

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

***IN VITRO* KULTIVACE TASEMNICE *HYMENOLEPIS DIMINUTA* – 2**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Dominik Jandura

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

Děkuji PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za odborné rady a příkladné vedení mé diplomové práce s důrazem na pečlivost, soběstačnost a dobrou orientaci v laboratorním prostředí.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Dominik Jandura

Školitel: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* kultivace tasemnice *Hymenolepis diminuta* – 2

Náplní této diplomové práce bylo získat cysticerkoidy tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*), excystovat je a najít podmínky pro maximální dobu inkubace *in vitro*. Jako mezihostitel byl užit potěmník moučný (*Tenebrio molitor*) infikován potkaním trusem obsahujícím vajíčka tasemnice. Excystace byla prováděna prostřednictvím L-cysteinu a tauroglykocholátu sodného. Excystované larvy byly *in vitro* kultivovány (37 °C, 5 % CO₂) v médiu RPMI 1640 obohaceném o další látky vybrané na základě předchozích metod. Jednalo se zejména o extrakty z potkaních, myších a ovčích jater, případně v kombinaci s kvasnicovým extraktem a ovčí žlučí. Vliv testovaných látek na kultivaci byl hodnocen měřením nárůstu tasemnic. Nejlepší vliv mělo médium obsahující sérum, kvasnicový extrakt a extrakt z ovčích jater, kde tasemnice k 16. dni dosahovaly velikosti 1561 µm. Další růst byl limitován výskytem patologických útvarů.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Dominik Jandura

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* cultivation of tapeworm *Hymenolepis diminuta* – 2

Aim of this diploma thesis was to obtain cyclicercoids of the rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*), excyst them and find out the conditions for the maximal *in vitro* incubation period. As the intermediate host mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) infected by the rat feces containing tapeworm eggs was used. Excystment was done using L-cystein and sodium tauroglycocholate. Excysted larvae were cultured *in vitro* (37 °C, 5 % CO₂) in RPMI 1640 medium enriched with other substances chosen according previously published methods. Mainly sheep, mouse or rat liver extracts eventually in combination with yeast extract and sheep bile were used. The effect of tested substances on the cultivation was evaluated by measuring of the tapeworm's growth. The best effect on the grow of the tapeworms was observed using medium containing serum, yeast extract and sheep liver extract where tapeworms achieved length of 1561 µm after 16 days of incubation. The further growth was limited by appearance of pathologic formations.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. ÚVOD.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Tasemnice	10
3.2. <i>Hymenolepis diminuta</i>	11
3.2.1. Životní cyklus	11
3.2.2. Anatomie a fyziologie.....	13
3.2.3. Excystace cysticerkoidů.....	15
3.2.4. Crowding efekt	16
3.2.5. Hymenolepióza	16
3.2.6. <i>In vitro</i> kultivace	16
4. CÍLE PRÁCE	19
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
5.1. Chemikálie	20
5.2. Biologický materiál.....	20
5.3. Použitá zvířata.....	21
5.4. Použité přístroje	21
5.5. Chov mezihostitelů	21
5.6. Infikace mezihostitele	22
5.7. Izolace cysticerkoidů z mezihostitele	22
5.8. Infikace definitivního hostitele	23
5.9. Excystace cysticerkoidů.....	24
5.10. Příprava kultivačních médií	25
5.11. Médium s jaterním extraktem	25
5.12. Médium s kvasnicovým extraktem	26
5.13. Médium s kvasnicovým a jaterním extraktem	27
5.14. Médium s kvasnicovým extraktem, jaterním extraktem a žlučí	27
5.15. Dvoufázové médium s agarem.....	28
5.16. Kultivace	28
5.17. Vyhodnocování nárůstu	29
6. VÝSLEDKY.....	30

6.1.	Médium s jaterními extrakty	30
6.2.	Médium s kvasnicovým extraktem	34
6.3.	Médium s kvasnicovým a jaterním extraktem	36
6.4.	Médium s kvasnicovým extraktem, jaterním extraktem a žlučí	39
7.	DISKUSE	42
8.	ZÁVĚR.....	44
9.	LITERATURA	45
10.	PŘÍLOHY.....	49

1. SEZNAM ZKRATEK

HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

2. ÚVOD

Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) je důvěrně známý druh třídy tasemnic (Cestoda). Její stavba těla, fyziologie, biochemie a další aspekty života, jak *in vivo*, tak *in vitro*, jsou důkladně prozkoumány a popsány. Díky tomu je oblíbeným modelem pro zkoumání života tasemnic a testování anthelmintik.

V posledních letech lze zaznamenat o tasemnice zvýšený zájem. Došlo k tomu po zjištění jejich pozitivního vlivu na některé autoimunitní choroby a v současné době je zkoumáno jejich využití v helmintoterapii. Helmintoterapie se stala perspektivním oborem, kterému však stojí v cestě předsudky a etické aspekty. Některé preparáty jsou již v III. fázi klinického testování. U *H. diminuta* byl mimo jiné sledován pozitivní vliv na ulcerózní kolitidu a revmatoidní artritidu (Melon et al. 2009, Graepel et al. 2013, Lukeš et al. 2014).

