.

**Jaiswal M., Larusso N. F., Burgart L. J.** (2000). Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*, 60, 184–190.

**Jongsuksuntigul P., Imsomboon T.** (1998). Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 29, 327–332.

**Jusakul A., Kongpetch S., Teh B. T.** (2015). Genetics of *Opisthorchis viverrini*-related cholangiocarcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31, 258–263.

**Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G.** (2009). Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297, 1477–1501.

- Kim Y. J., Choi M.-H., Hong S.-T., Bae Y. M.** (2008). Proliferative effects of excretory/secretory products from *Clonorchis sinensis* on the human epithelial cell line HEK293 via regulation of the transcription factor E2F1. *Parasitology Research*, 102, 411–417.
- Kim Y. J., Choi M.-H., Hong S.-T., Bae Y. M.** (2009). Resistance of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis by the excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research*, 104, 1011–1016.
- Kiremit M. C., Cakir A., Arslan F., Ormeci T., Erkurt B., Albayrak S.** (2015). The bladder carcinoma secondary to *Schistosoma mansoni* infection: A case report with review of the literature. *International Journal of Surgery Case Reports*, 13, 76–78.
- Koziol U., Rauschendorfer T., Zanon Rodríguez L., Krohne G., Brehm K.** (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo*, 5, 10.
- Lightowers M. W., Rickard M. D.** (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology*, 96, 123–166.
- Limpens J., Stad R., Vos C., de Vlaam C., de Jong D., van Ommen G. J., Schuurin E., Kluin P. M.** (1995). Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*, 85, 2528–2536.
- Lucas S. B., Hassounah O., Muller R., Doenhoff M. J.** (1980). Abnormal development of *Hymenolepis nana* larvae in immunosuppressed mice. *Journal of Helminthology*, 54, 75–82.
- Madbouly K. M., Senagore A. J., Mukerjee A., Hussien A. M., Shehata M. A., Navine P., Delaney C. P., Fazio V. W.** (2007). Colorectal cancer in a population with endemic *Schistosoma mansoni*: Is this an at-risk population? *International Journal of Colorectal Disease*, 22, 175–181.
- Maeng S., Lee H. W., Bashir Q., Kim T. I., Hong S.-J., Lee T. J., Sohn W.-M., Na B.-K., Kim T.-S., Pak J. H.** (2016). Oxidative stress-mediated mouse liver lesions caused by *Clonorchis sinensis* infection. *International Journal for Parasitology*, 46, 195–204.
- Maksimova G. A., Zhukova N. A., Kashina E. V., Lvova M. N., Katokhin A. V., Tolstikova T. G., Mordvinov V. A.** (2015). Role of *Opisthorchis felinus* on induction of bile duct cancer. *Parazitologiya*, 49, 3–11.



**Mao Q., Xie Z., Wang X., Chen W., Ren M., Shang M., Lei H., Tian Y., Li S., Liang P., Chen T., Liang C., Xu J., Li X., Huang Y., Yu X. (2015).** *Clonorchis sinensis* ferritin heavy chain triggers free radicals and mediates inflammation signaling in human hepatic stellate cells. *Parasitology Research*, 114, 659–670.

**Matchimakul P., Rinaldi G., Suttiprapa S., Mann V. H., Popratiloff A., Laha T., Pimenta R. N., Cochran C. J., Kaewkes S., Sripa B., Brindley P. J. (2015).** Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 72–80.

**Matsuda K., Masaki T., Ishii S., Yamashita H., Watanabe T., Nagawa H., Muto T., Hirata Y., Kimura K., Kojima S. (1999).** Possible Associations of Rectal Carcinoma with *Schistosoma japonicum* Infection and Membranous Nephropathy: A Case Report with a Review. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 29, 576–581.

**Matsuoka H., Aji T., Ishii A., Arimoto S., Wataya Y., Hayatsu H. (1989).** Reduced levels of mutagen processing potential in the *Schistosoma japonicum*-infected mouse liver. *Mutation Research Letters*, 227, 153–157.

