

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Manfred Schreiber

Vliv tkáňových helmintů na rozvoj nádorových onemocnění v modelových organismech

Influence of tissue helminths on the development of cancers in model organisms

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Praha 2020

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 10. 8. 2020

Poděkování

Díky patří především mému školiteli Petru Horákovi za cenné rady, podporu a trpělivost. Děkuji také týmu doc. Jana Brábka, především pak Ondřeji Toldemu za spolupráci, odborné rady a pomoc při pokusech s melanomovými buňkami. Dále pak Tomáši Macháčkovi za pomoc při průtokové cytometrii. V neposlední řadě patří veliké díky týmu DP a rodině.

Abstrakt

Mesocestoides corti a *Taenia crassiceps* jsou tasemnice, jejichž larvy se vyznačují schopností asexuální reprodukce. V této práci byl zkoumán vliv jejich infekce v BALB/c, C57BL/6J a ICR myších na růst a metastázování nádorů melanomové linie B16F10. Ačkoliv byla při intravenózní aplikaci melanomových buněk u myší infikovaných *M. corti* pozorována zvýšená tvorba metastáz, vykazovaly při intraperitoneální aplikaci oba druhy tasemnic silný supresivní efekt na velikost a množství vytvořených nádorů a metastáz, který v některých případech vedl k úplné eliminaci nádorových buněk. *In vitro* kultivace B16F10 buněk v přítomnosti exkrečně-sekrecčních produktů larev vedla k snížení jejich viability, avšak zvýšení jejich migrační aktivity. Průtoková cytometrie pak prokázala vliv infekce *M. corti* na množství a zastoupení populací makrofágů v peritoneu ICR myší. Tato práce potvrdila protinádorový efekt infekce *T. crassiceps* u myší a zavedla *M. corti* jako nový druh helminta schopného ovlivňovat nádorová onemocnění.

Klíčová slova: helminti, tasemnice, nádorová onemocnění, *Mesocestoides corti*, *Taenia crassiceps*

Abstract

Mesocestoides corti and *Taenia crassiceps* are tapeworms, larvae of which are characterized by their ability to reproduce asexually. In this work, the effect of infection by *M. corti* and *T. crassiceps* in BALB/c, C57BL/6J and ICR mice on the growth and metastasis of B16F10 melanoma tumors was investigated. Although an increase in metastatic activities was observed after intravenous administration of melanoma cells to *M. corti*-infected mice, both tapeworms showed a strong suppressive effect on the size and number of tumors and metastases formed when the cells were administered intraperitoneally. This, in some cases, led to a complete elimination of tumor cells. *In vitro* cultivation of B16F10 cells in the presence of larval excretory-secretory products led to a decrease in their viability but an increase in their migration ability. Flow cytometry proved that *M. corti* infection has an effect on the increased number and proportion of macrophage populations in the peritoneum of ICR mice. Our work confirmed the anti-tumor effect of *T. crassiceps* infection in mice and introduced *M. corti* as a new helminth species capable of influencing cancer.

Key words: helminths, cestodes, cancers, *Mesocestoides corti*, *Taenia crassiceps*

Obsah

Seznam zkratek.....	1
1. Úvod a cíle práce	2
2. Literární přehled	3
2.1. Helminti a nádorová onemocnění.....	3
2.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i>	3
2.1.2. <i>Trichinella spiralis</i>	7
2.1.3. <i>Taenia crassiceps</i>	8
2.1.4. Další druhy helmintů a jejich vliv na nádorová onemocnění.	10
2.1.5. <i>Mesocestoides corti</i> (syn. <i>M. vogae</i>)	11
3. Materiál a metodika	11
3.1. Experimentální modely	11
3.1.1. Odchyt hlodavců.....	12
3.1.2. Experimentální hostitelé	12
3.1.3. Použité modely helmintů	13
3.1.4. Pasážování	13
3.1.5. Model nádorového onemocnění.....	14
3.2. Histologické hodnocení	14
3.2.1. Zpracování vzorků	14
3.2.2. Zalití do parafinových bločků	14
3.2.3. Barvení.....	15
3.3. In vivo experimenty	18
3.3.1. Intravenózní aplikace B16F10 buněk.....	18
3.3.2. Kombinované peritoneální aplikace tasemnic a B16F10 buněk.....	18
3.4. Kultivace	18
3.4.1. Kultivace tasemnic.....	18
3.4.2. Kultivace melanomové linie B16F10	19
3.5. In vitro metody	20
3.5.1. Izolace exkrečně-sekrečních produktů larev tasemnic	20
3.5.2. Měření viability B16F10 buněk pomocí alamarBlue	20
3.5.3. 3D kultivace sferoidů B16F10.....	21
3.5.4. „Scratch“ test.....	22
3.6. Průtoková cytometrie.....	22
3.6.1. Peritoneální laváž	22
3.6.2. Příprava buněk pro průtokovou cytometrii.....	22

3.6.3. Měření na průtokovém cytometru.....	23
4. Výsledky.....	24
4.1. Zavedení nových laboratorních modelů.....	24
4.1.1. Odchyt hlodavců.....	24
4.1.2. Modely tasemnic.....	25
4.2. Výběr vhodné histologické metody pro následné hodnocení infekcí a koinfekcí.....	27
4.3. Vliv infekce larvami tasemnic na nádorová onemocnění.....	29
4.3.1. Intravenózní aplikace B16F10 buněk.....	29
4.3.2. Intraperitoneální aplikace B16F10 buněk.....	30
4.4. Vliv ES produktů larev tasemnic na melanomové buňky <i>in vitro</i>	38
4.4.1. Kultivace tasemnic <i>in vitro</i> za účelem získání ES produktů.....	38
4.4.2. Vliv ES produktů tasemnic na viabilitu B16F10 buněk.....	39
4.4.3. Vliv ES produktů tasemnic na invazivitu a migrační schopnost B16F10 buněk.....	41
4.5. Vliv infekce <i>M. corti</i> na populace makrofágů v peritoneu myší.....	44
5. Diskuze.....	48
5.1. Zavedení nových laboratorních modelů.....	48
5.2. Vliv infekce larvami tasemnic na růst nádorů a metastázování melanomové linie B16F10.....	49
5.3. Vliv ES produktů larev tasemnic na melanomové buňky <i>in vitro</i>	51
5.4. Vliv infekce <i>M. corti</i> na imunitní buňky peritonea myší.....	53
6. Závěr.....	55
7. Použitá literatura.....	56

Seznam zkratek

CO1	cytochromoxidázová podjednotka 1
CXCR2	interleukin 8 receptor β
DMBA	7,12-dimetylbenzantracen
dpi	dní po infekci
EgKI-1	proteázový inhibitor Kunitzova typu <i>Echinococcus granulosus</i>
Egmuc	peptid podobný mucinu <i>Echinococcus granulosus</i>
ES	exkrečně-sekreční
FBS	fetální bovinní sérum
GATA 6	transkripční faktor GATA-vazebného faktoru 6
GK-1	peptid <i>Taenia crassiceps</i>
HCC	hepatocelulární karcinom
hsp	protein teplotního šoku (angl. heat shock protein)
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
kDa	kilodalton
NK buňky	„přirození zabíječi“ (angl. natural killer)
PBS	fosfátový pufr (angl. phosphate buffered saline)
PD1	receptor programované buněčné smrti 1 (angl. programmed cell death 1 receptor)
PDL1	ligand programované buněčné smrti 1 (angl. programmed cell death 1 ligand)
TAM	tumor asociované makrofágy
Th	pomocné T lymfocyty (angl. T helper)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

1. Úvod a cíle práce

Helminti jsou parazité, kterými jsou na světě podle odhadů infikovány až miliardy lidí. Někteří z nich mohou u člověka způsobovat závažné patologické změny, které mohou vést až ke smrti infikovaného. Stále častěji se však začíná o helmintech uvažovat jako o součásti „starých přátel“. Tato hypotéza poukazuje na mnohem nižší prevalenci některých civilizačních onemocnění v zemích, kde jsou lidé častěji ve styku s patogeny a parazity, kteří byli v jiných částech světa téměř eradikováni. Jedním z druhů těchto civilizačních chorob jsou právě některé typy nádorových onemocnění, která jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých zemích.

Vztah helmintů k nádorovým onemocněním je však ambivalentní. Některé druhy helmintů jsou prokazatelně kancerogenní, jako například *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* a *Schistosoma haematobium*, stále častěji se však objevují studie, které naopak popisují protinádorový efekt některých druhů helmintů. Mechanismy této protinádorové aktivity však nejsou objasněny.

Nejčastěji používanými modely helmintů pro studium v tomto nově vznikajícím vědeckém směru jsou *Echinococcus granulosus* a *Trichinella spiralis*. Oba tyto druhy jsou však vysoce patogenní pro člověka a bylo by vhodné zavedení bezpečnějších a dostupnějších modelů pro studium této problematiky.

V rámci této práce bude charakterizován vliv larev tasemnic *Mesocestoides corti* a *Taenia crassiceps* na melanomovou linii B16F10.

Cíle této práce jsou:

- Zavést nový laboratorní model helmintů pro studium jejich vlivu na nádorová onemocnění.
- Popsat efekt infekce *M. corti* a *T. crassiceps* na růst a metastázování melanomů u myší.
- Testovat vliv exkrečně-sekrečních produktů larev tasemnic na B16F10 buňky *in vitro*.

2. Literární přehled

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin smrti v rozvinutých zemích. V roce 2017 bylo celosvětově zaznamenáno 24,5 milionu případů onemocnění a 9,6 milionu úmrtí (Fitzmaurice et al., 2019). I přes intenzivní výzkum stále neexistuje pro mnoho typů nádorů efektivní terapie. Proto je stále nutno vyhledávat nové metody léčby, jednou takovou by mohla být aplikace molekul produkovaných helminty, u kterých je znám supresivní efekt na nádorová onemocnění.

2.1. Helminti a nádorová onemocnění

V následujících kapitolách budou popsány příklady helmintů, u kterých byl pozorován efekt na nádorová onemocnění, a také laboratorní modely *Taenia crassiceps* a *Mesocestoides corti*, které byly použity pro praktickou část práce.

2.1.1. *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus je dvouhostitelská tasemnice z řádu Cyclophyllidea, jejímž definitivním hostitelem jsou psovité šelmy. Mezihostitelem jsou nejčastěji kopytníci, může jím však být i člověk. Dospělci parazitují ve střevech a k nákaze mezihostitele dochází požitím vajíčka, ze kterého se ve střevě líhne hexakant, který poté může migrovat do rozličných orgánů, nejčastěji do jater a plic, kde následně tvoří larvocysty, které se poté mohou asexuálně dělit. Onemocnění způsobené touto tasemnicí se nazývá cystická echinokokóza a může vést až ke smrti člověka.

Právě u tohoto závažného patogenního parazita byla v retrospektivní studii v Turecku pozorována jeho snížená prevalence u pacientů trpících nádorovými onemocněními (Akgül et al., 2003). Autoři tedy formulovali hypotézu, že infekce touto tasemnicí by mohla potlačovat vznik nádorových onemocnění. V podobné pilotní retrospektivní studii na Kypru ovšem došli k závěru, že infekce *E. granulosus* naopak zvyšuje riziko vzniku nádorových onemocnění (Oikonomopoulou et al., 2016). Jak však Gundogdu et al., (2017) podotýkají, jednalo se v této studii o pacienty s již dříve vyléčenou echinokokózou, a ne aktivní infekcí v době diagnózy nádorového onemocnění. Další retrospektivní studie sledující korelaci mezi infekcí *E. granulosus* a nádory byla provedena na pacientech trpících hepatocelulárním karcinomem (HCC). U pacientů s HCC, kteří byli

zároveň infikováni *E. granulosus*, byla zaznamenána delší doba přežívání než u osob bez této tasemnice (Bo et al., 2020).

Navzdory své patogenitě je *E. granulosus* poměrně široce používaným modelem helminta. U laboratorních potkanů infikovaných protoskolexy *E. granulosus* bylo pozorováno výrazné potlačení rozvoje karcinomu prsu indukovaného dimethylbenzantracemem (DMBA) (Altun et al., 2015). Efekt živých larev byl zkoumán také na BHK (baby hamster kidney) fibroblastech a myších WEHI-164 fibrosarkomových buňkách *in vitro*. U BHK fibroblastů došlo po přidání protoskolexů k inhibici proliferace této buněčné linie. V případě WEHI-164 fibrosarkomových buněk byla kromě inhibice proliferace pozorována také snížená viabilita těchto buněk (Yousofi Darani et al., 2012). Jelikož je však *E. granulosus* silně patogenní, není použití živých tasemnic jako terapie proti nádorovým onemocněním reálná.

Nejen u živých larev však byl pozorován přímý účinek na nádorové buňky *in vitro*. EgKI-1 je proteázový inhibitor Kunitzova typu, produkováný *E. granulosus*, který vykazuje potenciál například jako inhibitor chemotaxe neutrofilů (Ranasinghe et al., 2015). Kultivace několika linií lidských nádorových buněk v přítomnosti rekombinantu EgKI-1 vedla k inhibici jejich růstu, zároveň byla u těchto buněk inhibována schopnost migrace *in vitro*. EgKI-1 byl také schopen indukovat apoptózu u buněk lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231. Aplikace tohoto inhibitoru proteáz myším s nádorovou linií MDA-MB-231 vedla také k potlačení růstu nádoru *in vivo* (Ranasinghe et al., 2018). U jiné linie karcinomu prsu (4T1) byla pozorována indukce apoptózy při *in vitro* kultivaci v přítomnosti tekutiny obsažené v larvocystách *E. granulosus* získaných z ovcí. Tento efekt byl pozorován i u glykoproteinových frakcí a jedné 78kDa frakci izolované cystické tekutiny (Daneshpour et al., 2019). Když byla myším kmene C57BL/6J injikována tekutina cyst získaných z ovcí a následně jim byly aplikovány buňky myší melanomové linie B16F10, došlo u nich k inhibici růstu nádorů (Darani et al., 2016). Na tomto modelu byl také vyzkoušen opačný postup, kdy byly myším do podkoží injikovány melanomové buňky a následně jim byla po 14 dnech aplikována tekutina z cyst. Také v tomto případě došlo k inhibici růstu nádorů, stejný efekt měla i aplikace živých protoskolexů a 78kDa frakce cystické tekutiny (Rad et al., 2018). Při aplikaci cystické tekutiny *E. granulosus* izolované z člověka myším, kterým byly následně subkutánně injikovány buňky karcinomu tlustého střeva linie CT27, došlo k inhibici růstu

nádorů. Když byla cystická tekutina podávána po aplikaci CT27 buněk, tak byla výrazně zvýšena doba přežívání myší (Berriel et al., 2013). Vliv samotných produktů tasemnic však pravděpodobně nevede přímo k potlačení nádorů a je pravděpodobně spojen s imunitní odpovědí hostitele.

Jedním z klíčových procesů v aktivaci protinádorové imunity je schopnost rozeznání antigenů na povrchu nádorových buněk. Již v roce 1979 byla popsána podobnost mezi antigeny obsaženými v cystické tekutině *E. granulosus* a těmi, jež jsou produkovány buňkami karcinomu plic (Yong et al., 1979). Jedním z těchto antigenů je O-glykosylovaný Tn antigen (α N-acetylgalaktosamin-O-serin/threonin), který je exprimován larvami i dospělci *E. granulosus* a byl detekován také v sérech pacientů s echinokokózou. Tento glykoprotein je hojně nalézán na povrchu mnoha typů nádorových buněk zahrnujících například karcinom plic, prsu a slinivky (Springer, 1997). Protilátky vytvořené proti larvám *E. granulosus* reagovaly s exkrečně-sekrečními produkty nádorových buněk a stejná zkřížená reaktivita byla pozorována mezi séry pacientů s karcinomem prsu a antigeny larvocyst *E. granulosus*. Předpokládá se tedy, že tato protilátková odpověď proti Tn antigenu by mohla aktivovat protinádorovou imunitu (Alvarez Errico et al., 2001). Séra pacientů s karcinomem prsu také reagovala na neglykosylovanou 27kDa molekulu izolovanou z larvocysty *E. granulosus* (Sharafi et al., 2016). U protilátek myší vytvořených proti cystické tekutině *E. granulosus* byla pozorována schopnost rozeznávat některé antigeny na CT27 buňkách. Protein teplotního šoku (hsp70) *E. granulosus* vykazoval 60% homologii s hsp70 CT27 buněk, který má antiapoptotické účinky a jeho zvýšená exprese je spojována s horší prognózou u pacientů s kolorektálním karcinomem (Dundas et al., 2005). Zkřížená reaktivita antigenů by tedy mohla být spojena s inhibicí růstu CT27 nádorů u myší, kterým byla aplikována cystická tekutina *E. granulosus* (Berriel et al., 2013). Zkřížená reakce protilátek by také mohla vysvětlovat cytotoxický efekt séra pacientů s echinokokózou na buňky lidského karcinomu plic linie NCI-H209 *in vitro* (Karadayi et al., 2013).

Kromě protilátkové odpovědi dokáže infekce *E. granulosus* ovlivňovat i celkovou imunitní odpověď. U myší infikovaných larvami *E. granulosus* je v prvotní fázi zvýšena hladina cytokinů interferonu gama (IFN γ), interleukinu 2 (IL-2) a IL-15 typických pro Th1 odpověď, která je následně nahrazena Th2 odpovědí charakterizovanou zvýšením hladiny cytokinů IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 (Mourglia-Ettlin et al., 2011). Dojde-li však k úhynu

larev, je opět rychle nahrazena Th1 odpovědí. V potlačování vzniku nádorů hraje hlavní roli Th1 odpověď, při které dochází k ničení nádorových buněk a inhibici růstu nádorů, Th2 polarizace bývá spojována s rozvojem některých nádorů a jejich metastázováním (Zamarron & Chen, 2011). Právě navozením Th2 odpovědi vysvětlují Turhan et al., (2015) zvýšený počet metastází nádorové linie karcinomu prsu 4T1 v játrech u myší infikovaných larvami *E. granulosus*. Toto je jediný zaznamenaný případ, který je v rozporu s ostatními výsledky a popisuje pronádorový efekt této tasemnice. U myší, kterým byla injikována melanomová linie B16F10, a poté aplikovány protoskolexy, cystická tekutina a 78kDa frakce cystické tekutiny, byla pozorována zvýšená hladina Th1 cytokinů IL-2 a IFN γ , ale také Th2 cytokinu IL-4. Naopak byla výrazně snížena hladina tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF α), který zvyšuje schopnost migrace melanomových buněk *in vitro* (Rad et al., 2018). Změna hladin cytokinů ovlivněná *E. granulosus* by mohla navodit prostředí nevhodné pro rozvoj nádorových onemocnění, a vést tak k potlačení jejich rozvoje.

Echinococcus granulosus může mít také efekt na konkrétní skupiny imunitních buněk spojených s nádorovými onemocněními. Aplikace peptidu podobného mucinu izolovaného z larev *E. granulosus* (Egmuc) vedla k zvýšení počtu aktivovaných NK buněk ve slezině myší, přičemž právě NK buňky jsou jednou z důležitých složek protinádorové imunity a jsou používány při nádorových imunoterapiích (Salagianni et al., 2012). Zároveň byl u splenocytů izolovaných z myší, kterým byl aplikován Egmuc, zaznamenán cytotoxický efekt na pankreatické nádorové buňky linie Panc02 při kultivaci *in vitro* (Noya et al., 2013). U EgKI-1 produkovaného *E. granulosus* byl zjištěn silný inhibiční vliv na chemotaxi neutrofilů (Ranasinghe et al., 2015). Stejný efekt vykazuje i antigen B izolovaný z cystické tekutiny *E. granulosus* (Shepherd et al., 1991). Neutrofilové se účastní imunitní obranné reakce hostitele proti infekci *E. granulosus* (Zhang et al., 2008), ale jsou také spojovány s progresí, metastázováním a angiogenezí v mikroprostředí nádorů (Coffelt et al., 2016). Inhibice chemotaxe neutrofilů zprostředkovaná produkty *E. granulosus* by tedy mohla přispívat k pozorovanému protinádorovému efektu této tasemnice.

2.1.2. *Trichinella spiralis*

T. spiralis je hlístice z původní třídy Adenophorea parazitující v masožravých a všežravých savcích a vykazující nezvyklý životní cyklus. K nákaze může dojít pouze pozřením tkáně infikované larvami, kdy dojde k jejich uvolnění ve střevě, kde také probíhá pohlavní rozmnožování. Samička poté produkuje L1 larvy, které následně migrují do svalstva, kde encystují. Infekce touto patogenní hlísticí u člověka způsobuje trichinelózu, která může být při neléčení smrtelná.