Jediná aktuální možnost, jak získat dospělého jedince *H. diminuta*, je izolace z hostitelského organismu. Úspěšná metodika *in vitro* kultivace by vedla ke snížení nutnosti užití laboratorních zvířat. Testování účinnosti anthelmintik by bylo možné provádět ve větším počtu experimentů, za nižších finančních nákladů a s vyšší statistickou výpovědní hodnotou. Testy by navíc nebyly ovlivněny diverzitou hostitelů. Metody *in vitro* kultivace lze obvykle využít ve stejném uspořádání či s drobnými úpravami u různých druhů tasemnic. Získané výsledky by tak měly význam nad rámec kultivace *H. diminuta*.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Tasemnice*

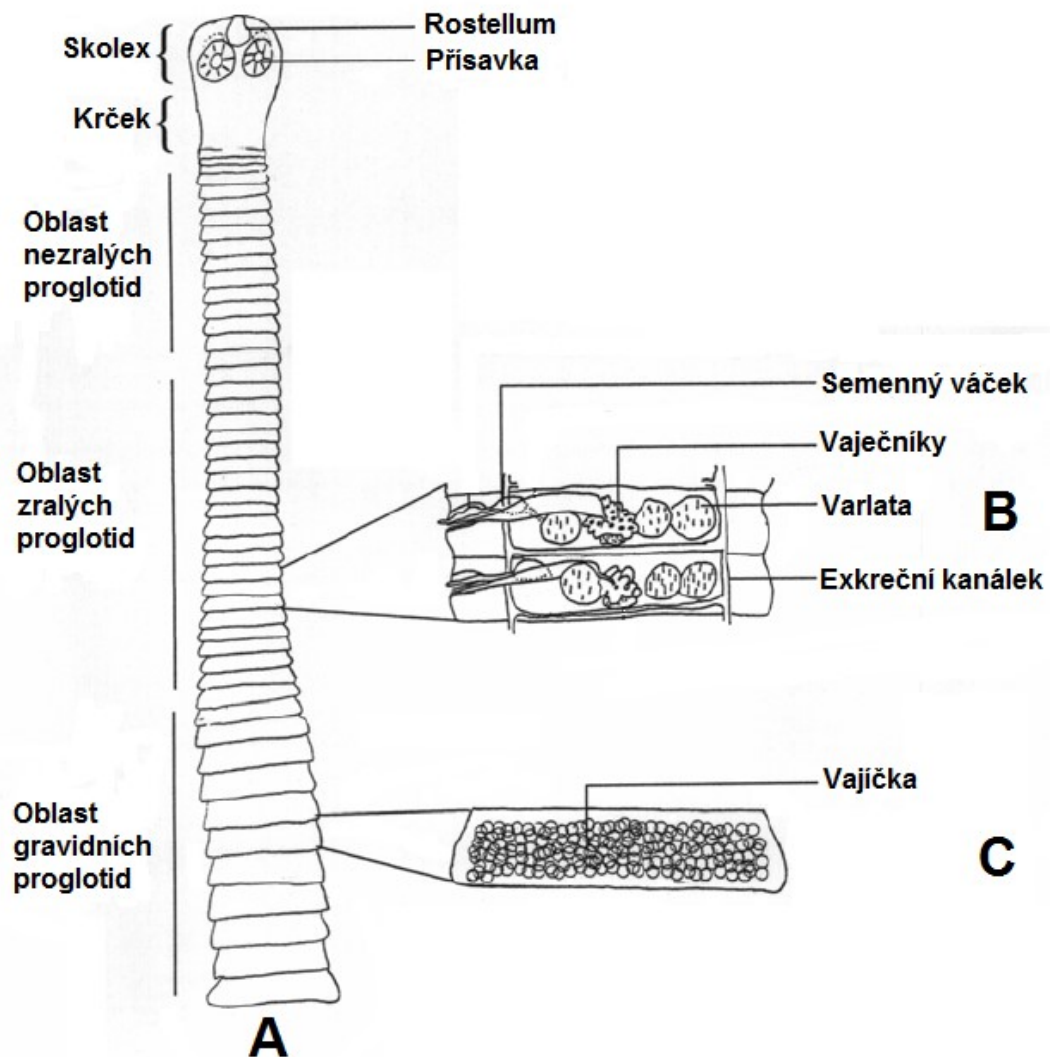
Tasemnice (Cestoda) jsou třídou vysoce specializovaných ploštěnců (Platyhelminthes) parazitujících u všech skupin obratlovců. Je znám bezpočet druhů individuálně adaptovaných na chování, výživu a imunologii svých hostitelů. Většina tasemnic vyžaduje přinejmenším dva druhy hostitelů k vývoji rozdílných stádií svého životního cyklu. Dospělé tasemnice obývají střevo obratlovce (definitivní hostitel). Některé druhy jsou specificky přizpůsobeny na člověka (Farrar et al. 2013).

Charakteristickým rysem dospělých tasemnic je absence trávicího traktu. Živiny jsou přijímány tegumentem na povrchu jejich těla. Tato struktura s velkým počtem mikrotrichů (přeměněné mikroklky) kromě výživy zajišťuje i ochranu tasemnice před prostředím (inhibice trávicích enzymů hostitele). Exkreční systém je tvořen protonefridiemi (Volf et al. 2007, Castro 1996).