**Min K. L., Ju Y. H., Franceschi S., Oh J. K., Kong H. J., Hwang S. S., Park S. K., Cho S. Il, Sohn W. M., Kim D. Il, Yoo K. Y., Hong S. T., Shin H. R. (2006).** *Clonorchis sinensis* infection and increasing risk of cholangiocarcinoma in the republic of Korea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 93–96.

**Moreau R., Dausset J., Bernard J., Mouillec J. (1957).** Acquired hemolytic anemia with polyagglutinability of erythrocytes by a new factor present in normal blood. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris*, 73, 569–587.

**Muehlenbachs A., Bhatnagar J., Agudelo C. A., Hidron A., Eberhard M. L., Mathison B. A., Frace M. A., Ito A., Metcalfe M. G., Rollin D. C., Visvesvara G. S., Pham C. D., Jones T. L., Greer P. W., Vélez Hoyos A., Olson P. D., Diazgranados L. R., Zaki S. R. (2015).** Malignant transformation of *Hymenolepis nana* in a human host. *New England Journal of Medicine*, 373, 1845–1852.

**Mulvenna J., Sripa B., Brindley P. J., Gorman J., Jones M. K., Colgrave M. L., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiprapa S., Smout M. J., Loukas A. (2010).** The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics*, 10, 1063–78.

- Nam J.-H., Moon J. H., Kim I. K., Lee M.-R., Hong S.-J., Ahn J. H., Chung J. W., Pak J. H.** (2012). Free radicals enzymatically triggered by *Clonorchis sinensis* excretory–secretory products cause NF-κB-mediated inflammation in human cholangiocarcinoma cells. *International Journal for Parasitology*, 42, 103–113.
- Ninlawan K., O’Hara S. P., Splinter P. L., Yongvanit P., Kaewkes S., Surapaitoon A., LaRusso N. F., Sripa B.** (2010). *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products induce toll-like receptor 4 upregulation and production of interleukin 6 and 8 in cholangiocyte. *Parasitology International*, 59, 616–621.
- Osinaga E.** (2007). Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life*, 59, 269–273.
- Pak J. H., Kim D.-W., Moon J. H., Nam J.-H., Kim J.-H., Ju J. W., Kim T.-S., Seo S.-B.** (2009). Differential gene expression profiling in human cholangiocarcinoma cells treated with *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products. *Parasitology Research*, 104, 1035–1046.
- Papatpremsiri A., Smout M. J., Loukas A., Brindley P. J., Sripa B., Laha T.** (2015). Suppression of Ov-grn-1 encoding granulins of *Opisthorchis viverrini* inhibits proliferation of biliary epithelial cells. *Experimental parasitology*, 148, 17–23.
- Pinlaor S., Hiraku Y., Ma N., Yongvanit P., Semba R., Oikawa S., Murata M., Sripa B., Sithithaworn P., Kawanishi S.** (2004). Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 11, 175–83.
- Pinlaor S., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Pinlaor P., Ma N., Sithithaworn P., Kawanishi S.** (2005). *Opisthorchis viverrini* antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line. *International Journal for Parasitology*, 35, 591–596.
- Plieskatt J. L., Deenonpoe R., Mulvenna J. P., Krause L., Sripa B., Bethony J. M., Brindley P. J.** (2013). Infection with the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* modifies intestinal and biliary microbiome. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27, 4572–84.
- Prueksapanich P., Piyachaturawat P., Aumpansub P., Ridditid W., Chaiteerakij R., Rerknimitr R.** (2018). Liver fluke-associated biliary tract cancer. *Gut and liver*, 12, 236–245.