Již v 70. letech byla pozorována snížená incidence přirozeně se vyskytujícího karcinomu prsu u SWR/J kmene myší infikovaných larvami *T. spiralis* (Weatherly, 1970). Následně byla u HaM/ICR myší infikovaných *T. spiralis* pozorována snížená vnímavost na sarkomovou buněčnou linii 180 (S-180), a zároveň u nich byla prodloužena doba přežívání (Lubiniecki & Cypess, 1975). Při použití stejné nádorové linie S-180 u ICR/CD-1 myší byl výsledek podobný, v obou případech však protektivní efekt infekce *T. spiralis* trval jen několik týdnů a při pozdější aplikaci nádorových buněk již nebyl pozorován (Molinari et al., 1979). Opačný postup byl použit v případě myšího karcinomu předžaludku, hepatomu buněčné linie H22 a sarkomu buněčné linie S-180. ICR myši byly 7 dní po aplikaci nádorových buněk infikovány larvami, nebo jim byla intravenózně podána solubilní frakce homogenátu larev a dospělců *T. spiralis*. Ve všech případech došlo k potlačení růstu nádorů. Při *in vitro* pokusech byly tyto tři nádorové linie doplněny ještě o nádorové buňky lidské chronické myeloidní leukémie (K562) a lidského hepatomu (H7402). U všech nádorových linií došlo po aplikaci homogenátu *T. spiralis* k inhibici růstu nádorových buněk (Wang et al., 2009). Menší velikost nádorů u BALB/c myší infikovaných *T. spiralis* byla zaznamenána také u myelomové nádorové linie SP2/0 (Deng et al., 2013). Při injekci melanomových buněk linie B16 do podkoží C57BL/6J myší 40 dní po infekci *T. spiralis* došlo jen u 7 z 10 infikovaných jedinců k vytvoření nádoru, a v těchto sedmi případech byl růst nádoru výrazně inhibován. U B16 melanomových buněk kultivovaných v přítomnosti exkrementně-sekrecčních produktů L1 larev *T. spiralis* bylo zaznamenáno snížení jejich viability a zvýšená apoptóza (Vasilev et al., 2015). Stejně potlačení růstu nádorů bylo pozorováno u C57BL/6J myší, kterým byly melanomové buňky B16F10 aplikovány do podkoží 14 dní po infekci. Při intravenózní aplikaci melanomových buněk do ocasní žíly došlo u infikovaných myší k vzniku nižšího počtu metastáz v plicích (Kang et al., 2013).

Také u zvířat infikovaných *T. spiralis* byla pozorována zkřížená reaktivita protilátek, která by mohla přispívat k potlačení rozvoje nádorových onemocnění. Zkřížená reakce s protilátkami byla zaznamenána mezi antigeny myelomové linie SP2/0 a 33kDa antigenem izolovaným z *T. spiralis* (Gong et al., 2011).

Vliv *T. spiralis* na imunitní odpověď je opačná než v případě *E. granulosus*. V první intestinální fázi dojde k navození Th2 imunitní odpovědi, která je následně ve svalové fázi nahrazena Th1 odpovědí (Dvorožňáková et al., 2011), která může přispívat k potlačení růstu nádorů. Při perorální infekci myši kmene CD1 bylo pozorováno masivní namnožení makrofágů v peritoneu a *in vitro* tyto stimulované makrofágy vykazovaly silný cytostatický efekt na buňky myši leukémie linie R1 tím, že inhibovaly DNA syntézu (Meerovitch & Bomford, 1977). Stejný efekt na namnožení peritoneálních makrofágů byl pozorován u infikovaných myši kmene C57BL6/J. Také v tomto případě měly makrofágy silný cytostatický efekt na nádorové buňky linie P815 a EL-4 (Wing et al., 1979). Aktivace makrofágů by mohla být tedy jedním z procesů přispívajících k inhibici růstu nádorů u myši infikovaných *T. spiralis*.

2.1.3. *Taenia crassiceps*

T. crassiceps je tasemnice z řádu Cyclophyllidea s dvouhostitelským cyklem. Definitivním hostitelem jsou drobné šelmy a jako mezihostitelé slouží hlodavci, u kterých se její larvy zvané cysticerky mohou nacházet v podkoží a peritoneální dutině. Výhodou této tasemnice jako laboratorního modelu je, že jen zřídka dochází k infekcím u člověka. Je známo několik málo takovýchto případů, veskrze se však jedná o infekce lidí s imunitní deficiencí (François et al., 1998). Díky schopnosti asexuálního množení larev je možno tento druh držet v laboratorních podmínkách pasážováním v myších, cysticerky *T. crassiceps* mohou být také dlouhodobě udržovány kultivací *in vitro* (Willms & Zurabian, 2010).

Vliv cysticerek *T. crassiceps* na nádorová onemocnění byl zkoumán na modelu karcinomu asociovaného s ulcerózní kolitidou (CAC), který byl u myši vyvoláván pomocí kombinované aplikace azoxymetanu a dextranu sulfátu sodného. U myši infikovaných cysticerkou *T. crassiceps* 6 týdnů před aplikací karcinogenů byl pozorován nižší počet vzniklých nádorů. Došlo také k potlačení exprese β -kateninu hrajícího roli v proliferaci

buněk a CXCR2 (interleukin 8 receptor β), což je chemokinový neutrofilový receptor; zvýšené hladiny těchto markerů jsou spojovány s nádorovými onemocněními střeva. Při infekci byl také pozorován nárůst populace makrofágů a lokální zvýšená hladina IL-4 ve tkáni střeva (León-Cabrera et al., 2014; Ledesma-Soto et al., 2015). Na stejném nádorovém modelu byl zkoumán vliv exkrečně-sekrečních produktů larev *T. crassiceps*, které byly myším aplikovány 26 dní po indukci CAC. Také v tomto případě došlo k potlačení tvorby nádorů a zároveň došlo ke snížení hladin prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF- α , IL-33 a IL-17 (Callejas et al., 2019). Jelikož je vznik CAC spojován se zánětlivým prostředím, mohl by být pozitivní efekt *T. crassiceps* spojen s jejich schopností indukovat posun imunitní odpovědi směrem k protizánětlivému Th2 typu (Terrazas et al., 1998).

Konkrétní molekulou, která by mohla přispívat k protinádorovému efektu, je GK-1 peptid izolovaný z larev *T. crassiceps*. Synteticky vytvořený peptid GK-1 byl aplikován BALB/c myším, u kterých byly vytvořeny nádory karcinomu prsu linie 4T1. U takto ošetřených myší došlo k zvýšené nekróze nádorů vedoucí k redukcí jejich velikost a zároveň byl výrazně snížen počet metastáz v plicích. Byla také zaznamenána zvýšená hladina IL-12 (Torres-García et al., 2017), který je důležitou součástí protinádorové imunity (Tugues et al., 2015). GK-1 také zvyšuje efektivitu systému využívajícího vakcinaci myší dendritickými buňkami u nádorových onemocnění za účelem aktivace specifických protinádorových T lymfocytů. Pokud byly dendritické buňky předem stimulovány GK-1, byl pozorován nejsilnější efekt na redukcí nádorů melanomové linie B16F10 a dobu přežívání myší. U myší s takto stimulovanými dendritickými buňkami byl pozorován nárůst CD8⁺ T lymfocytů a zvýšené hladiny IFN γ , které by mohly přispívat k potlačení rozvoje melanomů (Piñón-Zárate et al., 2014). Zvýšení protinádorového efektu bylo dosaženo také kombinovanou aplikací GK-1 s protilátkou proti PDL1 („programmed cell death ligand 1“). PDL1 může být exprimován na povrchu nádorových buněk a vázat se na PD1 („programmed cell death 1 receptor“) na povrchu T lymfocytů (Keir et al., 2008), čímž dochází k snížení cytotoxického efektu T lymfocytů na nádorové buňky (Iwai et al., 2002). U C57BL/6J myší, kterým byla aplikována kombinace GK-1 a protilátky proti PDL1, byly vytvořeny menší podkožní nádory melanomové linie B16F10 a byla prodloužena doba jejich přežívání (Vera-Aguilera et al., 2017). Při aplikaci samotného GK-1 myším kmene C57BL/6 s vytvořenými B16F10 melanomy došlo, podobně jako v přechozích pokusech, k potlačení růstu nádorů. Došlo

také k nárůstu populace CD8⁺ T lymfocytů infiltrujících nádory, u těchto CD8⁺ T lymfocytů byla zaznamenána snížená exprese PD1. Díky snížení exprese PD1, u takto aktivovaných lymfocytů, mohla být zvýšena jejich cytotoxická aktivita, vedoucí k pozorované supresi růstu nádorů (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020).

2.1.4. Další druhy helmintů a jejich vliv na nádorová onemocnění.

Hymenolepis nana je další tasemnice, u které byl pozorován inhibiční vliv na růst nádorů. BALB/c myším byla indukována tvorba nádorů v kůži aplikací DMBA, přičemž u myši předem infikovaných *H. nana* došlo k vzniku menšího množství nádorů než u kontrolní skupiny. Infikované myši vykazovaly zvýšený počet eosinofilů a neutrofilů, přičemž právě zvýšený počet eosinofilů by mohl přispět k redukcí množství nádorů (Ramos-Martínez et al., 2019). U *H. nana* je také popsán unikátní případ, kdy totipotentní buňky této tasemnice vytvořily nádory v plicích a lymfatických uzlinách pacienta infikovaného HIV (Muehlenbachs et al., 2015). Posledním z helmintů, kterému je přisuzován možný protinádorový efekt, je hlístice *Strongyloides stercoralis*. Při infekci touto hlísticí byla v kombinaci s hypereosinofilií pozorována prodloužená doba přežití u pacientů s lymfomem maturovaných T buněk (Plumelle et al., 1997).

Toxocara canis je hlístice parazitující v šelmách, u které byl sice recentně popsán pronádorový efekt této infekce, avšak při aplikaci antigenů jejích vajíček byl pozorován protinádorový efekt. U myši infikovaných *T. canis* byl zaznamenán vznik větších nádorů po aplikaci 4T1 linie karcinomu prsu. Popisovaný efekt je přisuzován schopnosti *T. canis* indukovat Th2 odpověď v hostiteli, jelikož dochází k zvýšení produkce cytokinu IL-4 a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), které jsou spojovány právě s Th2 odpovědí. V oblasti nádorů bylo také pozorováno snížené zastoupení protinádorových CD8⁺ T lymfocytů a zvýšené zastoupení F4/80 makrofágů (Ruiz-Manzano et al., 2020). Opačný efekt byl pozorován při aplikaci antigenů vajíček *T. canis*; u takto stimulovaných BALB/c myši došlo k potlačení růstu nádorů fibrosarkomové linie WEHI-164 (Darani et al., 2009).

U některých druhů helmintů je přímo potvrzen kancerogenní efekt a tři druhy jsou klasifikovány jako karcinogeny 1. skupiny u člověka. Jedná se o motolice rybožravých savců *Opisthorchis viverrini* a *Clonorchis sinensis*, jejichž infekce může vést u lidí ke vzniku

cholangiokarcinomu. Třetím druhem je lidská motolice *Schistosoma haematobium*, která podněcuje vznik spinocelulárního karcinomu močového měchýře (IARC, 1994). Dalšími potenciálně kancerogenními helminty jsou blízké příbuzné druhy těchto motolic. *Schistosoma japonicum* a *S. mansoni* jsou například spojovány s karcinomem tlustého střeva (Qiu et al., 2005; Zalata et al., 2005). Další z opisthorchidních motolic, která je spojována s cholangiokarcinomem jater, je *Opisthorchis felinus* (Pakharukova & Mordvinov, 2016). Zvýšený růst nádorů byl pozorován také u myši s CAC, kterým byla aplikována hlístice *Heligmosomoides polygyrus* (Pastille et al., 2017).

2.1.5. *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*)

M. corti je tasemnice, která také patří do řádu Cyclophyllidea a má dosud ne zcela objasněný tříhostitelský cyklus. Dospělci parazitují ve střevech šelem a prvním mezihostitelem jsou pravděpodobně roztoči nebo jiný koprofágní hmyz. Druhým mezihostitelem jsou hlodavci, u kterých se v podkoží nebo peritoneální dutině nacházejí larvy zvané tetrathyridia. Tyto larvy mají stejně jako cysticerky *T. crassiceps* schopnost asexuálního rozmnožování. Tasemnice vykazuje též nízké nebezpečí infekce člověka a poskytuje možnost dlouhodobé kultivace *in vitro* (Vendelová et al., 2016), což z ní dělá vhodný potenciální laboratorní model.

Na rozdíl od výše popsaných druhů však nebyl vliv *M. corti* na nádorová onemocnění nikdy studován. Byl u něj však nalezen Tk antigen („zkrácený“ sacharidový antigen) asociovaný s některými typy nádorových buněk (Ubillos et al., 2007). V jednom případě byla použita infekce *M. corti* v BALB/c myších za účelem vyvolání eosinofilie. Takto aktivované eosinofily byly poté izolovány a vykazovaly schopnost indukovat apoptózu buněk nádorové lymfomové linie A20 *in vitro* (Costain et al., 2001).

3. Materiál a metodika

3.1. Experimentální modely

Pro vypracování této diplomové práce bylo potřeba v laboratoři zavést vhodnou kombinaci modelových organismů a nádorové linie za účelem testování vlivu helmintů na nádorová onemocnění.

3.1.1. Odchyt hlodavců

Odchyt hlodavců za účelem získání helmintů jako laboratorních modelů byl prováděn do standardních sklapovacích pastí na myši na několika lokalitách v Česku (Obr. 1). Jako návnada byly použity běžně dostupné potraviny (sýr, uzeniny). Lokality byly vybrány na základě předpokládaného výskytu hostitelů *M. corti* a *T. crassiceps* a odchyty byly prováděny od června do září. Při jednodenních výjezdech byly pasti kladeny večer a druhý den ráno byly odchycení hlodavci převezeni k pitvám do laboratoře, v případě vícedenních odchytů byly pasti kontrolovány minimálně 3x denně a pitvy byly prováděny na místě. V případě nálezu hledaných druhů helmintů, by byly injekčně vpraveny do připravených BALB/c myší, které byly brány na vícedenní odchty. Odchycení hlodavci byli pitváni se zaměřením na výskyt tkáňových/dutinových helmintů, bylo proto prozkoumáno peritoneum, játra, hrudní dutina a podkoží.

3.1.2. Experimentální hostitelé

Jako experimentální model hostitele bylo použito několik kmenů myší. Kmen BALB/c byl používán k pasážování a udržení larev tasemnic v laboratorním „cyklu“ a tyto myši byly chovány ve zvěřinci katedry parazitologie. Pro *in vivo* experimenty s tasemnicemi a nádorovými buňkami byly nejdříve použity myši kmene BALB/c, které byly poté nahrazeny inbredním kmenem C57BL/6JOlaHsd (AnLab) a outbredním kmenem Hsd:ICR (CD-1®) (AnLab). Ve všech případech byly použity samice ve věku 6-9 týdnů. Tyto myši byly chovány v Centru pro experimentální biomodely (1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova). V obou případech byly myši umístěny v konvenčních kójích (12/12 světelný režim, přístup ke krmení a vodě *ad libitum*, 23 °C a 55% vzdušná vlhkost).

3.1.3. Použité modely helmintů

Mesocestoides literratus

Tento druh byl izolován z podkoží *Microtus arvalis* a *Apodemus flavicollis* odchycených na terénním cvičení studentů na Rudě v roce 2018. Larvy získané z hlodavců byly injekčně vpraveny do peritoneální dutiny BALB/c myši. *M. literratus* však nebyl vhodný jako modelový organismus, jelikož se jeho larvy ani po několikanásobném pasážování asexuálně nemnožily, proto nebyly v dalších pokusech využity.

Mesocestoides corti (syn. *M. vogae*)

Používaný kmen tasemnice druhu *M. corti* byl darem (Dr. Ruth Fiechter a prof. Peter Deplazes, Institute of Parasitology, University of Zürich, Switzerland). Původní izolát byl získán v roce 2007 od veterinářů z Wedmarku (Německo) a pochází z podkoží *Sciurus vulgaris*. Jelikož je tento druh schopen asexuální reprodukce v peritoneu myši, je udržován v laboratorním „cyklu“ pasážováním v BALB/c myších.

Taenia crassiceps

V současné době jsou v laboratoři drženy tři izoláty larev *T. crassiceps*. Dva byly darem (prof. Pierre Dorny, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium). Belgický izolát pochází od Janssen Pharmaceutica v Beersu, je neznámého původu a byl držen v laboratorních podmínkách minimálně 15 let. Druhý pochází z Francie (Maisons Alfort), byl získán z *Lemur catta* a je držen v laboratorních podmínkách od roku 2012. Poslední izolát pochází z podkoží *Microtus arvalis*, který byl odchycen na Rudě v roce 2019. Všechny tři izoláty byly schopny asexuálního množení pučením a jsou udržovány v laboratorním „cyklu“ pasážováním v BALB/c myších.

3.1.4. Pasážování

Infikované myši byly usmrceny cervikální dislokací, poté jim byla otevřena peritoneální dutina a pomocí plastové pipety odebrány larvy tasemnic do sterilního fyziologického roztoku. Odebrané tasemnice byly poté alespoň pětkrát propláchnuty fyziologickým roztokem a pomocí injekčních stříkaček vpraveny do peritonea nové myši. U *M. corti* byla infekční dávka 600 tetrathyridií v 1 ml fyziologického roztoku a použita jehla velikosti G21,

u *T. crassiceps* byla infekční dávka 30 cysticerků v 1 ml fyziologického roztoku a jehla velikosti G16. Vždy po třech měsících byly myši usmrceny cervikální dislokací a izolované larvy tasemnic byly použity pro další infekce.

3.1.5. Model nádorového onemocnění

Jako modelové nádorové onemocnění byla použita myší melanomová linie buněk B16F10 (3.3.2.), která nám byla poskytnuta v rámci spolupráce s laboratoří doc. Jana Brábka v BIOCEVu. Tato komerčně dostupná buněčná linie je původně izolována z melanomu myší kmene C57BL/6.

3.2. Histologické hodnocení

3.2.1. Zpracování vzorků

Odebrané vzorky byly opláchnuty ve fyziologickém roztoku a fixovány ve 4% neutrálním formaldehydu či Bouinově roztoku (Sigma-Aldrich). Větší orgány byly rozděleny na části o velikosti přibližně 1 cm³, a poté ponechány ve fixáži po dobu 48 hodin při pokojové teplotě. V případě Bouinova roztoku bylo potřeba ještě vzorky před zalitím 6x promýt 70% EtOH po jedné hodině a poté je ponechat v 70% EtOH přes noc.

3.2.2. Zalití do parafínových bločků

Po fixování byly vzorky zality do parafínových bločků (Surgipath Paraplast, SIGMA-ALDRICH). Postup byl následující:

1. Propláchnutí – 70% EtOH - 3x 15 minut
2. Odvodnění
 - i. 70% EtOH – 3x 30 minut
 - ii. 96% EtOH – 3x 30 minut
 - iii. 100% EtOH – 3x 30 minut
3. Projasnění – xylen – 2x 15 minut
4. Prosycení – xylen-parafín – 15 minut
5. Parafín I – 1 hodina při 56 °C
6. Parafín II – 12 hodin při 56 °C
7. Parafín III – 1 hodina při 56 °C
8. Zalití do formy s parafínem

Po zalití do forem byly bločky ponechány 1 hodinu na ledové lázni a poté 3 hodiny v pokojové teplotě tak, aby ztuhly a byly vyjmuty. Před krájením bylo vhodné nechat bločky 30 minut chladit v -20 °C. Bločky byly krájeny na rotačním mikrotomu (Shandon Finesse) na 5µm tenké řezy a přenášeny na hladinu vody ohřáté na 37 °C a následně na podložní sklo.

3.2.3 Barvení

Pro histologické hodnocení změn způsobených larvami tasemnic a průkaz metastázujících melanomových buněk bylo vyzkoušeno několik metod histologického barvení. Obecný postup byl následující:

1. Odparafínování

- I. Xylen I – 10 minut
- II. Xylen II – 10 minut

2. Zavodnění

- I. 100% EtOH – 3 minuty
- II. 96% EtOH – 3 minuty
- III. 70% EtOH – 3 minuty
- IV. Destilovaná voda – 3 minuty

3. Barvení – rozepsáno jednotlivě dále

4. Odvodnění

- I. 70% EtOH – 3 minuty
- II. 96% EtOH – 3 minuty
- III. 100% EtOH – 3 minuty

5. Projasnění

- I. Xylen I – 1 minuta
- II. Xylen II – 1 minuta

Po projasnění xylenem byly všechny řezy zamontovány do kanadského balzámu. Hotové řezy byly prohlíženy pod mikroskopem (Olympus BX51) a získané fotografie byly zpracovány v programu QuickPHOTO MICRO 3.0 (Promicra).