Základní stavba těla tasemnice zahrnuje hlavičku (skolex) s orgány sloužícími k přichycení ke střevní stěně hostitele (viz Obr. 1A), dále krček, což je místo aktivní proliferace článků (proglotid) a řetěz článků nazývaný strobila (Castro 1996).

Články poblíž krčku jsou nezralé, protože nemají plně vyvinuté pohlavní orgány. Články umístěné distálněji jsou zralé se samčími i samičími pohlavními orgány. Jedná se tedy o hermafrodity. K oplození dochází mezi dvěma tasemnicemi nebo mezi články na stejné strobile, pokud střevo obývá jediná tasemnice. Terminální články jsou gravidní s dělohou vyplněnou vajíčky (Volf et al. 2007, Castro 1996).

Většina tasemnic parazitujících u člověka patří do řádu kruhovek (Cyclophyllidea), kam spadá i druh *H. diminuta*.



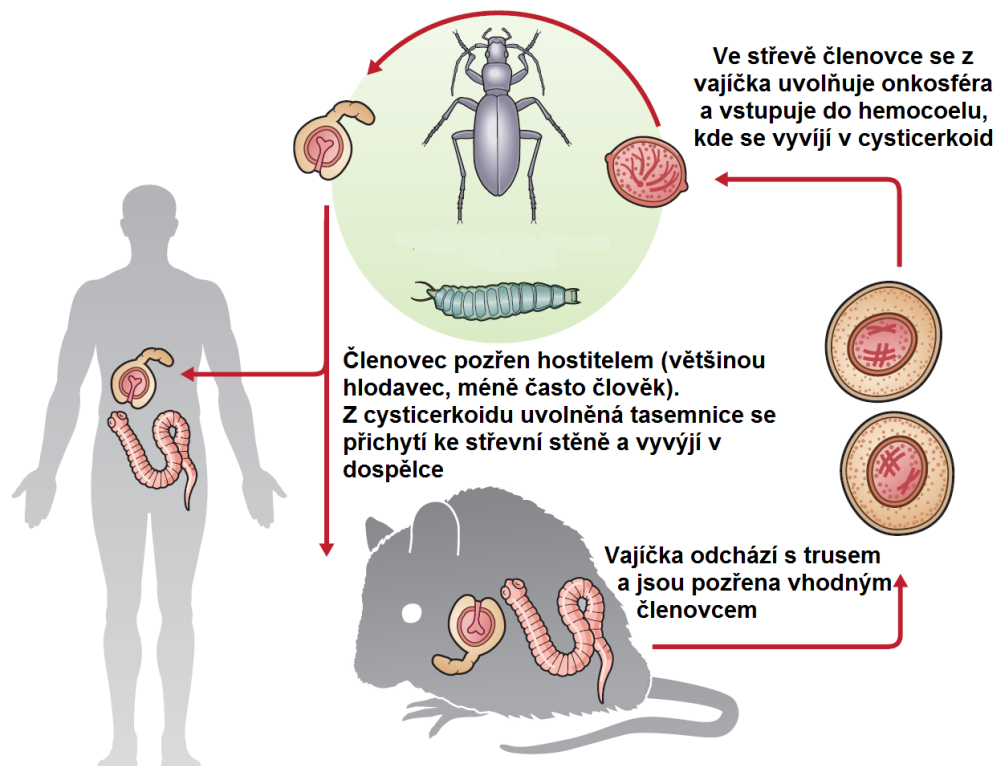
Obr. 1 Základní schéma stavby těla *H. diminuta*. A – dospělá tasemnice, B – zralá proglotida, C – gravidní proglotida. Upraveno dle: Brant a Hanelt (2000)

3.2. *Hymenolepis diminuta*

3.2.1. Životní cyklus

Životní cyklus *H. diminuta* je ilustrován na Obr. 2. Dospělé tasemnice produkují onkosféry kryté larválními obaly a pláštěm. Pravděpodobně kvůli silnému plášti jsou onkosféry často označovány jako vajíčka, i když tento termín není zcela přesný. Spolu s trusem opouští definitivního hostitele, a pokud jsou pozřeny vhodným mezihostitelem, vyvíjí se v metacestod, larvální stádium chráněné vnějšími obaly. Jako mezihostitel může

sloužit např. potěmník moučný (*Tenebrio molitor*), potěmník skladištní (*Tribolium confusum*), blecha kryší (*Nosopsyllus fasciatus*), blecha morová (*Xenopsylla cheopis*), či blecha myší (*Leptopsylla segnis*). Takto infikovaný hmyz vykazuje pomalejší pohyb, horší orientaci, sníženou fotofobii a zvýšenou délku života v porovnání s neinfikovanými jedinci. To zvyšuje pravděpodobnost ulovení definitivním hostitelem a pozření. Po pozření a průchodu horní částí trávicího traktu se z metacestodu uvolňuje larva, která se uchytí v tenkém střevě ve vzdálenosti přibližně 25 cm za žaludkem. Po dosažení dospělosti produkuje vajíčka a cyklus se uzavírá. Prepatentní perioda (doba mezi infekcí cysticerkoidem a prvním výskytem vajíček v trusu) se pohybuje kolem osmnácti dní. Nejčastějším definitivním hostitelem bývá krysa (*Rattus rattus*), potkan (*Rattus norvegicus*), myš (*Mus musculus*), ale výskyt je pozorován i u mnoha dalších druhů savců včetně člověka (Lethbridge 1971, Hurd a Fogo 1991, Hurd et al. 2001).