- Qiu D.-C., Hubbard A. E., Zhong B., Zhang Y., Spear R. C.** (2005). A matched, case–control study of the association between *Schistosoma japonicum* and liver and colon cancers, in rural China. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *99*, 47–52.
- Ray D., Nelson T. A., Fu C. L., Patel S., Gong D. N., Odegaard J. I., Hsieh M. H.** (2012). Transcriptional profiling of the bladder in urogenital schistosomiasis reveals pathways of inflammatory fibrosis and urothelial compromise. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*, e1912.
- Raziuddin S., Masihuzzaman M., Shetty S., Ibrahim A.** (1993). Tumor necrosis factor alpha production in schistosomiasis with carcinoma of urinary bladder. *Journal of Clinical Immunology*, *13*, 23–29.
- Riganti M., Pungpak S., Punpoowong B., Bunnag D., Harinasuta T.** (1989). Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *20*, 95–100.
- Rosin M. P., Anwar W. A., Ward A. J.** (1994). Inflammation , chromosomal instability , and cancer : the schistosomiasis model. *Cancer Research*, *54*, 1929–1933.
- Ross A., Yuesheng L.** (2016): Life Cycles of chistosomiasis. In: Jamieson B. G. M. (ed.): *Schistosoma : biology, pathology, and control*. CRC Press.
- Saijuntha W., Sithithaworn P., Kaitsovit N., Andrews R. H., Peteney T. N.** (2014): Liver flukes: Clonorchis and Opisthorchis. In: Toledo R., Fried B. (ed.): *Digenetic trematodes*. Springer.
- Saleh M. A.** (2008). Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, *154*, 262–269.
- Salim E. I., Morimura K., Menesi A., El-Lity M., Fukushima S., Wanibuchi H.** (2008). Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *International Journal of Cancer*, *123*, 601–608.
- Salim O. H., Hamid H. K. S., Mekki S. O., Suleiman S. H., Ibrahim S. Z.** (2010). Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: A possible causal relationship. *World Journal of Surgical Oncology*, *8*, 68.
- Saltykova I. V., Ogorodova L. M., Bragina E. Y., Puzyrev V. P., Freidin M. B.** (2014). *Opisthorchis felineus* liver fluke invasion is an environmental factor modifying genetic risk of atopic bronchial asthma. *Acta Tropica*, *139*, 53–56.

- Santos J.A., Lopes M.A.F., Schott A.C., Santos A.E.S., Porfírio L.C., Passos L.** (1981). Colangiocarcinomas em gatos com parasitismo de dutos biliares por *Platynosomum fastosum*. *Brazilian Journal of Veterinary Research (Pesquisa Veterinaria Brasileira)* 1, 31–36.
- Seo A. N., Goo Y.-K., Chung D.-I., Hong Y., Kwon O., Bae H.-I.** (2015). Comorbid gastric adenocarcinoma and gastric and duodenal *Strongyloides stercoralis* infection: a case report. *The Korean journal of parasitology*, 53, 95–99.
- Shiff C., Veltri R., Naples J., Quartey J., Otchere J., Anyan W., Marlow C., Wiredu E., Adjei A., Brakohiapa E., Bosompem K.** (2006). Ultrasound verification of bladder damage is associated with known biomarkers of bladder cancer in adults chronically infected with *Schistosoma haematobium* in Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 847–854.
- Smith J. H., Christie J. D.** (1986). The pathobiology of *Schistosoma haematobium* infection in humans. *Human pathology*, 17, 333–345.
- Smout M. J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiprapa S., Jones A., Brindley P. J., Loukas A.** (2009). A granulins-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. *PLoS Pathogens*, 5, e1000611.
- Sriamporn S., Pisani P., Pipitgool V., Suwanrungruang K., Kamsa-ard S., Parkin D. M.** (2004). Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, 9, 588–594.
- Sripa B.** (2003). Pathobiology of opisthorchiasis: An update. *Acta Tropica*, 88, 209–220.
- Sripa B., Kaewkes S.** (2000). Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *International Journal for Parasitology*, 30, 735–740.
- Sripa B., Thinkhamrop B., Mairiang E., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Periago M. V., Bhudhisawasdi V., Yonglithipagon P., Mulvenna J., Brindley P. J., Loukas A., Bethony J. M.** (2012). Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1654.
- Steinmann P., Keiser J., Bos R., Tanner M., Utzinger J.** (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, 6, 411–425.