Použitá barvení

Hematoxylin-eosin

Ehrlichův kyselý hematoxylin

- Hematoxylin – 5 g
- 96% EtOH – 100 ml
- Destilovaná voda – 100 ml
- Ledová kyselina octová – 10 ml
- Glycerin – 100 ml
- Síran hlinito-draselný – 3 g

Eosin Y

- Eosin Y – 1 g
- 96% EtOH – 100 ml

Postup:

1. Hematoxylin – 5 minut
2. Promytí vodovodní vodou
3. Eosin Y – 1 minuta

Malloryho trichrom

Roztok A

- Kyselý fuchsin – 1 g
- Destilovaná voda – 100 ml

Roztok B

- Kyselina fosfomolybdenová – 1 g
- Destilovaná voda – 100 ml

Roztok C

- Orange G – 2 g
- Methylová modř – 0,5 g

- Kyselina šťavelová – 2 g
- Destilovaná voda – 100 ml

Postup:

1. Roztok A – 5 minut
2. Promytí destilovanou vodou – 5 minut
3. Roztok B – 5 minut
4. Promytí destilovanou vodou – 2 minuty
5. Roztok C – 20 minut
6. Promytí destilovanou vodou – 5 minut

Gomoriho trichrom

Roztok A

- Chromotrope 2R – 0,6 g
- Fast green FCF – 0,3 g
- Kyselina fosfowolframová – 0,6 g
- Ledová kyselina octová – 1 ml
- Destilovaná voda – 99 ml

Roztok B

- Ledová kyselina octová – 0,2 ml
- Destilovaná voda – 100 ml

Postup:

1. Roztok A – 15 minut
2. Destilovaná voda – 1 minuta
3. Roztok B – 2 minuty

V případě Gomoriho trichromu byla doba odvodňování zkrácena na pouhá tři rychlá ponoření do 70%, 96% a 100% EtOH, jelikož docházelo velmi rychle k vymývání barvy.

3.3. In vivo experimenty

3.3.1. Intravenózní aplikace B16F10 buněk

Myši kmene BALB/c infikované tasemnicemi byly umístěny do fixační komůrky, která jim bránila v pohybu. Ocásek myši byl na několik minut ponořen do nádoby s teplou vodou, aby došlo k dilataci žil. Pak byl dezinfikován 70% etanolem (EtOH) a do jedné z laterálních ocasních žil byla zavedena (přibližně v jedné třetině délky ocasu od jeho kořene) jehla inzulinové stříkačky (Omnican) a vpraveno 5×10^5 B16F10 buněk v 0,2 ml sterilního PBS. Dále byly odebrány játra a plíce, pořízena jejich fotodokumentace a makroskopicky hodnocen výskyt metastáz; poté byly tyto orgány fixovány ve 4% neutrálním formaldehydu či Bouinově roztoku (Sigma-Aldrich) pro histologické hodnocení.

3.3.2. Kombinované peritoneální aplikace tasemnic a B16F10 buněk

Myši BALB/c, byly infikovány larvami tasemnic stejným způsobem jako při pasážování (3.1.4.). Následně jim bylo po 14 dnech od infekce tasemnicemi do peritoneální dutiny vpraveno 5×10^5 , v pozdějších experimentech 3×10^5 , melanomových buněk B16F10 v 0,5 ml PBS pomocí inzulinové injekční stříkačky (Omnican). Po 4 týdnech, v pozdějších experimentech 3 týdnech, byly myši usmrceny cervikální dislokací. Následně byly myši pitvány a dokumentován stav peritonea. Odebraná krev byla stočena a sérum zmrazeno v -80 °C. Dále byly odebrány játra a plíce, pořízena jejich fotodokumentace a makroskopicky hodnocen výskyt metastáz; poté byly tyto orgány fixovány ve 4% neutrálním formaldehydu či Bouinově roztoku (Sigma-Aldrich) pro histologické hodnocení.

Veškerá práce se zvířaty probíhala pod dohledem držitele osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů v souladu s § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

3.4. Kultivace

3.4.1. Kultivace tasemnic

Izolované larvy tasemnic byly přeneseny do sterilní kádinky a minimálně 8x propláchnuty sterilním fyziologickým roztokem. Po dalších dvou propláchnutích DMEM médiem (Lonza) byly přeneseny do kultivačních lahví (Eppendorf) o objemu 75 cm³, a to v případě *M. corti* přibližně 2000 tetrathyridií a u *T. crassiceps* 300 cysticerků na lahev. Poté bylo přidáno

20 ml média DMEM ohřátého na 37 °C. Všechny úkony byly prováděny sterilně v laminárním boxu (Esco). Kultivační lahve byly následně vloženy do inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5 % CO₂. Kultivační médium bylo měněno každé dva dny a lahve byly kontrolovány pod mikroskopem (Olympus IX50) na přítomnost kontaminace. Stejný postup byl použit také při kultivaci v RPMI médiu (Lonza).

V případě anaerobní kultivace byly lahve ještě umístěny do neprodyšně uzavíratelných plastových pytlíků, spolu se sáčky Anaerogen (Oxoid) absorbujícími kyslík.

Média pro kultivaci larev tasemnic

Pro kultivaci larev tasemnic byla použita dvě základní média: RPMI 1640 bez L-glutaminu s fenolovou červení (Lonza) a DMEM „high glucose“ (Lonza). Pro potřeby dlouhodobé kultivace byla média obohacena o 10% inaktivované fetální bovinní sérum (FBS) (Labtech), 100 U/ml penicilin-streptomycin (Lonza), 2 mM L-glutamin (Lonza) a 50 mM 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich). Všechna aditiva kromě 2-merkaptoetanolu byla před přidáním sterilně přefiltrována přes 0,2 µm filtr (Sigma-Aldrich). Média byla uchovávána ve 4 °C a před použitím byla ohřata na 37 °C.

3.4.2. Kultivace melanomové linie B16F10

Kultury B16F10 buněk byly připravovány ze zmražených alikvót a kultivovány v Petriho miskách v médiu pro kultivaci B16F10 buněk (viz níže). Po vytvoření souvislé vrstvy buněk (konfluente) tedy přibližně každé 3 dny, bylo odsáto médium a přidán 1 ml roztoku trypsin-EDTA (Sigma Aldrich). Ten byl odsát a byl přidán další 1 ml roztoku trypsin-EDTA. Petriho miska byla umístěna na 10 minut do inkubátoru, poté byl roztok trypsin-EDTA odsát a buňky byly uvolněny důsledným promýváním 5 ml čerstvého média pomocí 5ml sérologické pipety. Následně byly odsáty 4 ml buněčné suspenze z Petriho misky a zbytek doplněn 10 ml čerstvého média pro kultivaci B16F10 buněk. Veškeré úkony byly prováděny sterilně v laminárním boxu. Buňky byly následně umístěny do inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Médium pro kultivaci B16F10 buněk

Pro kultivaci B16F10 buněk bylo použito médium DMEM obohacené o 10% inaktivované FBS a ciproflaxacin (Sigma-Aldrich), přefiltrované přes 0,2 µm filtr (Sigma-Aldrich). Médium bylo uchováváno ve 4 °C a před použitím bylo ohřato na 37 °C.

3.5. *In vitro* metody

3.5.1. Izolace exkrementně-sekrecčních produktů larev tasemnic

Exkrementně-sekrecční (ES) produkty tasemnic byly získány pomocí kultivace. Larvy tasemnic byly získány a připraveny stejně jako je popsáno v kapitole 3.3.1., bylo k nim však přidáno pouze čisté médium bez aditiv. Tasemnice byly takto kultivovány maximálně 2 týdny. Během této doby bylo každý druhý den odebíráno médium pomocí injekční stříkačky a následně filtrováno přes 0,2 µm filtr (Sigma-Aldrich). První várka médií nasbíraná po dvou dnech od začátku nebyla použita, následující dny získaná média s ES produkty byla uchovávána v -20 °C. Po dvou týdnech byla nasbíraná média slita dohromady a koncentrována pomocí centrifugačních filtrů (Merck-Millipore) s „cut-off“ hodnotou 10 kDa. Média byla centrifugována při 4000 g po dobu 15 minut. Výsledná koncentrace proteinů byla měřena pomocí Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) dle pokynů výrobce. Koncentrované ES produkty byly do dalšího použití uchovány v -80 °C.

3.5.2. Měření viability B16F10 buněk pomocí alamarBlue

B16F10 buňky byly trypsinizovány přidáním 1 ml roztoku trypsin-EDTA do Petriho misky na 10 minut. Následným odsátím roztoku trypsin-EDTA a nahrazením médiem pro kultivaci B16F10 buněk byla vytvořena buněčná suspenze, u níž byla stanovena koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Počet buněk v suspenzi byl upraven koncentrací stočením a odsátím média, či naředěním médiem na požadované hodnoty 5 000 a 10 000 buněk na 100 µl. Poté byly buňky rozděleny do 96 jamkové destičky; do každé jamky bylo přidáno 100 µl buněčné suspenze. Destička byla několik hodin ponechána v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂, aby mohlo dojít k adhezi buněk na dno jamek, poté bylo médium odebráno a nahrazeno 90 µl média obsahujícího různé koncentrace ES produktů tasemnic. Po různě dlouhé době stimulace buněk ES produkty bylo do jamek přidáno 10 µl alamarBlue (Invitrogen), následně byla po 4 a 8 hodinách měřena absorbance v jednotlivých jamkách při 570 nm na přístroji Infinite 200pro (Tecan). AlamarBlue má při aplikaci v oxidované formě modrou barvu, rostoucí buňky vytváří redoxní prostředí, které mění indikátor na redukovanou červenou; při inhibici růstu se prostředí mění na oxidační a alamarBlue zůstává modrý.

3.5.3. 3D kultivace sferoidů B16F10

3D kultivace sferoidů umožňuje sledování migrace buněk v trojrozměrném prostředí, v tomto případě kolagenové matrix.

Příprava sferoidů pro 3D kultivaci

Pro přípravu sferoidů, kulovitého shluku B16F10 buněk, byla použita speciální forma „MicroTissues 3D Petri Dish micro-mold“ (Merc). Do sterilní formy byla opatrně vpravena 2% agaróza, která se nechala 15 minut ztuhnout. Hotová agarová forma se vyklopila do 12 jamkové destičky a byla zalita 2 ml média pro kultivaci B16F10 buněk, které bylo následně odsáto a nahrazeno 2 μ l buněčné suspenze s 500 000 buňkami. Forma se nechala 20 minut stát a poté byla opatrně doplněna 2 ml media. Takto připravená agarová forma se nechala 2 dny v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂, během čehož došlo k vytvoření sferoidů.

Příprava kolagenu pro kolagenovou matrix

Složení 1% kolagenu:

- 1 díl 4% kolagenu v kyselině octové
- 1 díl média s ES produkty tasemnic
- 2 díly premixu média pro kolagen (2x koncentrované DMEM)

Jednotlivé komponenty byly drženy neustále v ledové lázni, následně byly smíchány dohromady a byl přidán NaOH, dokud nedošlo ke změně barvy ze žluté zpět na barvu média. Na dno jamek 96 jamkové destičky bylo nanášeno 50 μ l kolagenu.

3D kultivace

Do středu kolagenové vrstvy v každé jamce byl nanášen sferoid vyklepnutý z formičky a opatrně zalit 100 μ l dalšího kolagenu tak, aby nedošlo k jeho odplavení na okraj jamky. Po 30 minutách byl kolagen zalit 100 μ l kultivačního média. Sferoidy byly ihned foceny, aby byl zachycen původní stav a následně byly sferoidy foceny i několik nadcházejících dní na THUNDER Imager 3D system (Leica).

3.5.4. „Scratch“ test

Dobře narostlé buňky B16F10 z Petriho misky byly trypsinizovány a resuspendovány do 16 ml čerstvého média pro kultivaci B16F10 buněk. 12 ml této suspenze bylo rozděleno po 0,5 ml do 24 jamkové destičky a buňky se nechaly narůst do 80% konfluence (48 hodin). Do takto namnožených buněk byla poté žlutou špičkou pipety udělána rýha, po důsledném protřepání bylo odsáto médium s uvolněnými buňkami a bylo přidáno čerstvé s koncentrovanými ES produkty tasemnic. Byl vyfocen aktuální stav a poté byly jamky foceny každých 24 hodin po 3 dny, na THUNDER Imager 3D system (Leica).

3.6. Průtoková cytometrie

3.6.1. Peritoneální laváž

Myším usmrceným cervikální dislokací byla opatrně rozstřižena kůže na ventrální straně těla bez poškození stěny peritoneální dutiny. Přes tukové těleso bylo injekční stříkačkou s jehlou o velikosti G21 do břišní dutiny vpraveno 15 ml PBS vychlazeného na 4 °C. Poté byla myším promasírována naplněná peritoneální dutina, aby došlo k uvolnění buněk. Následně bylo jehlou zavedenou na levou stranu vedle jater aspirováno PBS spolu s buňkami a přes 70 µm sítko přefiltrováno do 50ml zkumavek typu Falcon chlazených na ledové lázni.

3.6.2. Příprava buněk pro průtokovou cytometrii

Aspiráty z peritoneální dutiny ve zkumavkách typu Falcon byly doplněny PBS na 25 ml a stočeny 10 minut na 170 g v centrifuze vychlazené na 4 °C. Supernatant byl vylit a sediment resuspendován v 5 ml lyzačního pufru (pH 7,2) pro odstranění erytrocytů. Následně byly vzorky inkubovány 5 minut v pokojové teplotě a centrifugovány 5 minut při 170 g, promyty PBS a resuspendovány v 1,5ml mikrozkušavkách. Následně byla přidána protilátka anti-CD16/32 (eBioscience, klon 93) pro zablokování nespecifických vazeb, a to v koncentraci 1:100, a buňky byly inkubovány s protilátkou 10 minut na ledu. Poté byl sediment resuspendován v PBS a přidán „master mix“ protilátek proti povrchovým antigenům (viz Tab. 1). Buňky byly inkubovány s protilátkami na ledové lázni 30 minut ve tmě a následně dvakrát promyty PBS (3 minuty, 170 g). Po resuspendování sedimentů v PBS byly buňky přeneseny do 5ml plastových zkumavek (ThermoFisher) určených pro průtokový cytometr. 10 minut před začátkem měření bylo do zkumavek přidáno Hoechstovo barvivo

33258 (Sigma) v koncentraci 1:20 000 pro označení mrtvých buněk. Neznačené vzorky byly ponechány pouze v PBS.

Tab. 1: Protilátky pro značení povrchových markerů imunitních buněk

Specifita	Výrobce	Klon	Fluorochrom	Výsledná koncentrace
CD45	eBioscience	30F11	APC-eFluor 780	1:100
CD11b	Biolegend	M1/70	Pe-Cy7	1:100
CD115	Biolegend	AFS98	PE	1:100
MHC-II	Biolegend	M5/114	PerCP-Cy5.5	1:100
F4/80	Biolegend	BM8	FITC	1:100
CD86	Biolegend	GL-1	APC	1:80

3.6.3. Měření na průtokovém cytometru

Měření probíhala na přístroji BD LSRII v cytometrické servisní laboratoři PŘF UK. CST kontrola a správná kalibrace před každým měřením byla zajišťována MVDr. Jozefem Jandou, Ph.D., zároveň byla provedena vlastní kontrola pomocí „Rainbow calibration particles“ (Spherotech). Analýza dat byla provedena pomocí programu FlowJo 10.6.2. (FlowJo).

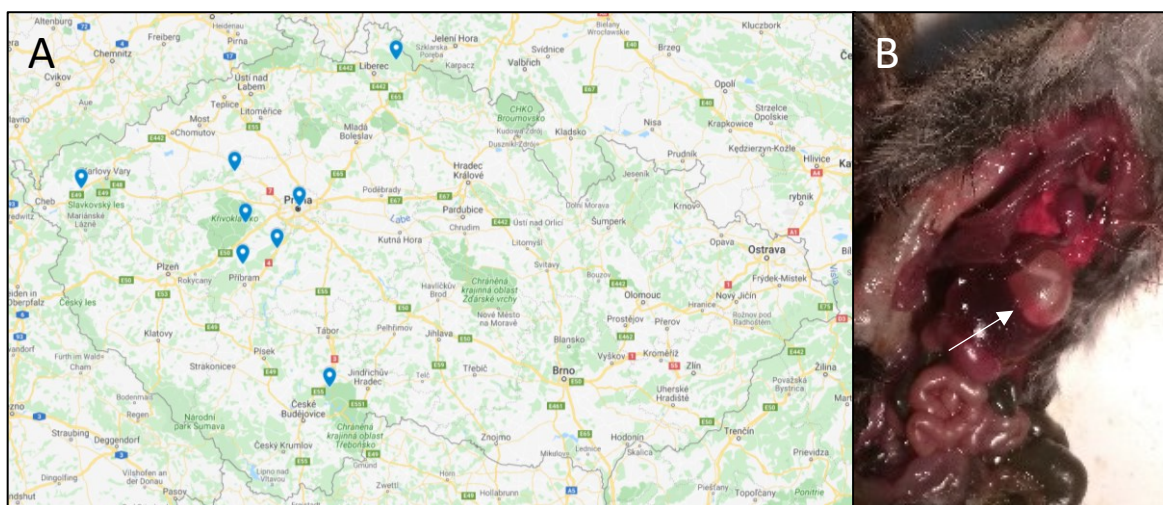
4. Výsledky

4.1. Zavedení nových laboratorních modelů

Jelikož se naše laboratoř zabývá především ptačími motolicemi a v rámci diplomové práce bylo zvoleno nové téma, bylo potřeba zavést také nové vhodné laboratorní modely helmintů s tím, že by mělo jít o druhy tasemnic s nízkou pravděpodobností infikování člověka. Zároveň bylo potřeba vybrat druhy, které je možno dlouhodobě držet v „laboratorním cyklu“, aby byl zajištěn dostatek materiálu pro následující experimenty. Vytipovány proto byly tasemnice druhu *M. corti* a *T. crassiceps*.

4.1.1. Odchyt hlodavců

V rámci terénní části bylo na 8 lokalitách (Obr. 1A) odchyceno celkem 97 drobných hlodavců, jednalo se o zástupce *Microtus arvalis* a *Apodemus* spp. Pouze ve dvou případech byli hlodavci infikováni tkáňovými helminty. V obou případech se jednalo o strobilocerky v hrudní dutině *Microtus arvalis*, náležící pravděpodobně tasemnici druhu *Hydatigera taeniaeformis* s ektopickou lokalizací (Obr. 1B).



Obr. 1: Odchyt hlodavců. (A) mapa s vyznačenými lokalitami odchyty hlodavců; (B) strobilocerkus v hrudní dutině *Microtus arvalis*

4.1.2. Modely tasemnic

Mesocestoides literratus

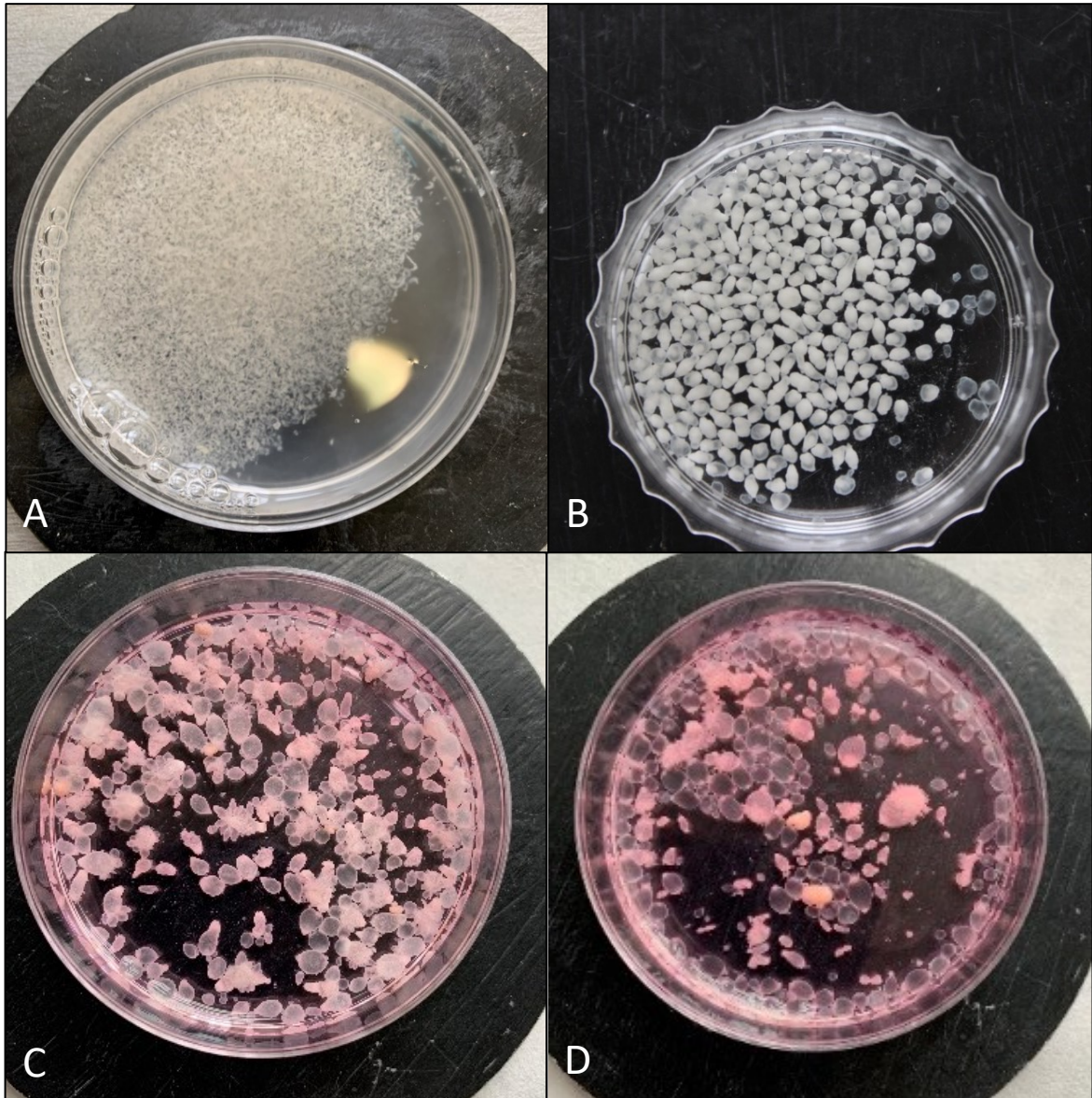
Tetrathyridia rodu *Mesocestoides* byla získána z volně žijících hlodavců, kteří byli odchyceni studenty v rámci terénního cvičení na Rudě. Pomocí sekvenace, na základě podobnosti genu pro cytochromoxidázovou podjednotku 1 (CO1), byly určeny jako *M. literratus*. Dva izoláty pocházející z *Microtus arvalis* a *Apodemus flavicollis* byly použity k infikování laboratorních myší kmene BALB/c. Při aplikaci larev do peritoneální dutiny či do podkoží však nedošlo k asexuálnímu rozmnožení tetrathyridií ani po několikanásobném pasážování, docházelo pouze k růstu larev.