Obr. 2 Životní cyklus *H. diminuta*. Upraveno dle: Farrar et. al (2013)

3.2.2. Anatomie a fyziologie

Dospělý jedinec

Dospělý jedinec *H. diminuta* se stejně jako u řady jiných tasemnic skládá ze skolexu, krčku a proglotid (viz oddíl 3.1.).

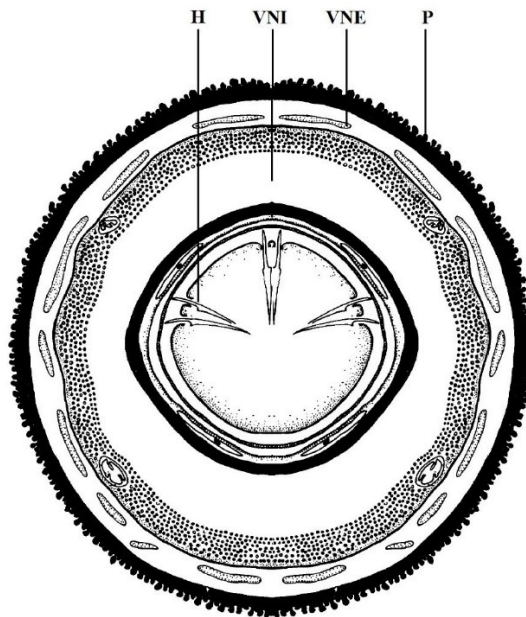
Skolex *H. diminuta* obsahuje dva páry přísavek zajišťujících adhezi. Apikálně, uprostřed mezi přísavkami, je umístěno rostellum, zasunovatelný hruškovitý orgán. Zevně se objevuje jako slabý dvoulaločný výčnělek hustě pokrytý mikrotrichy (viz Obr. 1A). Na rozdíl od např. *Hymenolepis nana* není opatřen háčky (Arai 1980).

Nezralá proglotida obsahuje diferencovaný tegument, exkreceční, muskulární a nervový systém, ale buňky formující reprodukční systém zde nejsou plně diferencovány. Plně vyztřalé proglotidy (viz Obr. 1B), včetně reprodukčního systému, jsou vzdáleny přibližně 40 mm za skolexem. Samčí pohlavní systém je složen ze tří varlat, ve kterých se vyvíjí a uskladňují spermatozoa, dále ze semenného vřčku a cirrusu, vysunovatelného orgánu uloženého v cirrusovém vaku, který se během kopulace zasunuje do genitálního atria. Samičí pohlavní systém slouží k produkci oocytů, uskladňuje spermatozoa do doby oplodnění, podporuje tvorbu larválního obalu a skladuje vyvinuté larvy. Oocyty se vyvíjí v ovariiích a po dozřání vstupují do vejcovodu. Fertilizace se uskutečňuje vstupem spermatozoí uskladněných v semenném vřčku do vejcovodu skrz semenný kanálek. Každá zygota splývá se žloutkovou buňkou, která jí poskytuje dva membranózní obaly, larvální obal a přispívá k utváření pláště. Takto vytvořená embrya vstupují do dělohy, kde se vyvíjejí v larvální stádia (onkosféry) a zůstávají zde až do uvolnění proglotidy (Arai 1980).

Onkosféra

Onkosféra je u *H. diminuta* vybavena třemi páry háčků, proto je také nazývána jako hexakant. Jeden pár háčků je umístěn mediálně a dva páry laterálně. Mezi nimi se nacházejí penetrační žlázy. Celá onkosféra je kryta třemi ochrannými obaly: širokým vnitřním obalem, tenkým vnějším obalem a vnějším pouzdrém s výrazným pláštěm (viz Obr. 3). Při požití vhodným mezihostitelem se vlivem trávicího systému onkosféra

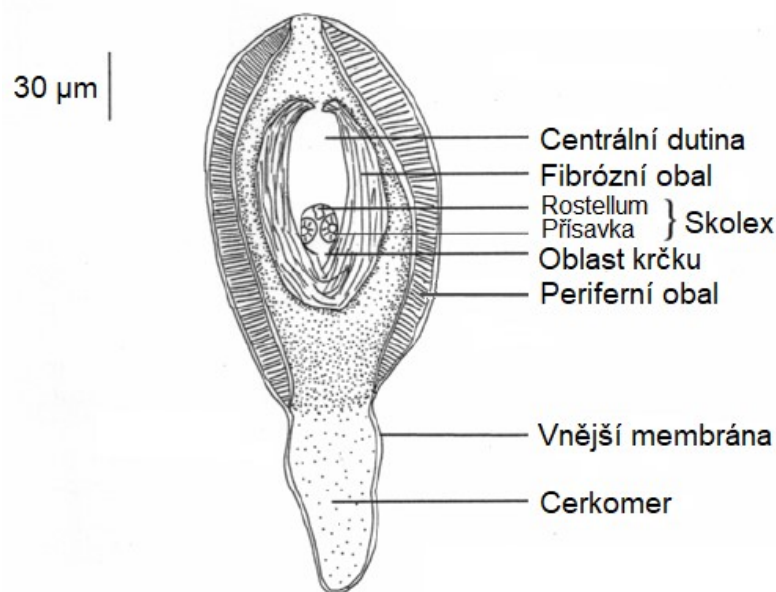
uvolňuje ze svých ochranných obalů a s pomocí háčků a penetračních žláz vstupuje do hemacoelu, kde se v průběhu přibližně 14 dní (v závislosti na teplotě a stavu meziphostitele) vyvíjí v metacestod, lárvalní stádium infekční pro definitivního hostitele, v případě *H. diminuta* označované jako cysticercoid (Ogren 1961, Rybicka 1967, Rybicka 1972).