- Suttiwapa S., Matchimakul P., Loukas A., Laha T., Wongkham S., Kaewkes S., Brindley P. J.** (2012). Molecular expression and enzymatic characterization of thioredoxin from the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Parasitology International*, *61*, 101–106.
- Tanaka T., Hirata T., Parrott G., Higashiarakawa M., Kinjo T., Kinjo T., Hokama A., Fujita J.** (2016). Relationship Among *Strongyloides stercoralis* Infection, Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection, and Cancer: A 24-Year Cohort Inpatient Study in Okinawa, Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *94*, 365–370.
- Thors C., Jansson B., Helin H., Linder E.** (2006). Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in *Schistosoma mansoni*: localization and immunogenicity in experimental mouse infection. *Parasitology*, *132*, 73–81.
- Thuwajit C.** (2006). Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World Journal of Gastroenterology*, *12*, 3585–3592.
- Tomaino C., Catalano C., Tiba J. A. M.** (2015). A first case report of colorectal cancer associated with chronic *Strongyloides stercoralis* colitis and the complex management decisions that follow. *Gastroenterology*, *148*, 575.
- Tricker A. R., Mostafa M. H., Spiegelhalder B., Preussmann R.** (1989). Urinary excretion of nitrate, nitrite and *N*-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, *10*, 547–552.
- Tyson G. L., El-Serag H. B.** (2011). Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*, *54*, 173–184.
- Ubillos L., Medeiros A., Cancela M., Casaravilla C., Saldaña J., Domínguez L., Carmona C., Le Pendu J., Osinaga E.** (2007). Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen in helminth parasites. *Experimental Parasitology*, *116*, 129–136.
- Upatham E. S., Viyanant V., Kurathong S., Rojborwonwitaya J., Brockelman W. Y., Ardsungnoen S., Lee P., Vajrasthira S.** (1984). Relationship between prevalence and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection, and clinical symptoms and signs in a rural community in north-east Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, *62*, 451–61.
- Ustundag Y., Bayraktar Y.** (2008). Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature.

*World Journal of Gastroenterology*, 14, 6458–6466.

**Vajrasthira S., Thammavit W., Bhamarapravati N.** (1978). Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis Viverrini*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 787–794.

**Vale N., Gouveia M. J., Botelho M., Sripa B., Suttiprapa S., Rinaldi G., Gomes P., Brindley P. J., Correia da Costa J. M.** (2013). Carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* oxysterols detected by LC-MS/MS survey of soluble fraction parasite extract. *Parasitology International*, 62, 535–542.

**van der Werf M. J., de Vlas S. J., Brooker S., Looman C. W. ., Nagelkerke N. J. ., Habbema J. D. F., Engels D.** (2003). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 86, 125–139.

**Viranuvatti V., Mettiyawongse S.** (1953). Observations on two cases of opisthorchiasis in Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 47, 291–293.

**Wu R. L., Osman I., Wu X. R., Lu M. L., Zhang Z. F., Liang F. X., Hamza R., Scher H., Cordon-Cardo C., Sun T. T.** (1998). Uroplakin II gene is expressed in transitional cell carcinoma but not in bilharzial bladder squamous cell carcinoma: alternative pathways of bladder epithelial differentiation and tumor formation. *Cancer research*, 58, 1291–1297.

**Yan C., Li X.-Y., Li B., Zhang B.-B., Xu J.-T., Hua H., Yu Q., Liu Z.-Z., Fu L.-L., Tang R.-X., Zheng K.-Y.** (2015). Expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the livers of mice infected by *Clonorchis sinensis*. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9, 1147–1155.

**Zahid M., Kohli E., Saeed M., Rogan E., Cavalieri E.** (2006). The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: Implications for tumor-initiating activity. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 164–172.

**Zalata K. R., Nasif W. A., Ming S.-C., Lotfy M., Nada N. A., El-Hak N. G., Leech S. H.** (2005). p53, Bel-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt. *Cellular oncology : the Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 27, 245–253.

**Zhang R., Takahashi S., Orita S., Yoshida A., Maruyama H., Shirai T., Ohta N. (1998).**  
p53 gene mutations in rectal cancer associated with *Schistosomiasis japonica* in Chinese patients. *Cancer Letters*, 131, 215–221.