Mesocestoides corti

Larvy tasemnice *M. corti* (Obr. 2A) byly úspěšně udržovány pasážováním, a to injikováním do peritoneální dutiny BALB/c myší. Infekcí každé myši 600 larvami bylo možné po třech měsících získat až 8 000 tetrathyridií. Larvy byly v mezihostiteli lokalizovány v játrech a peritoneální dutině.

Taenia crassiceps

Populace všech tří izolátů (viz kapitola 3.1.3.) larev *T. crassiceps* (Obr. 2B, C, D) byly úspěšně udržovány pasážováním, a to injikováním do peritoneální dutiny BALB/c myší. Infekcí každé myši 30 larvami bylo možné po třech měsících získat až 400 cysticerků. Larvy byly po infekci lokalizovány pouze v peritoneální dutině.



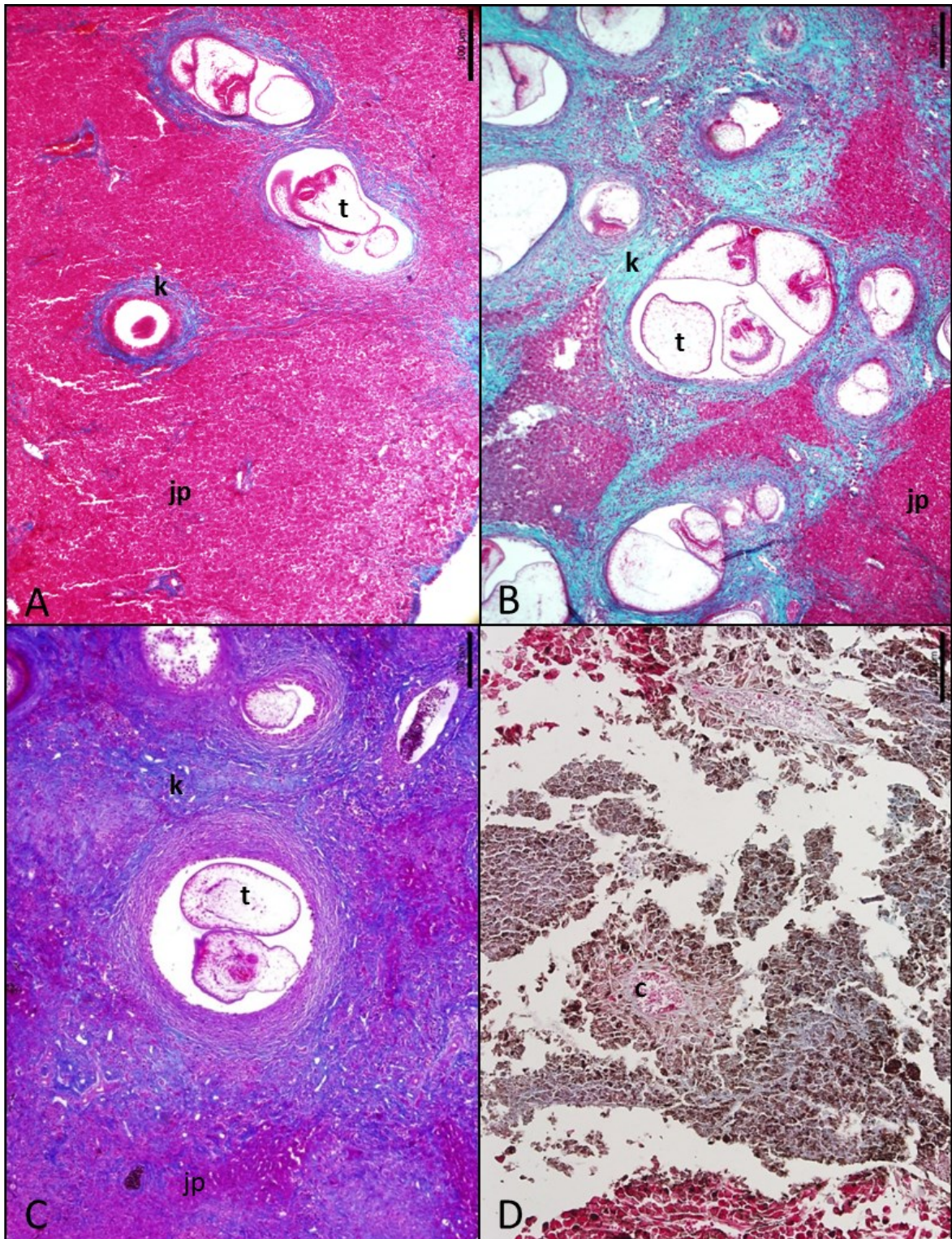
Obr. 2: Fotky larev zavedených modelů tasemnic. (A) tetrathyridia *M. corti*; (B) cysticerky izolátu *T. crassiceps* z Rudy; (C) cysticerky francouzského izolátu *T. crassiceps*; (D) cysticerky belgického izolátu *T. crassiceps*

4.2. Výběr vhodné histologické metody pro následné hodnocení infekcí a koinfekcí

Za účelem hodnocení vlivu infekce *M. corti* na játra myši a výskytu metastázujících melanomových buněk v játrech a plicích bylo vyzkoušeno několik metod histologického barvení. V případě infekce *M. corti* byl měřítkem poškození průkaz zmnožení kolagenu tvořícího kapsule kolem tetrathyridií v játrech. Nejlepší výsledky byly dosaženy použitím Malloryho a Gomoriho trichromu (Obr. 3A, C). Pro detekci melanomových buněk ve tkáni se nejlépe osvědčil Gomoriho trichrom (Obr. 3D), který byl poté použit pro barvení všech histologických řezů.

Po intraperitoneální infekci myši larvami *M. corti* docházelo k migraci tetrathyridií z břišní dutiny do jater. Již 14 dní po infekci (dpi) docházelo v játrech k tvorbě kolagenu obklopujícího tetrathyridia (Obr. 3A) a v této fázi se také začínala tetrathyridia ve zvýšeném počtu opět vyskytovat v peritoneální dutině. 30 dpi bylo pozorováno poškození jater, která vykazovala značnou míru fibrotizace v důsledku tvorby kolagenových kapsulí kolem larev. Na histologických řezech lze pozorovat až 50% nahrazení jaterní tkáně kolagenem (Obr. 3B). I přes toto zjevné poškození jater myši nevykazovaly viditelné změny zdravotního stavu (kachexie, malátnost, apod.).

Melanomové buňky B16F10 u myši v peritoneu netvořily solidní nádory, ale spíše rozpadající se kulovité útvary, u kterých byla pozorována angiogeneze (Obr. 3D). Metastáze v játrech a plicích však tvořily solidní melanomy (Obr. 4A). Diseminované metastázující buňky byly díky tvorbě melaninu poměrně dobře rozpoznatelné od okolní tkáně (Obr. 5D).



Obr. 3: Příklady barvení histologických řezů. (A) histologický řez játry myši 14 dpi *M. corti* barvený Gomoriho trichromem; (B) histologický řez játry myši 30 dpi *M. corti* barvený Gomoriho trichromem; (C) histologický řez játry myši 30 dpi *M. corti* barvený Malloryho trichromem; (D) histologický řez melanomem z peritonea myši barvený Gomoriho trichromem; k – kolagen; t – tetrathyridium; jp – jaterní parenchym; c – céva

4.3. Vliv infekce larvami tasemnic na nádorová onemocnění

Vliv tkáňových helmintů na nádorová onemocnění byl zkoumán za využití larev tasemnic *M. corti* a *T. crassiceps*, které se úspěšně povedlo zavést jako nový model v naší laboratoři. Po navázání spolupráce s laboratoří doc. Jana Brábka byla jako model pro nádorové onemocnění použita myší melanomová linie B16F10.

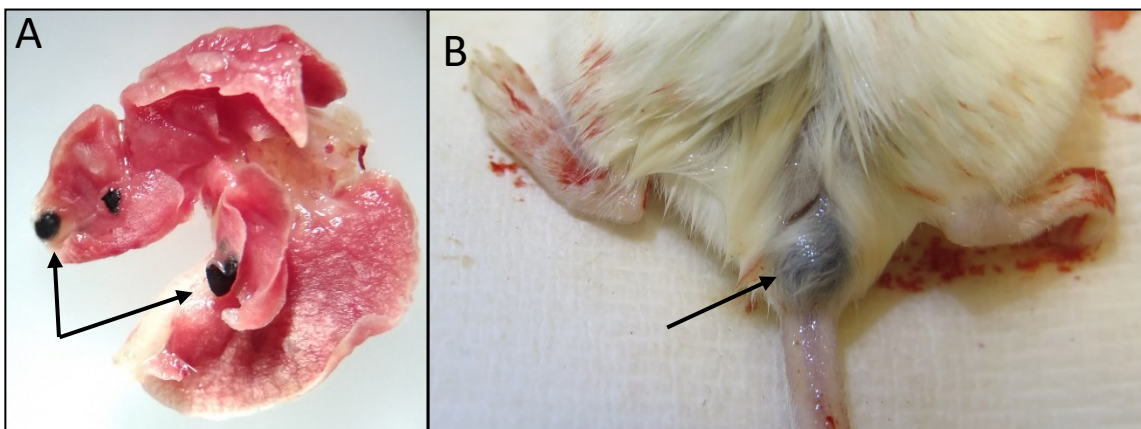
4.3.1. Intravenózní aplikace B16F10 buněk

Myším kmene BALB/c infikovaným 600 larvami *M. corti* bylo 14 dpi aplikováno 5×10^5 B16F10 buněk do ocasní žíly. Kontrolní skupině byly aplikovány pouze nádorové buňky. Myši byly usmrceny 28 dní po aplikaci melanomových buněk. V těchto experimentech byly myši infikovány pouze larvami *M. corti*, jelikož *T. crassiceps* ještě nebyla k dispozici.

Tab. 2: Výskyt melanomů a metastázujících buněk po intravenózní aplikaci 5×10^5 B16F10 buněk u BALB/c myší infikovaných *M. corti*: (+) méně než 5 melanomů; (++) 5-10 melanomů; (+++) více než 10 melanomů; (*) přítomnost metastázujících buněk ve tkáni; Mc – *M. corti*

Počet myší	Melanom			Metastázující buňky	
	ocas	játra	plíce	játra	plíce
BALB/c					
15 B16F10	+	-	-	-	-
15 B16F10 + Mc	+	-	+	-	*

Po makroskopickém ohledání (Tab. 2) byly u 5 myší infikovaných *M. corti* nalezeny melanomy v plicích (Obr. 4A) a na histologických řezech byly nalezeny metastázující melanomové buňky, u kontrolní skupiny nebyly nalezeny žádné. Játra byla u obou skupin bez nádoru a na histologických řezech nebyly nalezeny metastázující buňky (Tab. 2). U obou skupin myší však došlo k vytvoření melanomů na bázi ocasu (Obr. 4B), a to pravděpodobně z důvodu nedokonale provedené aplikace buněk.



Obr. 4: Melanomy vytvořené po intravenózní aplikaci B16F10 buněk ICR myším. (A) melanomy v plicích u myši infikované *M. corti*; (B) melanom na bázi ocasu

4.3.2. Intraperitoneální aplikace B16F10 buněk

Kvůli standardizaci množství nádorových buněk aplikovaných do myší byla zvolena injekční aplikace do peritoneální dutiny. Do pokusů byly později, namísto myší kmene BALB/c, zařazeny myši ICR jako příklad outbredního kmene a myši C57BL/6J jako příklad inbredního kmene, ze kterého jsou původně izolovány melanomové buňky B16F10.

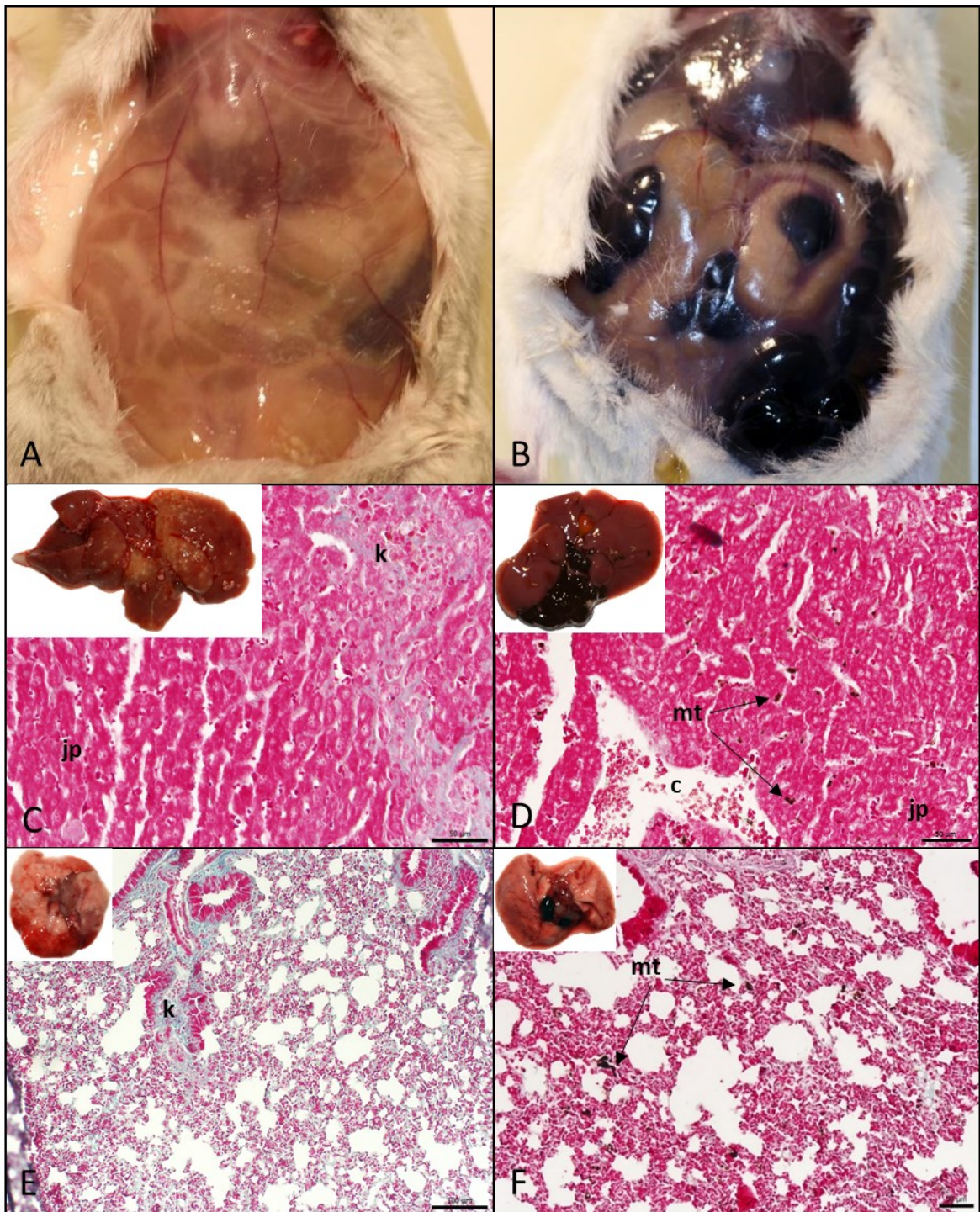
Intraperitoneální aplikace B16F10 buněk BALB/c myším infikovaným *M. corti*

Myším kmene BALB/c infikovaným 600 larvami *M. corti* bylo 14 dpi aplikováno 5×10^5 B16F10 buněk do peritoneální dutiny. Kontrolní skupině byly aplikovány pouze nádorové buňky. Myši byly usmrceny 28 dní po aplikaci melanomových buněk.

Tab. 3: Výskyt melanomů a metastázujících buněk po intraperitoneální aplikaci 5×10^5 B16F10 buněk u BALB/c myši: (+) méně než 5 melanomů; (++) 5-10 melanomů; (+++) více než 10 melanomů; (*) přítomnost metastázujících buněk ve tkáni; **Mc – *M. corti***

Počet myši	Melanom			Metastázující buňky	
	peritoneum	játra	plíce	játra	plíce
5 B16F10	++	++	+	*	*
5 B16F10 + Mc	-	-	-	-	-

Po makroskopickém ohledání (Tab. 3) nebyly u žádné z myši infikovaných *M. corti* nalezeny žádné melanomy v břišní dutině. Plíce a játra byla rovněž bez melanomů a na histologických řezech nebyly nalezeny žádné metastázující melanomové buňky (Obr. 5A, C, E). U kontrolní skupiny došlo ve všech případech k tvorbě mnohočetných ložisek melanomových buněk v peritoneální dutině a na povrchu jater. U 3 myši byly nalezeny makroskopické melanomy v plicích. Histologické řezy odhalily metastázující melanomové buňky volně diseminované ve tkáni jater i plic (Obr. 5B, D, F).



Obr. 5: Výskyt melanomů a metastázujících buněk po intraperitoneální aplikaci 5×10^5 B16F10 buněk u BALB/c myši. (A) peritoneum myši infikované *M. corti* bez melanomů; (B) peritoneum neinfikované myši s melanomy; (C) játra a histologický řez játry myši infikované *M. corti*; (D) játra a histologický řez játry neinfikované myši; (E) plíce a histologický řez plícemi myši infikované *M. corti*; (F) plíce a histologický řez plícemi neinfikované myši; k – kolagen; jp – jaterní parenchym; c – céva; mt – metastázující melanomové buňky

Intraperitoneální aplikace B16F10 buněk C57BL/6J myším infikovaným *M. corti* či *T. crassiceps*

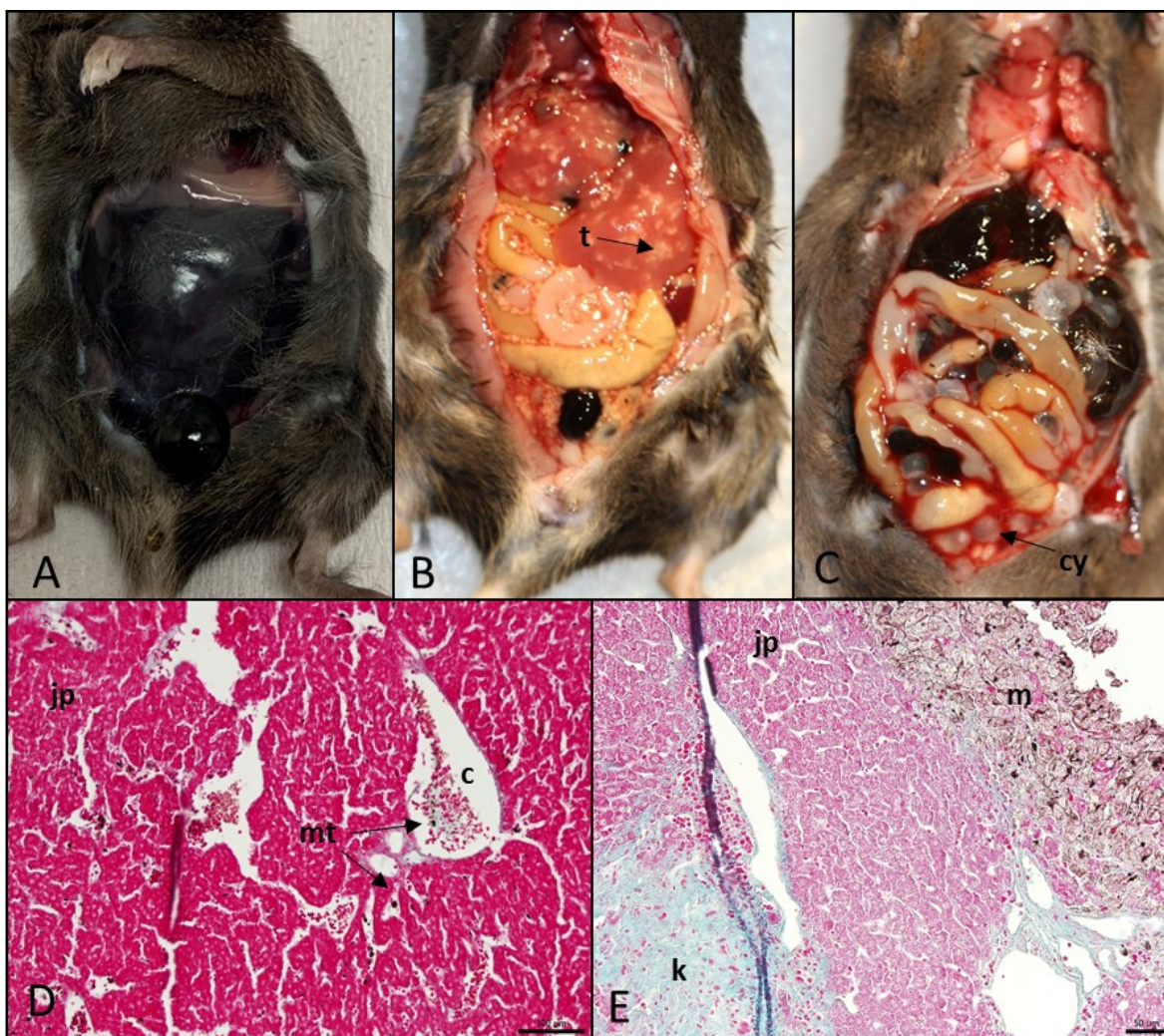
Jedna skupina myší kmene C57BL/6J byla infikována 600 larvami *M. corti*, druhá byla infikována 30 larvami *T. crassiceps*. Oběma skupinám bylo 14 dpi aplikováno 5×10^5 B16F10 buněk do peritoneální dutiny. Kontrolní skupině byly aplikovány pouze nádorové buňky. Experiment byl ukončen již 26 dní po aplikaci melanomových buněk z důvodů předčasného úhynu myší.