Obr. 3 Schéma onkosféry s ochrannými obaly. H – háčky, VNI – vnitřní obal, VNE – vnější obal, P – plášť. Upraveno dle: Rybicka (1972)

Cysticercoid

V prvních několika dnech po vstupu do hemacoelu meziphostitele si onkosféra zachovává kulovitý tvar a narůstá. Přibližně po týdnu se objevuje centrální dutina neboli cysta (odtud název cysticercoid), larva se prodlužuje a formuje se ocasu podobná část označovaná jako cercomer. Devátý den je na přední části rozeznatelný skolex se čtyřmi přísavkami, cercomer narůstá. Desátý den je skolex vtažen do centrální dutiny, kterou obklopuje fibrózní obal. Naproti skolexu je zřetelný spojovací kanálek vedoucí z vnějšku cysticercoidu do dutiny. Dále je na průřezu rozeznatelný periferní obal a vnější membrána (viz Obr. 4). Dva týdny po infekci je cysticercoid plně vyvinutý a infekční. Fibrózní obal se stářím narůstá. Po pozření meziphostitele definitivním hostitelem se z obalů a vnější membrány cysticercoidu uvolňuje tasemnice procesem zvaným excystace (Šlais 1973, Chervy 2002, Rothman 1957).



Obr. 4 Schématické znázornění cysticerkoidu. Upraveno dle: Brant a Hanelt (2000)

Růst v konečném hostiteli

Střední délka tasemnic po excystaci je 175 μm. V prvním týdnu po infekci rostou exponenciálně a nejsou ovlivněny tzv. crowding efektem (viz níže). Poté vstupují do fáze zpomaleného růstu. Kolem čtrnáctého dne po infekci dosahují tasemnice maximální velikosti (až 70 cm) a sedmnáctý den lze pozorovat uvolnění onkosfér. Výsledná velikost závisí na jejich počtu ve střevě, druhu hostitele, potravě a dalších faktorech. Co se týče délky života, Read (1967) udržoval *H. diminuta* naživu opakovanými transplantacemi mezi definitivními hostiteli 14 let, dobu výrazně převyšující život potkana, běžného hostitele (Roberts 1961).

3.2.3. Excystace cysticerkoidů

Excystací se rozumí uvolnění larvy z ochranných obalů. Probíhá ve dvanáctníku definitivního hostitele. Nepostradatelnou roli mají žlučové soli jejichž vlivem je larva uvnitř aktivována a skrze spojovací kanálek opouští centrální dutinu. Trávicí enzymy (zejména pepsin, trypsin) a HCl natráví ochranné obaly a larva je uvolněna. Excystované

larvy jsou velmi aktivní. Podélně se střídavě natahují a zkracují, což umožňuje jejich pohyb a usnadňuje přichycení ke střevní stěně (Rothman 1959, Arai 1980).

3.2.4. Crowding efekt

Crowding efekt zahrnuje regulaci velikosti a plodnosti populace v daném organismu. Jedná se o komplexní funkci v reakci na množství potravy a fyzický prostor. Velikost tasemnic v definitivním hostiteli je nepřímo úměrná jejich počtu. Tento efekt je *in vivo* detekovatelný nejdříve mezi 8. až 10. dnem po infekci. Roberts (1961) navrhl, že *H. diminuta* vylučuje látky, jež ovlivňují růst ostatních jedinců. Cook (1989) tuto hypotézu při svých testech potvrdil.

3.2.5. Hymenolepióza

H. diminuta je nejčastěji parazitem hlodavců. U člověka je nákaza vzácná, protože na rozdíl od *H. nana*, kde je možný přímý přenos z člověka na člověka, je infekční pouze prostřednictvím mezihostitele. Děje se tak nejčastěji u dětí náhodným pozřením infikovaných blech či v exotických zemích po jídání tepelně neupraveného hmyzu (Farrar 2013, Wiwanitkit 2004).

Nákaza u člověka je většinou asymptomatická. K možným projevům patří abdominální bolest, nauzea, zvracení, průjem a svědění. Diagnóza je prováděna mikroskopickým pozorováním vzorku stolice s určením druhu tasemnice. Lékem volby je praziquantel. Dále je často užíván niklosamid, který dosahuje obdobného účinku při nižší toxicitě (Patamia et al. 2010, Auer a Aspöck 2014).