Tab. 4: Výskyt melanomů a metastázujících buněk po intraperitoneální aplikaci 5×10^5 B16F10 buněk u C57BL/6J myší infikovaných *M. corti* či *T. crassiceps*: (+) méně než 5 melanomů; (++) 5-10 melanomů; (+++) více než 10 melanomů; (*) přítomnost metastázujících buněk ve tkáni; **Mc – *M. corti*; **Tc** – *T. crassiceps***

Počet myší	Melanom			Metastázující buňky	
	peritoneum	játra	plíce	játra	plíce
2 B16F10	+++	++	+	*	*
10 B16F10+ Mc	+	+	-	-	-
10 B16F10 + Tc	++	++	+	*	*

V případě tohoto experimentu nebylo provedené kompletní vyhodnocení u 8 myší z kontrolní skupiny, jelikož u nich došlo k předčasnému úhynu. Peritoneální dutina těchto myší byla kompletně vyplněna masou melanomových buněk (Obr. 6A); masivní zmnožení nádorových buněk bylo pravděpodobně příčinou úhynu. Ze stejného důvodu pravděpodobně předčasně uhynula i jedna myš infikovaná *T. crassiceps*. U přeživších dvou myší z kontrolní skupiny měly obě masivní melanomová ložiska v peritoneální dutině a také na povrchu jater (Tab. 4). Jen u jedné myši byly nalezeny makroskopické melanomy v plicích, avšak histologické řezy odhalily metastázující buňky v plicích obou myší (Obr. 6D) a tyto buňky byly nalezeny také v jaterní tkáni. U jedné myši ze skupiny infikované *M. corti* nebyly nalezeny žádné makroskopické melanomy v břišní dutině, játrech ani plicích. Tři myši z této skupiny měly pouze nízký počet drobných (menší než 0,5 cm) melanomů v peritoneu, u zbylých 6 myší byl nalezen nízký počet peritoneálních melanomů (Obr. 6B), které byly střední velikosti (0,5 až 2 cm). Melanomy byly v 9 případech nalezeny také

v játrech, avšak pouze v jednom případě v plicích. Na histologických řezech byly nalezeny melanomové buňky, které však byly lokalizované na okraji jater, a ne volně diseminované ve tkáni (Obr. 6E). U všech myši infikovaných *T. crassiceps* byl vytvořen střední počet melanomů v břišní dutině (Obr. 6C) a také v játrech; melanomy na plicích byly pozorovány pouze u tří jedinců. Metastázující melanomové buňky byly nalezeny ve tkáni jater i plic.



Obr. 6: Peritoneální dutina C57BL/6J myši po intraperitoneální aplikaci 5×10^5 B16F10 buněk. (A) peritoneum neinfikované myši; (B) peritoneum myši infikované *M. corti*; (C) peritoneum myši infikované *T. crassiceps*; (D) histologický řez játry neinfikované myši; (E) histologický řez játry myši infikované *M. corti*; **t** – tetrahyridium; **m** – melanom; **cy** – cysticercus; **k** – kolagen; **jp** – jaterní parenchym; **mt** – metastázující melanomové buňky, **c** - céva

Intraperitoneální aplikace nižšího počtu B16F10 buněk C57BL/6J a ICR myším infikovaným *M. corti* či *T. crassiceps*

Jelikož došlo v předchozím pokusu k předčasnému úhynu myší, bylo sníženo množství aplikovaných melanomových buněk na 3×10^5 a zkrácena doba pokusu. Myši kmenů C57BL/6J a ICR byly infikovány 600 larvami *M. corti* či 30 cysticerky *T. crassiceps*. Všem skupinám bylo 14 dpi injekčně aplikováno 3×10^5 B16F10 buněk do peritoneální dutiny. Kontrolní skupině byly aplikovány pouze nádorové buňky. Myši byly usmrceny 21 dní po aplikaci melanomových buněk.

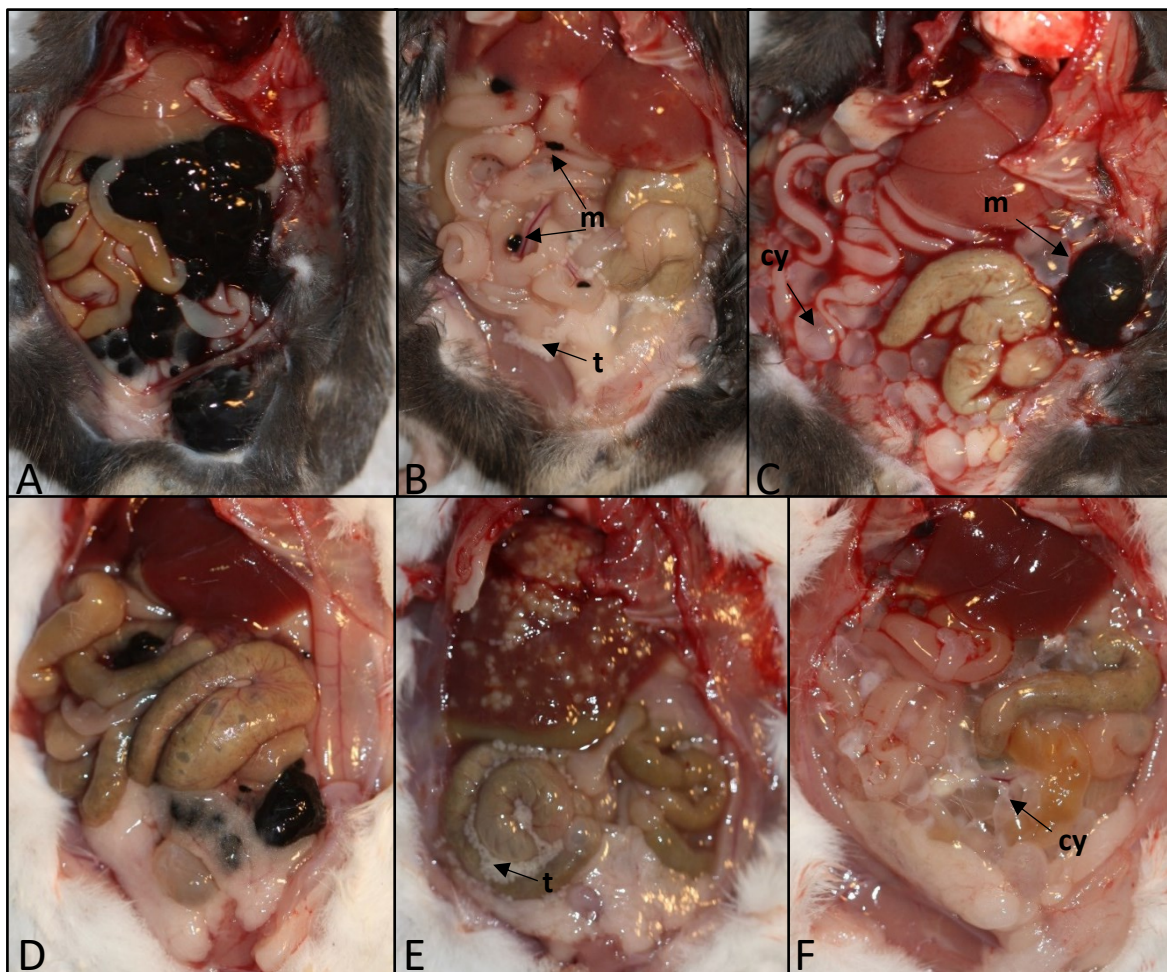
Tab. 5: Výskyt melanomů a metastázujících buněk po intraperitoneální aplikaci 3×10^5 B16F10 buněk u C57BL/6J a ICR myší infikovaných *M. corti* či *T. crassiceps*: (+) méně než 5 melanomů; (++) 5-10 melanomů; (+++) více než 10 melanomů; (*) přítomnost metastázujících buněk ve tkáni; **Mc – *M. corti*; **Tc** – *T. crassiceps***

Počet myší	Melanom			Metastázující buňky	
	peritoneum	játra	plíce	játra	plíce
C57BL/6J					
5 B16F10	+++	+	+	*	*
5 B16F10 + Mc	+	+	-	-	-
5 B16F10 + Tc	+	+	+	*	*
ICR					
5 B16F10	+	+	+	*	*
5 B16F10 + Mc	+	-	-	-	-
5 B16F10 + Tc	-	-	-	-	-

V tomto případě všechny myši přežily do konce pokusu. V případě C57BL/6J myší byly výsledky (Tab. 5) i přes snížený počet aplikovaných nádorových buněk a zkrácení doby experimentu velmi podobné předchozímu experimentu (Tab. 4). U všech myší, kterým byly aplikovány pouze melanomové buňky, došlo k vytvoření vysokého počtu melanomů v peritoneu (Obr. 7A). Melanomy v játrech byly také vždy přítomny, avšak v nižším množství než v předešlém pokusu, a u 4 myší byly pozorovány melanomy v plicích. Na histologických řezech byly nalezeny metastázující buňky v játrech i plicích. V případě myší infikovaných *M. corti* došlo opět u všech k tvorbě nízkého počtu drobných melanomů v peritoneu

(Obr. 7B), avšak v játrech a plicích nebyly nalezeny. Metastázující buňky byly pozorovány pouze na histologických řezech jater. Myši infikované *T. crassiceps* měly nízký počet melanomů v peritoneu, z nichž některé dosahovaly velikosti až 2 cm (Obr. 7C). U všech myší byly nalezeny melanomy v játrech, ale v plicích však pouze u dvou jedinců. Histologické řezy odhalily metastázující buňky v játrech a plicích.

V případě ICR myší došlo pouze u 4 jedinců neinfikovaných myší k vytvoření melanomů v peritoneu (Obr. 7D) a játrech. Jen u dvou pak byly pozorovány melanomy v plicích. Nezvyklá byla lokalizace melanomu na povrchu hrudní kosti jedné ICR myši. Byly také nalezeny metastázující buňky na histologických řezech jater a plic. U žádné z ICR myší infikovaných *T. crassiceps* nebyly nalezeny žádné melanomy v peritoneu (Obr. 7F) a orgánech, ani metastázující buňky na histologických řezech. Stejný výsledek byl i u ICR myší infikovaných *M. corti* (Obr. 7E), kromě jednoho solitérního melanomu nalezeného v peritoneu u jedné z myší. Ten byl však lokalizován v pevném vazivovém obalu, na rozdíl od všech ostatních melanomů pozorovaných předtím v peritoneu, které měly volnou strukturu.



Obr. 7: Peritoneální dutina u C57BL/6J a ICR myši po intraperitoneální aplikaci 3×10^5 B16F10 buněk. (A) peritoneum neinfikované C57BL/6J myši; (B) peritoneum C57BL/6J myši infikované *M. corti*; (C) peritoneum C57BL/6J myši infikované *T. crassiceps*; (D) peritoneum neinfikované ICR myši; (E) peritoneum ICR myši infikované *M. corti*; (F) peritoneum ICR myši infikované *T. crassiceps*; t – tetrahyridium; m – melanom; cy - cysticercus

4.4. Vliv ES produktů larev tasemnic na melanomové buňky in vitro

Za účelem testování, zda larvy tasemnic mohou přímo ovlivňovat melanomové buňky linie B16F10, byl zkoumán vliv jejich ES produktů na viabilitu a schopnost migrace buněk *in vitro*.

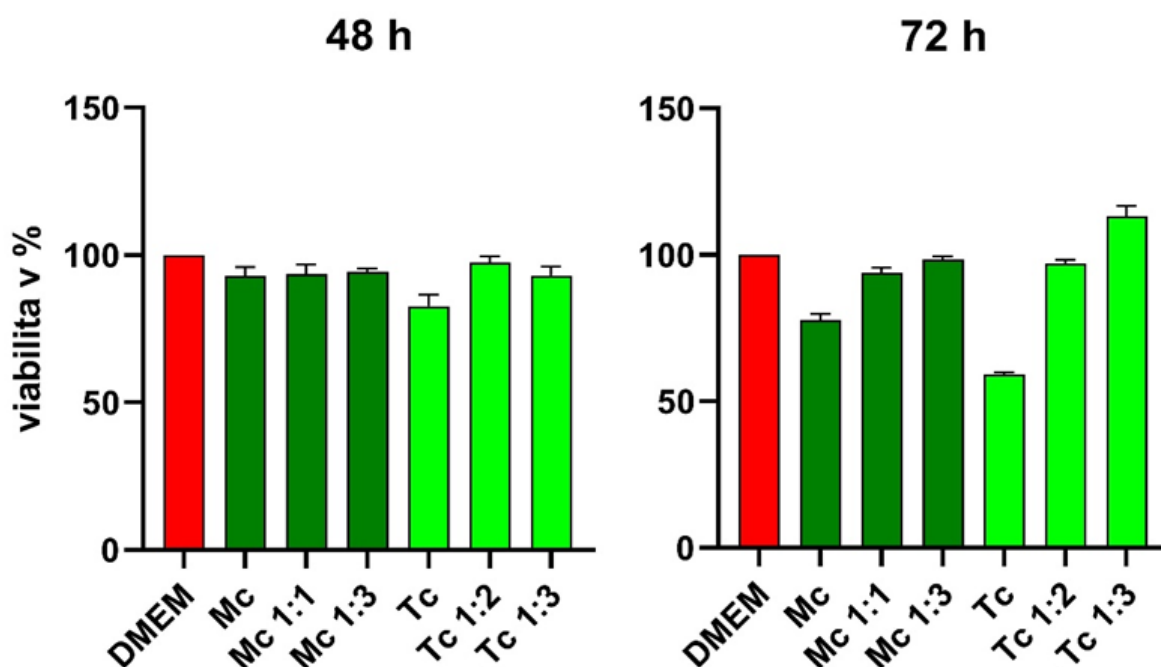
4.4.1. Kultivace tasemnic in vitro za účelem získání ES produktů

Pro izolace ES produktů byly larvy kultivovány v DMEM médiu bez aditiv, aby byla zajištěna kompatibilita s médiem pro kultivaci B16F10 buněk a byl vyloučen vliv aditiv na viabilitu a schopnost migrace melanomových buněk při *in vitro* pokusech. Ačkoliv byly larvy tasemnic v upravených médiích úspěšně drženy v *in vitro* podmínkách až po dobu 8 týdnů bez vlivu na jejich viabilitu, docházelo při kultivaci v DMEM médiu bez aditiv již po 4 týdnech ke značnému snižování jejich viability. U takto kultivovaných larev byla také pozorována snížená schopnost asexuálního množení v hostiteli. Po infekci myši kmene C57BL/6J 600 larvami *M. corti* kultivovanými 4 týdny v médiu bez aditiv bylo po dvou měsících nalezeno v peritoneu pouze 1200 larev. Při infekci myši 30 takto kultivovanými cysticerky *T. crassiceps* bylo po dvou měsících v peritoneu pouze 80 larev. Z těchto důvodů byly larvy tasemnic kultivovány v DMEM médiu bez aditiv maximálně po dobu dvou týdnů.

Z důvodu snížení množství myší potřebných pro experimenty byly také učiněny pokusy o kultivaci larev *in vitro* za účelem jejich namnožení. Bylo vyzkoušeno několik metod a různých médií a nejlepší výsledky byly dosaženy anaerobní kultivací v DMEM médiu obohaceném o 10 % inaktivovaného FBS, 100 U/ml penicilin-streptomycin, 2 mM L-glutamin a 50 mM 2-merkaptoetanol. Podařilo se sice udržovat larvy tasemnic, především *M. corti*, dlouhodobě bez velké ztráty viability, bylo však pozorováno jen málo dělících se larev a docházelo jen k minimálnímu nárůstu jejich počtu.

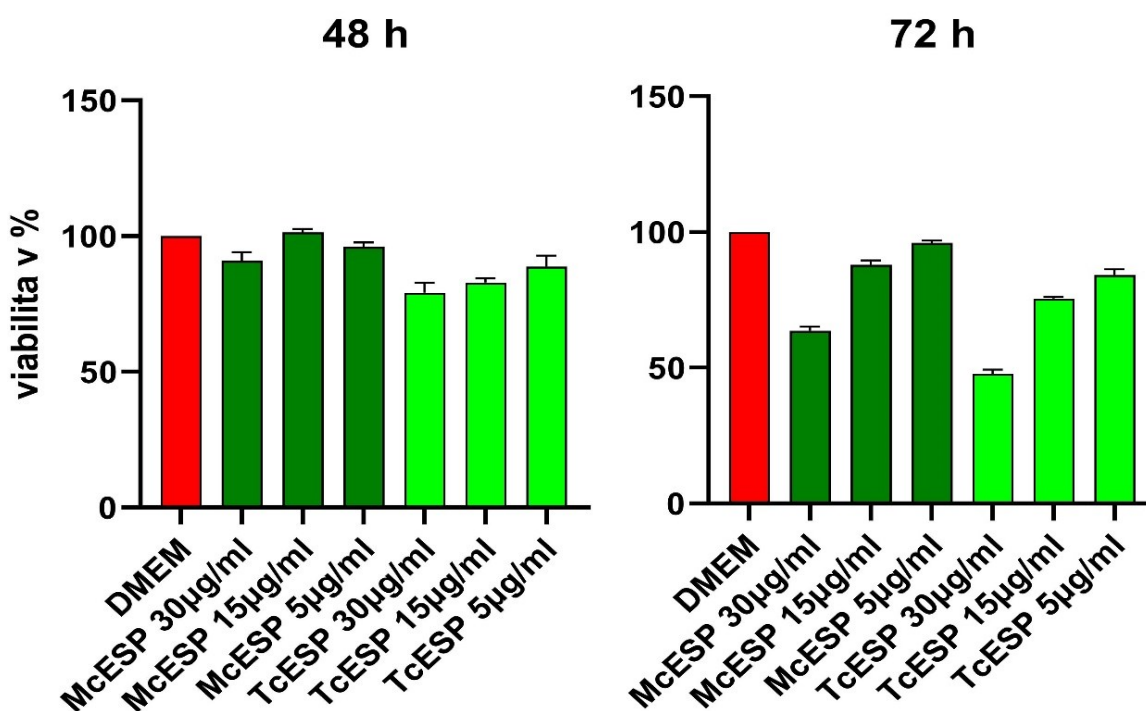
4.4.2. Vliv ES produktů tasemnic na viabilitu B16F10 buněk

Nejdříve byly B16F10 buňky kultivovány v přítomnosti kondiciovaného média posbíraného od dva dny kultivovaných larev *M. corti* a *T. crassiceps*. Koncentrace proteinů v médiu byla u *T. crassiceps* 13 $\mu\text{g/ml}$, a v případě *M. corti* 11 $\mu\text{g/ml}$. Před aplikací k B16F10 buňkám bylo médium obohaceno o 10 % FBS. Pro měření viability bylo použito neředěné médium kultivovaných tasemnic a naředěné v poměru 1:1 a 1:3 s čerstvým médiem pro kultivaci B16F10 buněk. Viabilita byla měřena 48 a 72 hodin od přidání kondiciovaných médií (Obr. 8).



Obr. 8: Viabilita B16F10 buněk kultivovaných v přítomnosti médií kondiciovaných tasemnicemi. **Mc** – médium kondiciované larvami *M. corti* obsahující ES produkty o koncentraci 11 $\mu\text{g/ml}$; **Tc** – médium kondiciované larvami *T. crassiceps* obsahující ES produkty o koncentraci 13 $\mu\text{g/ml}$; **DMEM** – médium pro kultivaci B16F10 buněk; 100 % reprezentuje viabilitu buněk kultivovaných v DMEM médiu pro kultivaci B16F10 buněk; poměry vyjadřují ředění kondiciovaných médií ku DMEM médiu pro kultivaci B16F10 buněk.

Aby byl vyloučen vliv nízkomolekulárních metabolitů tasemnic či sníženého množství živin v kondiciovaném médiu tasemnic na viabilitu melanomových buněk, byly v následujících měření použity koncentrované ES produkty tasemnic větší než 10 kDa. Ty byly aplikovány k B16F10 buňkám v koncentracích 30, 15 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Obr. 9).

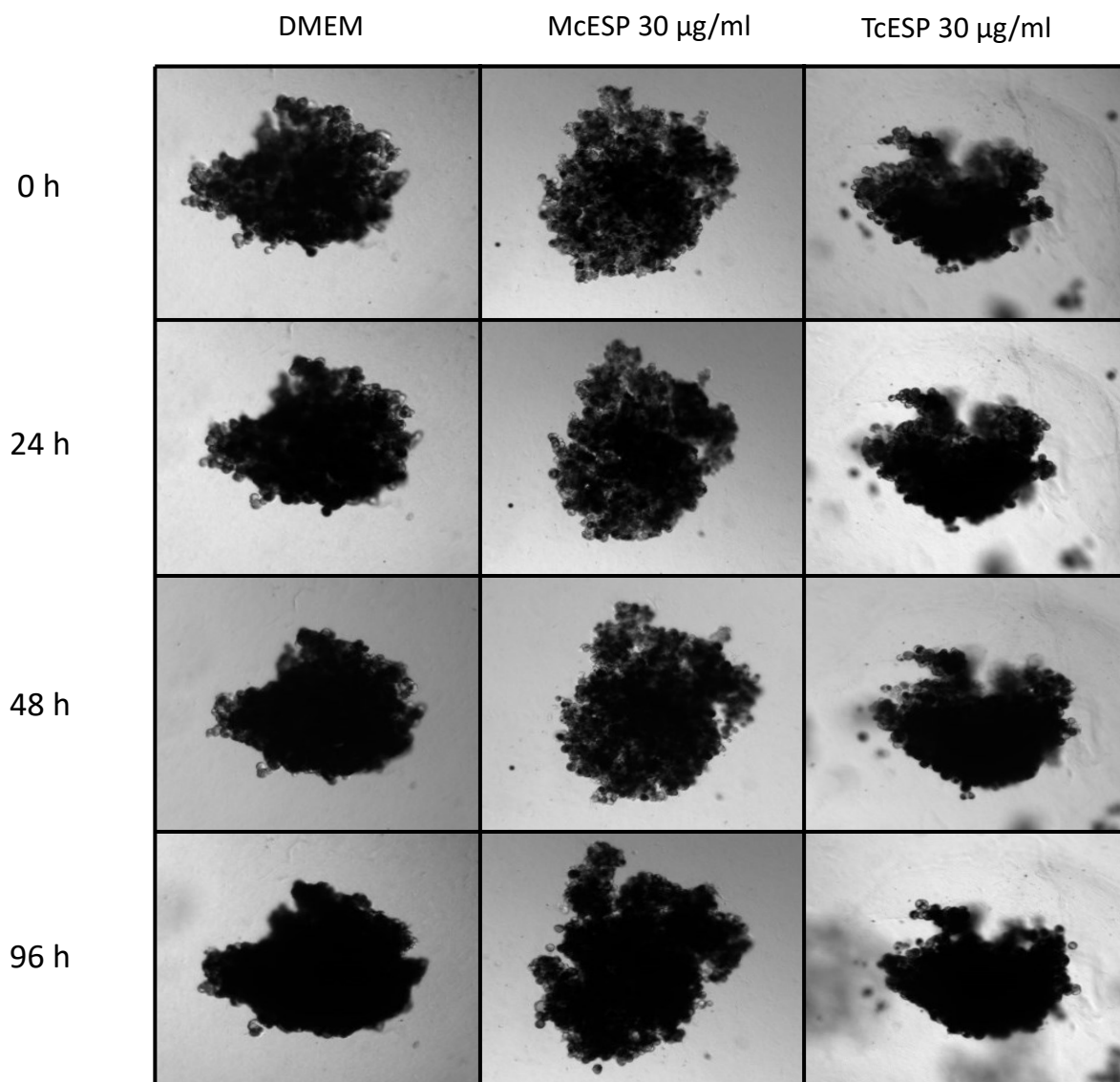


Obr. 9: Viabilita B16F10 buněk kultivovaných v přítomnosti koncentrovaných ES produktů tasemnic. **McESP** – koncentrované ES produkty larev *M. corti* větší než 10 kDa; **TcESP** – koncentrované ES produkty larev *T. crassiceps* větší než 10 kDa; **DMEM** – médium pro kultivaci B16F10 buněk; 100 % reprezentuje viabilitu buněk kultivovaných v DMEM médiu pro kultivaci B16F10 buněk

Při aplikaci kondiciovaných médií i koncentrovaných ES produktů získaných kultivací larev *M. corti* a *T. crassiceps* k B16F10 buňkám došlo ke snížení jejich viability, efekt však byl viditelný až 72 hodin po aplikaci ES produktů. Snížení viability B16F10 buněk až o 50 % bylo zaznamenáno po aplikaci ES produktů *T. crassiceps* o koncentraci 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

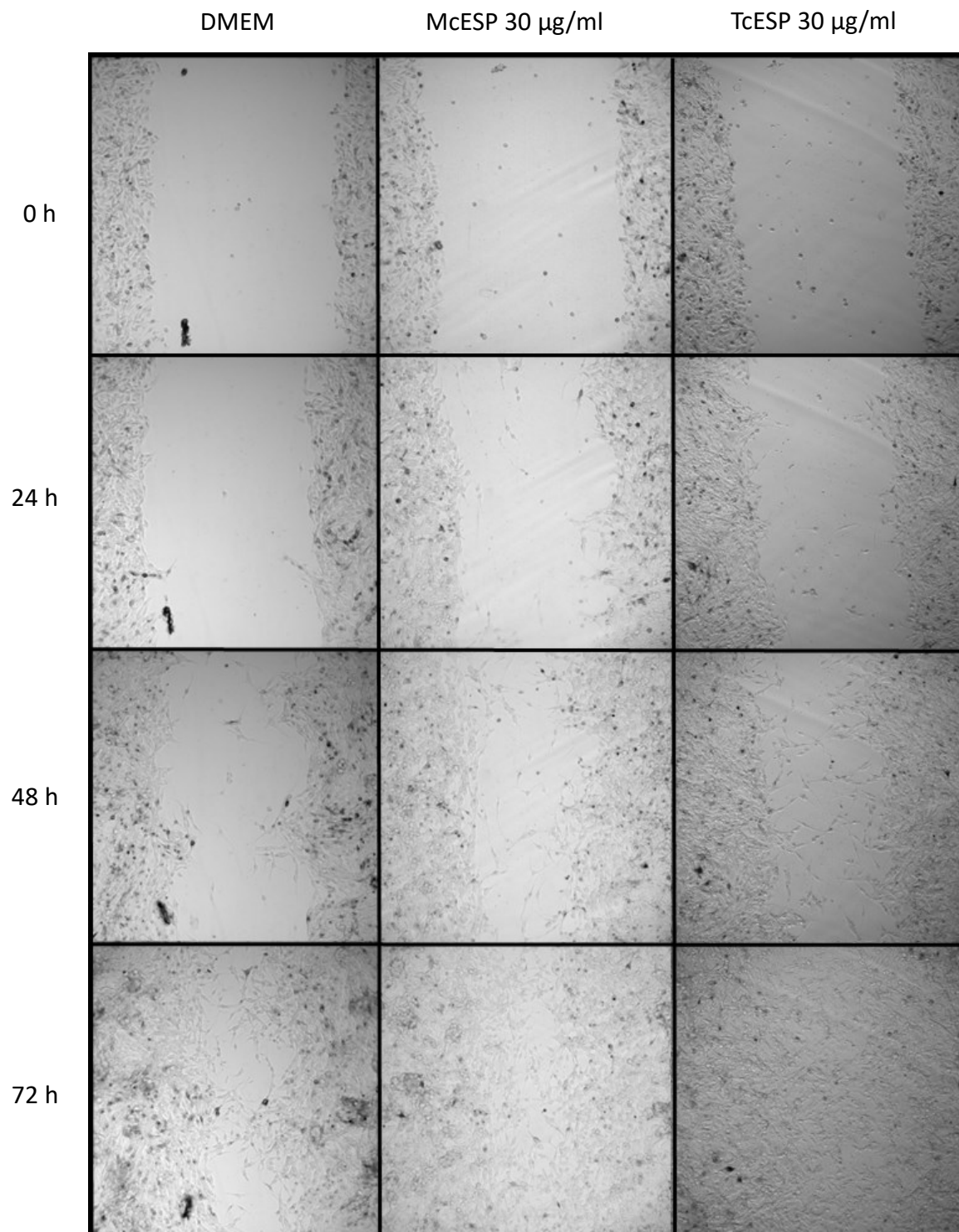
4.4.3. Vliv ES produktů tasemnic na invazivitu a migrační schopnost B16F10 buněk

Vliv ES produktů tasemnic na invazivitu B16F10 buněk byl původně analyzován pomocí 3D migračního testu sferoidů v kolagenové matrix. Tento pokus však nemohl být vyhodnocen, jelikož melanomové buňky tvořící sferoidy nevykazovaly schopnost migrace v kolagenové matrix (Obr. 10).



Obr. 10: 3D migrační test B16F10 sferoidů v kolagenové matrix. **McESP** – koncentrované ES produkty larev *M. corti* větší než 10 kDa; **TcESP** – koncentrované ES produkty larev *T. crassiceps* větší než 10 kDa; **DMEM** – médium pro kultivaci B16F10 buněk

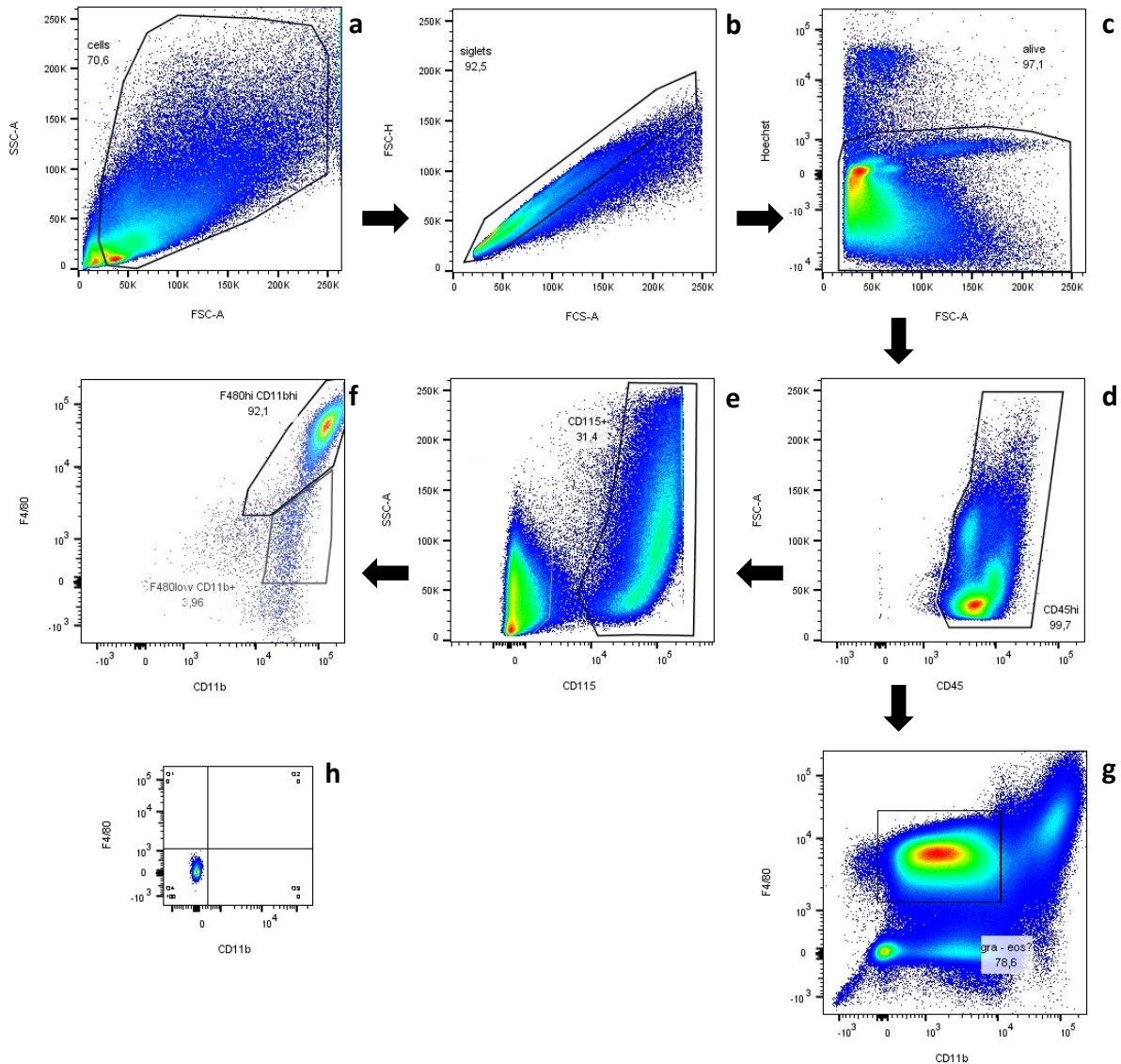
Vliv ES produktů tasemnic na schopnost migrace B16F10 buněk byl proto zkoumán také pomocí „Scratch“ testu, při kterém byla pozorována schopnost buněk zaplnit rýhu, která byla vytvořena do 2D vrstvy buněk adherovaných na dně 24 jamkové destičky. Kontroly byly kultivovány pouze v médiu pro kultivaci B16F10 buněk, k ostatním byly přidány ES produkty larev *M. corti* či *T. crassiceps* o koncentraci 30 µg/ml (Obr. 11). B16F10 buňky kultivované v přítomnosti ES produktů *M. corti* i *T. crassiceps* zaplnily rýhu během 72 hodin, zatímco kontroly až po 84 hodinách. ES produkty obou druhů tasemnic tedy pozitivně stimulovaly migraci melanomových buněk. Pokus by bylo vhodné zopakovat s různými koncentracemi ES produktů.



Obr. 11: Rychlost zaplňování rýhy B16F10 buňkami kultivovanými v přítomnosti ES produktů larev tasemnic. **McESP** – koncentrované ES produkty *M. corti* větší než 10 kDa; **TcESP** – koncentrované ES produkty *T. crassiceps* větší než 10 kDa; **DMEM** – médium pro kultivaci B16F10 buněk

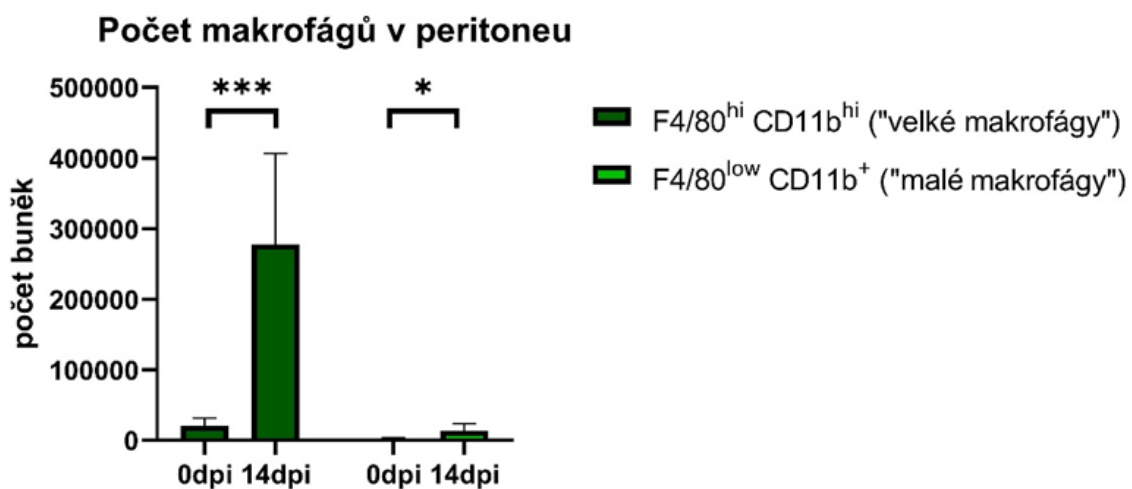
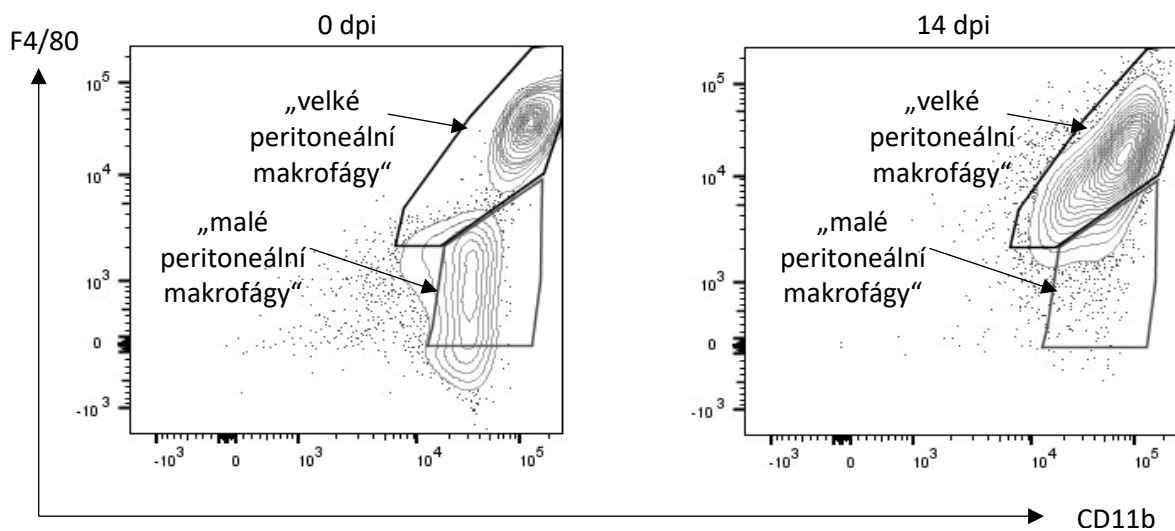
4.5. Vliv infekce *M. corti* na populace makrofágů v peritoneu myši

Vliv infekce *M. corti* na populace imunitních buněk v peritoneu myši byl charakterizován pomocí průtokové cytometrie. Sledovány byly dvě populace makrofágů, a to F4/80^{hi}CD11b^{hi} nazývané též „velké peritoneální makrofágy“ a F4/80^{low}CD11b⁺ označované jako „malé peritoneální makrofágy“, a dále také granulocyty. ICR myši byly intraperitoneálně infikovány standardní dávkou 600 tetrathyridií, kontrolní skupině myši byl intraperitoneálně aplikován fyziologický roztok. 14 dpi byly imunitní buňky izolovány pomocí peritoneální laváže. Populace buněk byly definovány pomocí gatovací strategie znázorněné na Obr. 12.