3.2.6. *In vitro* kultivace

Snahou *in vitro* kultivace je napodobit podmínky života *in vivo* a dosáhnout vývoje sledovaného organismu. Cílem této práce bylo zejména najít a optimalizovat postup pro kultivaci excystovaných larev *H. diminuta* do stádia dospělých jedinců produkujících vajíčka. Důraz byl přitom kladen na jednoduchost a reprodukovatelnost

metody, aby bylo možné s nevelkým úsilím získat dostatečný počet jedinců pro další účely.

Kultivace onkosféry v cysticerkoid

In vivo je pro uvolnění onkosféry z ochranných obalů nutné dostatečné narušení pláště kusadly brouka a kontakt s trávicími šťávami. Pro *in vitro* uvolnění onkosfér Berntzen a Voge (1965) nejprve narušili vnější plášť třepáním vajíček v Earle roztoku se skleněnými kuličkami, a poté přesunuli vajíčka do média obsahujícího trypsin a amylasu. Uvolněné onkosféry byly kultivovány v upraveném Landureaově médiu, kde vykazovaly standardní vývoj vedoucí k infekčním cysticerkoidům. Obdobnou techniku užívali Graham a Berntzen (1970), kteří kultivovali onkosféry v médiu s potkaními fibroblasty. Získané zralé cysticerkoidy *in vitro* excystovali a larvy dále kultivovali až do stádia dospělosti (Arai 1980, Lethbridge 1971).

Excystace cysticerkoidu

Při rozsáhlých testech zjišťoval Rothman (1959) vliv teploty, pH, proteolytických enzymů a žlučových solí (experimentoval s taurocholátem sodným) na excystaci cysticerkoidů. Většina metodik je vyvinuta na základě jeho pozorování. Cysticerkoidy získané z mezihostitele jsou promyty v některém z isotonických roztoků (Hanksův, Ringerův nebo fyziologický), dále při teplotě 37–39 °C přeneseny do kyselého roztoku pepsinu, po 10–15 minutách promyty a přeneseny do roztoku s trypsinem a žlučovými soli, kde excystují. Schiller (1965) dosáhl excystace v neředěné hovězí žluči a Berntzen (1961) v Tyrodeho roztoku. Velmi dobrých výsledků dosáhli McVeigh et al. (2014) při užití roztoku s tauroglykocholátem sodným a L-cysteinem.

Mladé cysticerkoidy lze excystovat pouhou přítomností žlučových solí. U starších cysticerkoidů sice dochází k aktivaci larev, ty jsou ale uvězněny uvnitř ochranných obalů a bez pomoci trávicích enzymů nedochází k jejich uvolnění (viz Příloha 3). Prodloužené vystavení již excystovaných larev trávicím enzymům snižuje jejich životaschopnost (Rothman 1959).

Vybrané metody kultivace

Berntzen (1961) kultivoval tasemnici z *in vitro* excystovaných larev do stádia dospělých jedinců produkujících preonkosféry. Kultivační médium obsahovalo Tyrodeho roztok, lidskou plazmu a bylo obohaceno o cystein, tyroxin, methyl-testosteron, vitamíny skupiny B, kvasnicový extrakt a extrakt z kuřecího embrya. Médium neustále jemně proudilo kultivační trubicí. Kultivační aparatura byla složitá a metoda instrumentálně náročná. Při absenci proudění média tasemnice nevykazovaly růst a diferenciaci. Bez methyl-testosteronu tasemnice sice vykazovaly růst, ale diferenciaci proglotid byla inhibována. Tasemnice dosáhly 15. dne maximální délky 20,8 cm. Tato metoda byla úspěšně užita pro kultivaci některých dalších zástupců Cestod, ale stejně dobrých výsledků, jako byly popsány v původní práci, se u *H. diminuta* nepodařilo nikomu znovu dosáhnout.

Schillerovi (1965) se podařilo vykultivovat z cysticerkoidů dospělé jedince produkující infekční onkosféry. Dvojfázové médium složené z krevního agarů překrytého Hanksovým vyváženým solným roztokem bylo umístěno do Dubnoffova třepacího inkubátoru. Tasemnice byly pravidelně přenášeny do čerstvého média, od 10. dne s přidavkem práškové glukosy. Zralé proglotidy byly uvolňovány 24. den kultivace. Většina tasemnic se vyskytovala v kapalně fázi média, žádná se nenacházela v krevním agaru. Tasemnice dosahovaly menšího vzrůstu než *in vivo*. Jedinci získaní z jejich vajíček narůstali *in vivo* opět do standardní velikosti.

Sinha a Hopkins (1967) dosáhli dobrých výsledků při kultivaci *H. nana* v médiu složeném z Hanksova vyváženého solného roztoku s přidavkem koňského séra, kvasnicového extraktu a jaterního extraktu. Zjistili, že extrakt z ovčích jater má stejnou účinnost jako extrakt z potkaních jater. Bez jaterního extraktu docházelo k růstu, ale tasemnice nebyly schopné produkovat zralá vajíčka, dokud tento nebyl přidán.