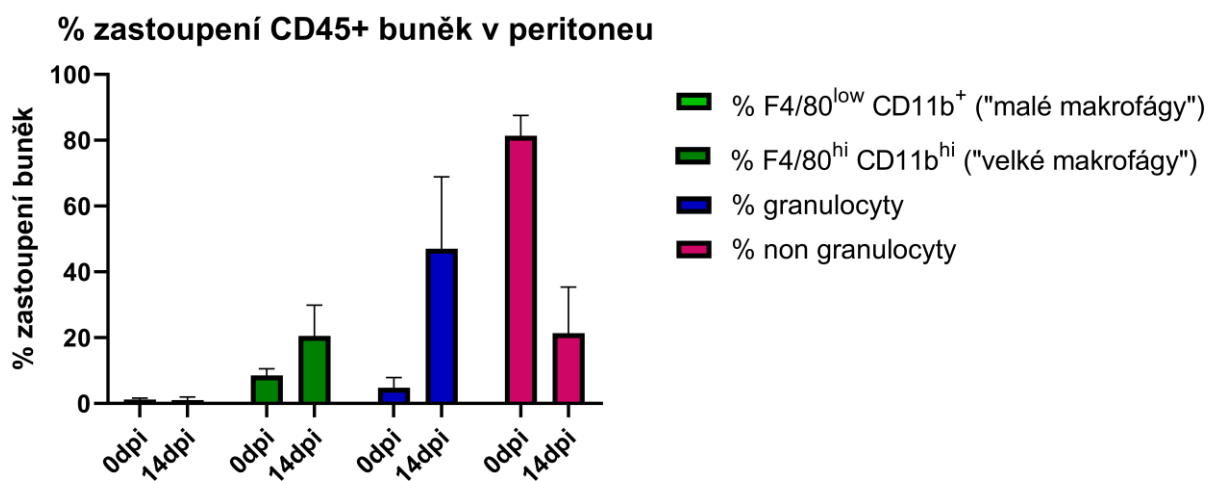
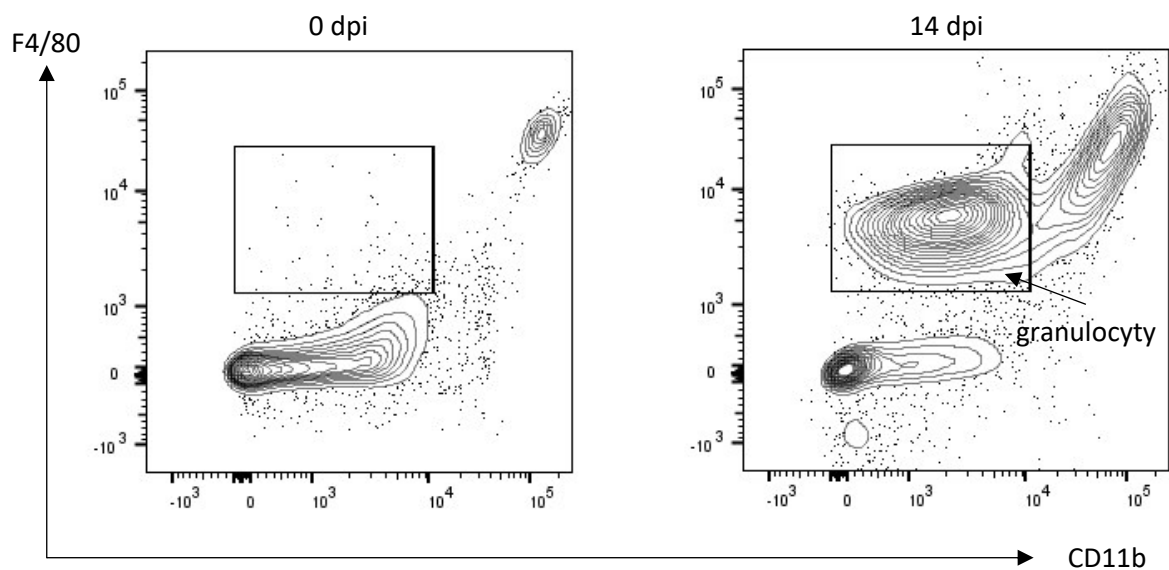


Obr. 12: Gatovací strategie použitá pro analýzu makrofágů a granulocytů v peritoneu. Podle velikosti a granularity (SSC/FSC) byla vymezena oblast odpovídající buňkám (a), z které byly vyloučeny dublety (FSC-H/FSC-A) (b) a následně mrtvé buňky (c). V živých buňkách byly označeny CD45 pozitivní buňky (d) a z nich pak CD115 pozitivní (e). V těchto byly následně pomocí F4/80 a CD11b rozlišeny dvě populace makrofágů, a to F4/80^{hi}CD11b^{hi} a F4/80^{low}CD11b⁺ (f). Odlišení populací bylo podpořeno rozdílnou expresí dalších markerů MHC II a CD 86. V rámci CD45+ buněk byly opět pomocí F4/80 a CD11b označeny granulocyty (g). Změřením nebarveného vzorku byly vyloučeny případné artefakty způsobené autofluorescencí (h).

Podařilo se detekovat dvě populace makrofágů v peritoneu ICR myší. Po infekci larvami *M. corti* došlo k více než desetinásobnému nárůstu počtu $F4/80^{hi}CD11b^{hi}$ makrofágů oproti kontrolní skupině (Obr. 13) a zároveň došlo k výraznému posunu v zastoupení imunitních buněk v peritoneu. U nakažených myší představovaly majoritní část granulocyty a $F4/80^{hi}CD11b^{hi}$ makrofágy, zatímco u neinfikovaných myší pak jiné typy leukocytů (Obr. 14). V případě granulocytů se pravděpodobně jedná o eosinofily; jelikož byl však panel markerů navržen pro identifikaci makrofágů, nelze to s jistotou určit. Pokus byl zopakován také na C57BL/6J myších infikovaných *M. corti*, avšak nepodařilo se izolovat dostatek imunitních buněk a pokus bude muset být zopakován.



Obr. 13: Nárůst populace $F4/80^{hi}CD11b^{hi}$ makrofágů v peritoneu ICR myší při nákaze *M. corti* a reprezentativní dotploty. 0dpi – neinfikovaná skupina; 14 dpi – infikovaná skupina; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$



Obr. 14: Nárůst populace granulocytů a posun v zastoupení CD45+ buněk v peritoneu ICR myší při nákaze *M. corti* a reprezentivní dotpoloty. 0 dpi – neinfikovaná skupina; 14 dpi – infikovaná skupina

5. Diskuze

5.1. Zavedení nových laboratorních modelů

Prvním z úkolů této diplomové práce bylo zavést vhodný model pro zkoumání vlivu tkáňových/dutinových helmintů na nádorová onemocnění. Vhodnými kandidáty byly vytipovány tasemnice druhu *Mesocestoides corti* a *Taenia crassiceps*, a to pro jejich schopnost asexuálního množení v myších a nízké nebezpečí infekce pro člověka. Jelikož se larvy obou tasemnic přirozeně vyskytují v Česku v drobných hlodavcích, bylo prvotním plánem získat vlastní izoláty z přírody.

Podařilo se získat dva izoláty tasemnic rodu *Mesocestoides* z *Microtus arvalis* a *Apodemus flavicollis*, které se však v laboratorních myších asexuálně nemnožily. Tyto izoláty byly následně pomocí sekvenace určeny jako *Mesocestoides literratus*. Pozorovaná absence asexuálního rozmnožování potvrzuje předpoklad, že tato schopnost je u rodu *Mesocestoides* nejspíše unikátní pro druh *M. corti* (Kawamoto et al., 1986).

Po neúspěšném pokusu o získání a využití vlastního izolátu se ze Švýcarska podařilo získat izolát larev *M. corti*. Ten byl izolován ze *Sciurus vulgaris* a ukázal se jako vhodný model, jelikož infekcí BALB/c myši 600 larvami bylo možno po měsíci získat až 4 000 larev, což zajišťovalo dostatek materiálu pro následující pokusy. Asexuální rozmnožování tetrathyridií probíhalo podélným dělením začínajícím namnožením přísavek na skolexu. Bylo také pozorováno až čtyřnásobné zmnožení skolexů na jednom tetrathyridiu, což pravděpodobně přispívá k rapidnímu množení larev. Po intraperitoneální aplikaci některé larvy penetrovaly do jater, kde v rámci obranné reakce hostitele docházelo k zvýšené tvorbě kolagenu a enkapsulaci tetrathyridií. Přes značné poškození jater a jejich fibrotizaci při dlouhodobých infekcích nevykazovaly myši infikované *M. corti* žádné nápadné změny zdravotního stavu. Zřejmě vlivem nedostatku kapacity jater se tetrathyridia po 14 dpi začínala ve vyšším počtu objevovat opět v peritoneální dutině, kde docházelo k jejich rapidnímu množení. Výše zmíněná pozorování odpovídají informacím jiných autorů (Specht & Voge, 1965). V některých případech byla tetrathyridia nalezena i v plicích, avšak tato lokalizace nebývá v literatuře příliš často zmiňována (Todd et al., 1978).

Podařilo se také získat izoláty larev *T. crassiceps*, které byly rovněž zařazeny do experimentů. Mezi belgickým izolátem neznámého původu a francouzským izolátem z *Lemur catta* nebyly pozorovány velké rozdíly v morfologii ani rychlosti množení v hostiteli. Později byl získán také izolát z *Microtus arvalis* odchyceného na Rudě, který se však od předešlých dvou morfologicky poměrně liší, rychlost množení je však srovnatelná. Pro experimenty byl použit belgický izolát, z dlouhodobého hlediska by však bylo možná dobré zvážit použití nového izolátu z Rudy, jelikož při dlouhodobém pasážování může docházet k mutacím, jako například u kmene ORF, který ztratil schopnost tvořit skolex (Willms & Zurabian, 2010).

Následně byla navázána spolupráce s laboratoří doc. Jana Brábka. Jako model pro nádorové onemocnění byla vybrána myš melanomová linie B16F10, jelikož často tvoří metastázy v plicích a játrech, které jsou predilekčním místem výskytu larev *M. corti* u myší, a byla tedy předpokládána jejich kolokalizace. Zároveň byla tato linie nádorových buněk použita v experimentech s jinými druhy helmintů zkoumajících jejich vliv na nádorové onemocnění (Kang et al., 2013). Výhodou bylo také kontrastní zbarvení nádorů vůči jiným tkáním v důsledku tvorby melaninu, což mohlo být využito při makroskopickém hodnocení výskytu melanomů a také při histologické vizualizaci metastázujících buněk ve vybraných orgánech.

5.2. Vliv infekce larvami tasemnic na růst nádorů a metastázování melanomové linie B16F10

V prvotních pokusech, kdy byly BALB/c myším nádorové buňky aplikovány intravenózně do ocasní žíly, docházelo jak u zvířat infikovaných larvami *M. corti*, tak u kontrolní skupiny k tvorbě melanomů na bázi ocasu. Autoři experimentů, při kterých byly myším aplikovány nádorové buňky linie B16F10 stejným způsobem, se však o podobném vzniku melanomů v této lokalizaci nezmiňují (Kang et al., 2013). Tyto melanomy vznikly nejspíše nedokonalou injekční aplikací buněk. Při makroskopickém vyšetření plic a jater byly nalezeny melanomy jen v plicích myší infikovaných *M. corti*. Pouze u těchto myší byly také nalezeny metastázující buňky v histologických řezech plic. Tyto výsledky naznačují, že infekce larvami *M. corti* podporuje metastázování a růst melanomů u myší. Podobný nárůst počtu metastáz byl pozorován v játrech myší infikovaných *E. granulosus*, kterým byly aplikovány

buňky karcinomu prsu. Tento efekt je připisován potlačení Th1 imunitní odpovědi v játrech způsobené chronickou infekcí *E. granulosus* (Turhan et al., 2015). V tomto experimentu však byly nádorové buňky aplikovány 91 dní po infekci tasemnicí, v našem případě byly aplikovány již 14 dní po infekci. Ačkoliv není známo, kdy dochází při infekci *M. corti* k přechodu z počáteční Th1 imunitní odpovědi na Th2, je u *T. crassiceps* tento přechod popisován po druhém až třetím týdnu infekce (Terrazas et al., 1998). Není tedy jisté, zda je po 14 dnech po infekci *M. corti* potlačena Th1 odpověď, jež by měla za následek navození prostředí vhodného pro metastázování nádorových buněk. Nedařilo se však, ani přes modifikaci způsobu injekce buněk do ocasní žíly, standardizovat množství aplikovaných buněk, přičemž se často podařilo do žíly vpravit jen zlomek melanomových buněk. Zároveň bylo neobvyklé, že nedošlo k tvorbě metastáz u kontrolní skupiny, jelikož by myši kmene BALB/c měly být na melanomovou linii B16F10 velmi vnímavé (Foerster et al., 2018). Proto bylo od tohoto typu aplikace melanomových buněk upuštěno.

V následujících pokusech byly melanomové buňky aplikovány myším injekčně do peritoneální dutiny, aby bylo zajištěno vpravení kompletního definovaného množství nádorových buněk. Efekt infekce tasemnicemi na melanomové buňky však byl v tomto případě opačný. V případě kmene BALB/c i ICR nebyly ani u jedné z myší infikovaných *T. crassiceps* nalezeny žádné makroskopické melanomy ani metastázující buňky v plicích či játrech. Stejný výsledek byl i u myší infikovaných larvami *M. corti*. Výjimkou byl jediný melanom ve vazivovém útvaru; z důvodu jeho lokalizace je možné, že vznikl neúmyslnou aplikací části melanomových buněk do močového měchýře ICR myši. U kontrolních myší byla peritoneální dutina vyplněna ložisky melanomových buněk, která obklopovala i játra, a v plicích byly vytvořeny makroskopické melanomy. Histologické řezy odhalily metastázující melanomové buňky v játrech a plicích myší kontrolní skupiny.

V případě kmene C57BL/6J došlo u většiny myší infikovaných *M. corti* k tvorbě drobných melanomů v břišní dutině a játrech, avšak ne v plicích. Na histologických řezech jater byly nalezeny melanomové buňky, které však byly většinou lokalizované na okraji, a ne volně rozestě ve tkáni jako v případě neinfikovaných myší. Toto naznačuje, že infekce jater larvami *M. corti* zabraňuje volné diseminaci metastázujících buněk do tkáně. V případě infekce *T. crassiceps* bylo množství a velikost melanomů v peritoneální dutině větší.

Melanomy se nacházely také v játrech a plicích, což značí slabší protinádorový efekt při infekci *T. crassiceps* než *M. corti*, ale stále signifikantní v porovnání s kontrolami.

Existuje několik teorií, které se snaží vysvětlit, proč infekce některými druhy helmintů dokážou potlačit rozvoj nádorových onemocnění. První je, že helminti produkují látky, jež mohou přímo ovlivňovat viabilitu a dělení nádorových buněk. Příkladem takové látky je například EgKI-1 sekretovaný larvami *E. granulosus* (Ranasinghe et al., 2018). To by mohlo vysvětlovat, proč byl efekt potlačení vzniku melanomů pozorován pouze v případě, že byly nádorové buňky aplikovány do peritoneální dutiny, kde byly v přímém kontaktu s larvami tasemnic. Tento efekt však nebyl stejný u různých kmenů myší. Jelikož mají použité kmeny poněkud odlišné imunologické pozadí (Foerster et al., 2018), zdála se pravděpodobnější další z teorií, která předpokládá, že helminti či jimi produkované látky stimulují imunitní systém hostitele. Takto stimulovaný imunitní systém poté vytváří prostředí nevhodné pro rozvoj nádorového onemocnění, neboť zřejmě dojde k aktivaci imunitních buněk, které mohou ničit buňky nádorové. Mohlo se ovšem jednat i o kombinaci těchto dvou efektů, proto se následující pokusy zabývaly jak vlivem produktů larev tasemnic na B16F10 buňky *in vitro*, tak vlivem infekce tasemnicí na imunitní systém hostitele.

5.3. Vliv ES produktů larev tasemnic na melanomové buňky *in vitro*

Výhodou larev *M. corti* a *T. crassiceps* je možnost jejich dlouhodobé kultivace *in vitro*. Pro účel sběru ES produktů byly larvy kultivovány v DMEM médiu bez aditiv, aby byl vyloučen jejich vliv na B16F10 buňky při kultivačních pokusech. Při dlouhodobé kultivaci v čistém médiu však docházelo k zvýšenému úhynu tasemnic a byla u nich pozorována snížená schopnost asexuálního množení v myších. U takto kultivovaných tasemnic také dochází poměrně rychle k snižování produkce ES produktů (Vendelová et al., 2016). Z těchto důvodů byly larvy v čistém médiu kultivovány maximálně 2 týdny.

V rámci snahy o snížení množství myší potřebných pro udržování populace larev tasemnic byl také podniknut pokus o jejich dlouhodobou kultivaci za účelem množení. Živé tasemnice se sice podařilo udržovat v upraveném médiu a anoxickém prostředí až 8 týdnů, nedocházelo však k množení larev. Byla sice popsána metoda kultivace pro množení larev *M. corti* v přítomnosti buněk potkaního hepatomu (Vendelová et al., 2016), ale tato

metoda byla z důvodu rizika kontaminace nevhodná, jelikož hlavním účelem kultivace tasemnic bylo získání ES produktů jejich larev.

Zda samotné ES produkty tasemnic mohou mít vliv nádorové buňky bylo nejdříve zkoumáno měřením viability B16F10 buněk kultivovaných v médiích získaných po dvoudenní kultivaci larev. Takto kondiciovaná média obou tasemnic dokázala snížit viabilitu B16F10 buněk. Aby byl vyloučen vliv nízkomolekulárních metabolitů tasemnic, například laktátu vznikajícího při kultivaci *M. corti* (Köhler & Hanselmann, 1974), či sníženého množství živin v kondiciovaných médiích tasemnic na viabilitu B16F10 buněk, byly v následujících pokusech použity koncentrované ES produkty tasemnic větší než 10 kDa. Kultivace B16F10 buněk v přítomnosti kyseliny mléčné, která se od laktátu liší pouze přítomností jednoho protonu, totiž může ovlivňovat jejich viabilitu (Matsuo et al., 2019). Také kultivace B16F10 buněk v přítomnosti koncentrovaných ES produktů však vedla ke snížení jejich viability. Z výsledků vyplývá, že samotné ES produkty tasemnic by mohly také přispívat k pozorovanému protinádorovému efektu u myši infikovaných *M. corti* a *T. crassiceps*. Snížení viability nádorových buněk *in vitro* při kultivaci v přítomnosti ES produktů tasemnic bylo zaznamenáno i u dalších helmintů (Vasilev et al., 2015).

Jelikož byla pozorována redukce solidních metastáz u myši infikovaných tasemnicemi a také nižší počet diseminovaných metastázujících buněk v jaterní tkáni myši infikovaných *M. corti*, bylo předpokládáno, že by larvy tasemnic mohly inhibovat migraci melanomových buněk. Proto byl testován vliv jejich ES produktů na schopnost migrace buněk B16F10 *in vitro*. Jako první byla vybrána metoda 3D kultivace sferoidů B16F10 buněk v kolagenové matrix, jelikož nejlépe simuluje přirozené prostředí tkáně. Melanomové buňky však nevykazovaly schopnost migrace, což však pravděpodobně nebylo zapříčiněno jejich úhynem, jelikož je na snímcích patrné přibývání melaninu. Experiment bude potřeba zopakovat v upraveném provedení, například použitím jiné matrix.

Jako náhrada byl vybrán „Scratch“ test, při kterém byla sledována rychlost, jakou dokážou B16F10 buňky migrovat a zacelit rýhu vytvořenou do vrstvy adherovaných buněk. Oproti očekávání měly ES produkty obou tasemnic pozitivní efekt na migraci a u melanomových buněk kultivovaných v jejich přítomnosti došlo k zacelení rýhy rychleji, než u buněk v čistém médiu. Tento migrační test byl proveden také u několika nádorových linií kultivovaných v přítomnosti EgKI-1 izolovaného z *E. granulosus*, u všech linií však byl

popsán inhibiční efekt na jejich migraci (Ranasinghe et al., 2018). Je tedy pravděpodobné, že samotné ES produkty nemají inhibiční vliv na migraci B16F10 buněk a pozorovaný antimetastatický efekt je způsoben něčím jiným, pravděpodobně imunitní odpovědí myši.

5.4. Vliv infekce *M. corti* na imunitní buňky peritonea myši

Přestože dokázaly ES produkty larev tasemnic snižovat viabilitu B16F10 buněk *in vitro*, bylo pravděpodobnější, že se na protinádorovém efektu podílejí také imunitní buňky. Jelikož byl tento efekt pozorován pouze při peritoneální aplikaci melanomových buněk, zaměřoval se další pokus na imunitní buňky v peritoneu myši. Peritoneální laváží byly izolovány imunitní buňky ve 14 dpi, aby byl zaznamenán stav jejich populací v době, kdy byly při infekčních pokusech aplikovány melanomové buňky. Protože byl protinádorový efekt nejsilnější v případě infekce *M. corti*, byla vybrána tato tasemnice v kombinaci s ICR myšmi, které se ukázaly jako méně vnímavé na tuto melanomovou linii. Jelikož bylo již popsáno, že infekce *M. corti* u myši vyvolává zvýšenou eosinofilii v peritoneu a tyto aktivované eosinofily mohou indukovat apoptózu u nádorových buněk (Costain et al., 2001), byl pokus zaměřen na makrofágy jako další efektorové buňky. Jejich zvýšené populace jsou sice většinou spojovány spíše s rozvojem nádorových onemocnění, a to především tumor asociované makrofágy (TAM) (Chen et al., 2019), avšak při správné stimulaci mohou také zprostředkovávat protinádorovou odpověď (Beatty et al., 2011). Stimulace makrofágů k cytostatickému efektu byla pozorována také při infekci myši *T. spiralis* (Wing et al., 1979). Konkrétním vybraným typem byly takzvané „malé peritoneální makrofágy“ (small peritoneal macrophages – SPM) a „velké peritoneální makrofágy“ (large peritoneal macrophages – LPS) nazývané též GATA6 makrofágy. Tyto GATA6 makrofágy představují speciální populaci makrofágů, která na rozdíl od ostatních nevzniká po migraci monocytů z krve, ale jejich stálá populace je udržovaná v peritoneu a v případě potřeby dojde k jejich rychlému namnožení (Bou Ghosn et al., 2010). Tento typ makrofágů je zapojen do hojících procesů například při sterilním poškození jater, kdy dochází k jejich rychlému namnožení a aktivní migraci do jater v místě poškození (Wang & Kubes, 2016). Jelikož při infekci *M. corti* dochází u myši k značnému poškození jater v důsledku fibrotizace, byl předpokládán možný nárůst GATA6 populace. Výsadou těchto makrofágů je schopnost produkce transkripčního faktoru GATA6, který je většinou spojován s proliferací a diferenciací buněk. Byl u něj však zaznamenán také antimetastatický účinek (Liu et al.,

2019). Pomocí průtokové cytometrie byly v peritoneu myší identifikovány dvě populace makrofágů, z nichž u jedné došlo po infekci *M. corti* k mnohonásobnému namnožení. Profil povrchových markerů těchto buněk odpovídá tomu, který je popisován u GATA6 makrofágů (Bou Ghosn et al., 2010; Rosas et al., 2014). Pro potvrzení, zda se však opravdu jedná o tento typ makrofágů, který by teoreticky mohl přispívat k pozorovanému protinádorovému efektu produkcí GATA6, by bylo nutno použít antiGATA6 protilátku. Oproti makrofágům byl však v peritoneu pozorován větší nárůst granulocytů, které pravděpodobně představují eosinofily. Je proto pravděpodobnější, že právě eosinofily by mohly přispívat k pozorovanému protinádorovému efektu proti intraperitoneálně aplikovaným B16F10 buňkám při infekci *M. corti* (Reichman et al., 2019). Předpokládaný efekt by bylo vhodné ověřit u sledovaných populací imunitních buněk aktivovaných tasemnicemi na B16F10 buňky *in vitro*, což bude součástí dalšího výzkumu.

Otázkou zůstává, proč došlo k zvýšené tvorbě metastáz u myší infikovaných *M. corti*, kterým byly aplikovány melanomové buňky intravenózně. Je možné, že ve 14 dnech po infekci *M. corti* je již navozena Th2 imunitní odpověď, která je spojována s nižší efektivitou v potlačování tvorby metastáz. Indukovaná Th2 odpověď u myší infikovaných *T. crassiceps* však pravděpodobně napomáhá potlačení vzniku a rozvoji CAC (León-Cabrera et al., 2014). Je možné, že Th2 odpověď navozená při infekcích helminty přispívá k potlačení těchto typů nádorových onemocnění, jejichž vznik je spojován s chronickými záněty, jako například CAC. Naopak dojde-li již k vytvoření nádoru a následnému metastázování buněk, pak může mít infekce tasemnicemi opačný efekt a podporovat rozvoj nádorového onemocnění. Toto vysvětlení je však vysoce spekulativní a je potřeba dalšího výzkumu pro objasnění této problematiky.

6. Závěr

Výzkum vlivu helmintů na nádorová onemocnění za účelem jejich možného terapeutického využití je poměrně novým vědeckým směrem. Ačkoliv byl prokázán protinádorový efekt některých druhů helmintů, mechanismy zprostředkovávající tuto interakci nejsou objasněny. Cílem této práce bylo zavést v laboratoři nové modely helmintů a provést pilotní testy, které by určily jejich pozitivní či negativní vliv na rozvoj vybraného typu nádorových buněk.

V rámci této práce bylo dosaženo těchto výsledků:

- Larvy tasemnic *M. corti* a *T. crassiceps* byly úspěšně zavedeny jako nové modely pro další výzkum jejich vlivu na nádorová onemocnění.
- Byl popsán pronádorový efekt infekce *M. corti* při intravenózní aplikaci melanomových buněk B16F10 u BALB/c myši, zároveň však byl prokázán protinádorový efekt infekce *M. corti* a *T. crassiceps* při intraperitoneální aplikaci melanomových buněk s rozdílným stupněm účinnosti v různých kmenech myši.
- *In vitro* kultivace B16F10 buněk v přítomnosti ES produktů larev tasemnic vedla k snížení jejich viability, avšak ke zvýšení jejich migrace.
- Infekce *M. corti* u BALB/c myši vedla k změně populací peritoneálních imunitních buněk, zejména pak k nárůstu populace makrofágů a granulocytů.

V rámci této diplomové práce byl vůbec poprvé popsán vliv tasemnice *M. corti* na myši melanomovou buněčnou linii B16F10 a představuje tuto tasemnici jako vhodný model pro studium vlivu helmintů na nádorová onemocnění. Spolu s *T. crassiceps* bude součástí dalšího výzkumu zabývajícího se možným terapeutickým potenciálem ES produktů tasemnic při léčbě nádorových onemocnění.

7. Použitá literatura

Akgül H., Tez M., Ünal A. E., Keşkek M., Sayek I., Özçelik T. (2003). *Echinococcus* against cancer: Why not? *Cancer*, 98, 1998-1999.

Altun A., Saraydin S. U., Soylu S., Inan D. S., Yasti C., Ozdenkaya Y., Koksall B., Duger C., Isbir C., Turan M. (2015). Chemopreventive effects of hydatid disease on experimental breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 1391–1395.

Alvarez Errico D., Medeiros A., Míguez M., Casaravilla C., Malgor R., Carmona C., Nieto A., Osinaga E. (2001). O-glycosylation in *Echinococcus granulosus*: Identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Experimental Parasitology*, 98, 100–109.

Beatty G. L., Chiorean E. G., Fishman M. P., Saboury B., Teitelbaum U. R., Sun W., Huhn R. D., Song W., Li D., Sharp L. L., Torigian D. A., O'Dwyer P. J., Vonderheide R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, 331, 1612–1616.

Berriel E., Russo S., Monin L., Festari M. F., Berois N., Fernández G., Freire T., Osinaga E. (2013). Antitumor activity of human hydatid cyst fluid in a murine model of colon cancer. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.

Bo R., Yasen A., Shao Y., Zhang W., Lin R., Jiang T., Wen H., Xiao H., Aji T. (2020). Co-existence of hepatocellular carcinoma and cystic echinococcosis. *Infectious Agents and Cancer*, 15, 5.

Bou Ghosn E. E., Cassado A. A., Govoni G. R., Fukuhara T., Yang Y., Monack D. M., Bortoluci K. R., Almeida S. R., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 2568–2573.

Callejas B. E., Mendoza-Rodríguez M. G., Villamar-Cruz O., Reyes-Martínez S., Sánchez-Barrera C. A., Rodríguez-Sosa M., Delgado-Buenrostro N. L., Martínez-Saucedo D., Chirino Y. I., León-Cabrera S. A., Pérez-Plasencia C., Vaca-Paniagua F., Arias-Romero L. E., Terrazas L. I. (2019). Helminth-derived molecules inhibit colitis-associated colon cancer development through NF- κ B and STAT3 regulation. *International Journal of Cancer*, 145,

3126–3139.

Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. (2019). Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 26, 1-13.*

Coffelt S. B., Wellenstein M. D., De Visser K. E. (2016). Neutrophils in cancer: Neutral no more. *Nature Reviews Cancer*. 16, 431-446.*

Costain D. J., Guha A. K., Liwski R. S., Lee T. D. G. (2001). Murine hypodense eosinophils induce tumour cell apoptosis by a granzyme B-dependent mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50, 293–299.

Daneshpour S., Kefayat A., Mofid M., Rostami Rad S., Yousofi Darani H. (2019). Effect of hydatid cyst fluid antigens on induction of apoptosis on breast cancer cells. *Advanced Biomedical Research*, 8, 27.

Darani H., Sharafi S., Mokarian F., Yousefi M., Sharafi S., Jafari R. (2016). Therapeutic effect of hydatid cyst liquid on melanoma tumor growth in mouse model. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 18, 1–7.

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.

Deng B., Gong P., Li J., Cheng B., Ren W., Yang J., Li H., Zhang G., Zhang X. (2013). Identification of the differentially expressed genes in SP2/0 myeloma cells from Balb/c mice infected with *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*, 194, 179–182.

Dundas S. R., Lawrie L. C., Rooney P. H., Murray G. I. (2005). Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *Journal of Pathology*, 205, 74–81.

Dvorožňáková E., Hurníková Z., Kołodziej-Sobocińska M. (2011). Development of cellular immune response of mice to infection with low doses of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis* larvae. *Parasitology Research*, 108, 169–176.

Fitzmaurice C., Abate D., Abbasi N., Abbastabar H., Abd-Allah F., Abdel-Rahman O., Yisma E., Yonemoto N., Younis M. Z., Yousefi B., Yousefifard M., Yu C., Zabeh E., Zadnik V.,

Moghadam T. Z., Zaidi Z., Zamani M., Zandian H., Zangeneh A., Zaki L., Zendehtel K., Zenebe Z. M., Zewale T. A., Ziapour A., Zodpey S., Murray C. J. L. (2019). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*, 5, 1749–1768.

Foerster F., Boegel S., Heck R., Pickert G., Rüssel N., Rosigkeit S., Bros M., Strobl S., Kaps L., Aslam M., Diken M., Castle J., Sahin U., Tuettenberg A., Bockamp E., Schuppan D. (2018). Enhanced protection of C57 BL/6 vs Balb/c mice to melanoma liver metastasis is mediated by NK cells. *Oncolimmunology*, 7, 4.

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? *American Journal of Surgical Pathology*, 22, 488–492.

Gong P., Zhang J., Cao L., Nan Z., Li J., Yang J., Fang H., Jiao H., Jiang T., Su L., Zhang X. (2011). Identification and characterization of myeloma-associated antigens in *Trichinella spiralis*. *Experimental Parasitology*, 127, 784–788.

Gundogdu S. B., Saylam B., Tez M. (2017). Cyst hydatid and cancer: The myth continues. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55, 150-151.

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.

Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12293–12297.

Kang Y. J., Jo J. O., Cho M. K., Yu H. S., Leem S. H., Song K. S., Ock M. S., Cha H. J. (2013). *Trichinella spiralis* infection reduces tumor growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells. *Veterinary Parasitology*, 196, 106–113.

Karadayi S., Arslan S., Sumer Z., Turan M., Sumer H., Karadayi K. (2013). Does hydatid

disease have protective effects against lung cancer? *Molecular Biology Reports*, 40, 4701–4704.

Kawamoto F., Fujioka H., Mizuno S., Kumada N., Voge M. (1986). Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: Shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia *in vivo*. *International Journal for Parasitology*, 16, 323–331.

Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26, 677–704.*

Köhler P., Hanselmann katharina. (1974). Anaerobic and aerobic energy metabolism in the larvae (tetrathyridia) of *Mesocestoides corti*. *Experimental Parasitology*, 36, 178–188.

Ledesma-Soto Y., Callejas B. E., Terrazas C. A., Reyes J. L., Espinoza-Jiménez A., González M. I., León-Cabrera S., Morales R., Olguín J. E., Saavedra R., Oghumu S., Satoskar A. R., Terrazas L. I. (2015). Extraintestinal helminth infection limits pathology and proinflammatory cytokine expression during DSS-induced ulcerative colitis: A role for alternatively activated macrophages and prostaglandins. *BioMed Research International*, 2015, ID 563425.

León-Cabrera S., Callejas B. E., Ledesma-Soto Y., Coronel J., Pérez-Plasencia C., Gutiérrez-Cirlos E. B., Ávila-Moreno F., Rodríguez-Sosa M., Hernández-Pando R., Marquina-Castillo B., Chirino Y. I., Terrazas L. I. (2014). Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 948–956.

Liu H., Du F., Sun L., Wu Q., Wu J., Tong M., Wang X., Wang Q., Cao T., Gao X., Cao J., Wu N., Nie Y., Fan D., Lu Y., Zhao X. (2019). GATA6 suppresses migration and metastasis by regulating the miR-520b/CREB1 axis in gastric cancer. *Cell Death and Disease*, 10, 1–13.

Lubinieccki A. S., Cypess R. H. (1975). Quantitative study of the effect of previous *Trichinella spiralis* infection on sarcoma 180 ascitic tumor formation in mice. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 26, 329–333.

Matsuo T., Daishaku S., Sadzuka Y. (2019). Lactic acid promotes cell survival by blocking autophagy of B16F10 mouse melanoma cells under glucose deprivation and hypoxic

conditions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 837–839.

Meerovitch E., Bomford R. (1977). Macrophage potentiation by *Trichinella spiralis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 71, 245–247.

Molinari J. A., Carrick L., Lubiniecki A. S. (1979). Influence of *Trichinella spiralis* infection on development of sarcoma 180 ascites tumors. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 30, 429–433.

Mourglia-Ettlin G., Marqués J. M., Chabalgoity J. A., Dematteis S. (2011). Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1293.

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.

Noya V., Bay S., Festari M. F., García E. P., Rodriguez E., Chiale C., Ganneau C., Baleux F., Astrada S., Bollati-Fogolín M., Osinaga E., Freire T. (2013). Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. *International Journal of Oncology*, 43, 775–784.

Oikonomopoulou K., Yu H., Wang Z., Vasiliou S. K., Brinc D., Christofi G., Theodorou M., Pavlou P., Hadjisavvas A., Demetriou C. A., Kyriacou K., Diamandis E. P. (2016). Association between *Echinococcus granulosus* infection and cancer risk - A pilot study in Cyprus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54, 1955–1961.

Pakharukova M. Y., Mordvinov V. A. (2016). The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110, 28–36.

Pastille E., Frede A., McSorley H. J., Gräb J., Adamczyk A., Kollenda S., Hansen W., Epple M., Buer J., Maizels R. M., Klopffleisch R., Westendorf A. M. (2017). Intestinal helminth infection drives carcinogenesis in colitis-associated colon cancer. *PLoS Pathogens*, 13, e1006649.

- Piñón-Zárate G., Herrera-Enríquez M. Á., Hernández-Téllez B., Jarquín-Yáñez K., Castell-Rodríguez A. E.** (2014). GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *Journal of Immunology Research*, 2014, ID 158980.
- Plumelle Y., Gonin C., Edouard A., Bucher B. J., Thomas L., Brebion A., Panelatti G.** (1997). Effect of *Strongyloides stercoralis* infection and eosinophilia on age at onset and prognosis of adult T-cell leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 107, 81–87.
- 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.
- Rad S. R., Daneshpour S., Mofid M. R., Andalib A., Eskandariyan A., Darani H. Y.** (2018). Effect of hydatid cyst antigens on inhibition of melanoma cancer growth in mouse model. *Cellular and Molecular Biology*, 64, 1–5.
- Ramos-Martínez E., Rojas-Serrano J., García-Hernández O., García-Vázquez F. J., Andrade W. A., Avila G., Salinas-Pasquier L., López-Vancell M. R.** (2019). The immune response to *Hymenolepis nana* in mice decreases tumorigenesis induced by 7,12 dimethylbenzanthracene. *Cytokine*, 123, ID 154743.
- Ranasinghe S. L., Boyle G. M., Fischer K., Potriquet J., Mulvenna J. P., McManus D. P.** (2018). Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising therapeutic against breast cancer. *PLoS ONE*, 13, e0200433.
- Ranasinghe S. L., Fischer K., Zhang W., Gobert G. N., McManus D. P.** (2015). Cloning and characterization of two potent Kunitz type protease inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0004268.
- Reichman H., Itan M., Rozenberg P., Yarmolovski T., Brazowski E., Varol C., Gluck N., Shapira S., Arber N., Qimron U., Karo-Atar D., Lee J. J., Munitz A.** (2019). Activated eosinophils exert antitumorigenic activities in colorectal cancer. *Cancer Immunology Research*, 7, 388–400.
- Rodríguez-Rodríguez N., Madera-Salcedo I. K., Bugarin-Estrada E., Sánchez-Miranda E., Torres-García D., Cervantes-Torres J., Fragoso G., Rosetti F., Crispín J. C., Sciutto E.** (2020).

The helminth-derived peptide GK-1 induces an anti-tumoral CD8 T cell response associated with downregulation of the PD-1/PD-L1 pathway. *Clinical Immunology*, 212, ID 108240.

Rosas M., Davies L. C., Giles P. J., Liao C. Te, Kharfan B., Stone T. C., O'Donnell V. B., Fraser D. J., Jones S. A., Taylor P. R. (2014). The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science*, 344, 645–648.*

Ruiz-Manzano R. A., Palacios-Arreola M. I., Hernández-Cervantes R., Del Río-Araiza V. H., Nava-Castro K. E., Ostoa-Saloma P., Muñoz-Cruz S., Morales-Montor J. (2020). Potential novel risk factor for breast cancer: *Toxocara canis* infection increases tumor size due to modulation of the tumor immune microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10, 736.

Salagianni M., Baxevanis C. N., Papamichail M., Perez S. A. (2012). New insights into the role of NK cells in cancer immunotherapy. *Oncolmmunology*, 1, 205-207.

Sharafi S. M., Rafiei R., Rafiei R., Hadipour M., Shirzad H., Khanahmad H., Darani H. Y. (2016). A nonglycosylated 27 KDa molecule as common antigen between human breast cancer and *Echinococcus granulosus*; hydatid cyst wall. *Advances in Breast Cancer Research*, 5, 90–95.

Shepherd J. C., Aitken A., McManus D. P. (1991). A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44, 81–90.

Specht D., Voge M. (1965). Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory. *The Journal of parasitology*, 51, 268–272.

Springer G. F. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*, 75, 594-602.

Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. (1998). Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*, 84, 74–81.

Todd K. S., Simon J., Dipietro J. A. (1978). Pathological changes in mice infected with tetrathyridia of *Mesocestoides corti*. *Laboratory Animals*, 12, 51–53.

Torres-García D., Pérez-Torres A., Manoutcharian K., Orbe U., Servín-Blanco R., Fragoso

G., Sciutto E. (2017). GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine*, 35, 5653–5661.

Tugues S., Burkhard S. H., Ohs I., Vrohling M., Nussbaum K., Vom Berg J., Kulig P., Becher B. (2015). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation*, 22, 237-246.*

Turhan N., Esendagli G., Ozkayar O., Tunali G., Sokmensuer C., Abbasoglu O. (2015). Co-existence of *Echinococcus granulosus* infection and cancer metastasis in the liver correlates with reduced Th1 immune responses. *Parasite Immunology*, 37, 16–22.

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.

Vasilev S., Ilic N., Gruden-Movsesijan A., Vasilijic S., Bosic M., Sofronic-Milosavljevic L. (2015). Necrosis and apoptosis in *Trichinella spiralis*-mediated tumour reduction. *Central European Journal of Immunology*, 40, 42–53.

Vendelova E., Hrčková G., Lutz M. B., Brehm K., Nono J. K. (2016). *In vitro* culture of *Mesocestoides corti* metacestodes and isolation of immunomodulatory excretory-secretory products. *Parasite Immunology*, 38, 403–413.

Vera-Aguilera J., Perez-Torres A., Beltran D., Villanueva-Ramos C., Wachtel M., Moreno-Aguilera E., Vera-Aguilera C., Ventolini G., Martínez-Zaguilán R., Sennoune S. R. (2017). Novel treatment of melanoma: Combined parasite-derived peptide GK-1 and anti-programmed death ligand 1 therapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 32, 49–56.

Wang J., Kubes P. (2016). A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell*, 165, 668–678.

Wang X. L., Fu B. Q., Yang S. J., Wu X. P., Cui G. Z., Liu M. F., Zhao Y., Yu Y. L., Liu X. Y., Deng H. K., Chen Q. J., Liu M. Y. (2009). *Trichinella spiralis* - A potential anti-tumor agent. *Veterinary Parasitology*, 159, 249–252.

Weatherly N. F. (1970). Increased survival of Swiss mice given sublethal infections of

Trichinella spiralis. *The Journal of Parasitology*, 56, 748.

Willms K., Zurabian R. (2010). *Taenia crassiceps*: *In vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*, 137, 335-346.

Wing E. J., Krahenbuhl J. L., Remington J. S. (1979). Studies of macrophage function during *Trichinella spiralis* infection in mice. *Immunology*, 36, 479-485.

Yong W. K., Heath D. D., Savage T. (1979). Possible antigenic similarity between pulmonary carcinoma and cysts of *Echinococcus granulosus*. *British Medical Journal*, 1, 1463-1464.

Yousofi Darani H., 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, ID 304183.

Zalata K. R., Nasif W. A., Ming S.-C., Lotfy M., Nada N. A., El-Hak N. G., Leech S. H. (2005). p53, Bcl-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt. *Cellular oncology*, 27, 245-53.

Zamarron B. F., Chen W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International Journal of Biological Sciences*, 7, 651-658.*

Zhang W., Ross A. G., McManus D. P. (2008). Mechanisms of immunity in hydatid disease: Implications for vaccine development. *The Journal of Immunology*, 181, 6679-6685.

*) sekundární zdroje