Podobně postupoval Evans (1970) při kultivaci *Hymenolepis microstoma*. Upravené Eagleovo médium s přidavkem jaterního extraktu a koňského séra bylo obohaceno o hovězí žluč. Tasemnice dosahovaly dospělosti a produkovaly vajíčka. Pokud médium neobsahovalo žluč, docházelo k normálnímu růstu, ale ne k produkci vajíček.

4. CÍLE PRÁCE

- Získat cysticerkoidy *H. diminuta*
- Excystovat získané cysticerkoidy
- Nalézt podmínky pro maximální dobu kultivace na základě dostupné literatury a závěrů práce *In vitro* kultivace tasemnice *Hymenolepis diminuta* (Pavličková 2015)

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Chemikálie

Amfotericin B, Sigma-Aldrich

Fetal Bovine Serum – GE healthcare Life Sciences

HEPES – 1M roztok, Sigma-Aldrich

Hydrogenuhličitan sodný, Penta

Chlorid sodný, Penta

Kvasnicový extrakt (Bacto™ Yeast Extract), BD Biosciences

Kyselina chlorovodíková, Penta

L-cystein, Fluka BioChemika, později Sigma-Aldrich

Penicilin/Streptomycin, Sigma-Aldrich

Purifikovaná voda (18 MΩ·cm), výrobce Merck Millipore

RPMI 1640–R 8758, Sigma-Aldrich

Tauroglykcholát sodný, Ausmauseo Pharma

5.2. Biologický materiál

Játra – myš (*Mus musculus*, kmen NMRI), samec, Lékařská fakulta,
Masarykova Univerzita

Játra – ovce domácí (*Ovis aries*, plemeno Suffolk), samice, chov Dibaq a. s.,
Helvíkovice

Játra – potkan (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar), samec, Meditox Konárovice

Žluč – ovce domácí (*Ovis aries*, plemeno Suffolk), samec, Dibaq a. s.,
Helvíkovice

5.3. Použitá zvířata

potemník moučný (*Tenebrio molitor*), larvální stádia, ZooExpo Hradec Králové

potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar), 2 samci, Meditox Konárovice¹

tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*, kmen WMS), vlastní odchov

5.4. Použité přístroje

centrifuga Biofuge stratos, Heraeus

homogenizátor Potter-Elvehjem, B. Braun Biotech.

inkubátor Hera cell, Heraeus

kamera COOL – 1300Q, VDS Vosskühler GmbH

laminární box aura 2000 M.A.C., Bioair instruments

mikroskop ECLIPSE TS100, Nikon

pH metr Level 2, inoLab

program NIS Elements, 3.0

stereolupa

váhy AY412, Sartorius

váhy CP225D, Sartorius

5.5. Chov mezihostitelů

Za mezihostitele byl zvolen potemník moučný (*T. molitor*) z důvodu dlouhodobých zkušeností při experimentech prováděných na pracovišti Pavlíčkovou (2015) a snadnou dostupností. Jeho larvální stádia lidově označována jako mouční červi jsou užívána ke krmení plazů a jsou dostupná ve většině zverimexů.

Jedná se o hmyz s proměnou dokonalou. Po vylíhnutí z vajíček rostou larvy dva až tři měsíce v závislosti na vlhkosti a teplotě prostředí. Po zakuklení se zhruba během dvou týdnů z larvy líhne dospělec, který se dožívá kolem tří měsíců. Ačkoliv lze infikovat

¹ Pozn.: Použití laboratorních potkanů bylo schváleno odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a rezortní komisí MŠMT. Povolení č.j.: MSMT-7041/2014-9 Projekt s názvem: Helmintorezistence – mechanismy vzniku a možnosti řešení

i larvu potemníka moučného a získat z ní cysticerkoidy (Voge a Graiwer 1964), mnohem výhodnější je užívat dospělé brouky, kdy je bez velkého úsilí možné získat dostatečný počet silně infikovaných jedinců, a tedy stabilní zdroj cysticerkoidů. Infikace larev potemníka moučného na rozdíl od dospělého bývá problematická.

Larvy zakoupené ve zverimexu byly umístěny do plastové bedny s perforovaným víkem. Jako potrava sloužilo sušené pečivo a granule pro potkany. Přísun vody byl zajištěn ubrousky z buničiny vlhčenými každé dva až tři dny. Potemníci byly pravidelně kontrolováni a zakuklení jedinci separováni, aby se zabránilo jejich okusu ze strany larev. Dospělí jedinci byli odebíráni do další nádoby, kde byli s přísunem vody a stravy skladováni až do doby infikace.

5.6. Infikace mezipřenosce

Dospělí jedinci potemníka přibližného stáří jeden týden byli 24 hodin před plánovanou infikací separováni v plastových perforovaných krabičkách ve skupinách po šesti jedincích bez potravy a vody. Druhý den byl do každé krabičky vložen trus potkanů obsahující vajíčka tasemnic, který začali brouci ihned konzumovat. Přísun vody a potravy byl obnoven po dalších dvou dnech. Zdrojem trusu pro prvotní infikaci byl potkan infikovaný Pavlíčkovou (2015). Za účelem zajištění stabilního zdroje vajíček tasemnice byli později infikováni další potkani.

5.7. Izolace cysticerkoidů z mezipřenosce

Rychlost vývoje onkosféry ve zralý infekční cysticerkoid je závislá na teplotě, proto byli pro získání cysticerkoidů a následnou excystaci užívání brouci 3. – 4. týden po infikaci. V případě kratší doby nebyly cysticerkoidy dostatečně vyvinuté (viz Příloha 2). Po příliš dlouhé době (více, než 6 týdnů po infikaci) nastal problém s excystací, kdy byla larva sice aktivována, ale nedokázala opustit ochranné obaly cysticerkoidu (viz Příloha 3).

Brouci byli usmrceni dekapitací a jejich tělo fixováno entomologickým špendlíkem v oblasti hrudi k molitanové podložce na petriho misce. Po odstranění krovek a křídel nůžkami bylo tělo podélně nastříženo na ventrální straně a vyvrženo do čerstvé

připraveného fyziologického roztoku v petriho misce. Další kroky byly prováděny pod stereolupou při zvětšení 20–40 x.

Jemnými krouživými pohyby byly cysticerkoidy odděleny od zbytků orgánů a mikropipetou přeneseny do silnostěnné skleněné misky (tzv. embryo dish užívaná v mikroskopii k barvení preparátů) s čistým fyziologickým roztokem. Do každé misky byly pipetovány cysticerkoidy do celkového množství 40–60 z několika brouků různého data infekce pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšné excystace. Miska byla kvůli zabránění vysychání zakryta sklíčkem a cysticerkoidy v ní uchovány při laboratorní teplotě až do doby excystace. Nejvýše 2 hodiny.

5.8. Infikace definitivního hostitele

Pro infikaci mezihostitelů bylo nutné získat definitivního hostitele sloužícího jako stálý zdroj trusu obsahujícího vajíčka tasemnice. Jako definitivní hostitel byl zvolen potkan kmene Wistar. Nákaza by teoreticky mohla být provedena přirozenou cestou podáním živých potemníků infikovaných tasemnicí, ale nebyl by znám počet obsažených cysticerkoidů. Hrozila by neúspěšná infikace z důvodu málo vyvinutých cysticerkoidů, jejich nízkého počtu či naopak masivní infekce ohrožující potkana. Proto bylo postupováno následovně:

1. Jednu hodinu před plánovanou infikací byly z mezihostitelů získány cysticerkoidy. Přesně deset cysticerkoidů bylo vloženo do zkumavky s přibližně 2 ml fyziologického roztoku.
2. V exikátoru byl uveden potkan do lehké celkové anestezie za pomoci etherových výparů.
3. Obsah zkumavky s cysticerkoidy byl natažen do injekční stříkačky a s pomocí žaludeční sondy aplikován potkanovi do žaludku. Bylo nutné pod stereolupou kontrolovat, zda na vnitřní straně stříkačky neulpěly některé cysticerkoidy a případně je znovu aplikovat potkanovi s malým množstvím fyziologického roztoku.
4. Po třech týdnech byl trus potkana testován na přítomnost vajíček tasemnice.

Veškerá manipulace s potkany byla prováděna v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týraní 246/1992 Sb. Použití laboratorních potkanů bylo schváleno odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a rezortní komisí MŠMT. Povolení č.j.: MSMT-7041/2014-9
Projekt s názvem: Helmintorezistence – mechanismy vzniku a možnosti řešení.

5.9. *Excystace cysticerkoidů*

Excystace byla prováděná metodou, jež používala Pavlíčková (2015) na základě výsledků McVeigh et al. (2014). Do dvou plastových zkumavek byly připraveny roztoky dle Tab. 1.

Tab. 1 Rozpis roztoků pro excystaci

Roztok	Látka	Množství
I	NaCl	45 mg
	NaHCO ₃	60 mg
	Tauroglykocholát sodný	40 mg
	dd H ₂ O	5 ml
II	L-cystein	40 mg
	1M – HCl*	250 µl
	dd H ₂ O	4,75 ml

* Pro přípravu musela být použita čerstvě naředěná HCl, jinak excystace prakticky neprobíhala.

Zkumavky s připravenými roztoky a misky s cysticerkoidy byly vloženy do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po 15 minutách byly oba roztoky slity dohromady (za šumivé reakce). 1 ml výsledného roztoku byl napipetován do misek s cysticerkoidy, které byly poté navráceny do inkubátoru.

Po dalších 15 minutách byly misky pravidelně vyjímány z inkubátoru a kontrolovány pod stereolupou. Excystované tasemnice byly pipetou neprodleně přeneseny do fyziologického roztoku. Pokud v excystačním roztoku setrvaly déle, byly deformovány (viz Příloha 4A), při kultivaci nedocházelo k růstu a brzy hynuly. K deformacím však docházelo často ještě před opuštěním cysticerkoidu. Excystační roztok se zdál být pro tasemnice agresivní, a proto byla metoda později modifikována:

Po 10 minutách inkubace v excystačním roztoku, kdy již docházelo k aktivaci tasemnic, byly cysticerkoidy pipetou přeneseny do fyziologického roztoku a dále inkubovány. Díky kratšímu kontaktu s excystačním roztokem se deformace vyskytovaly v menší míře.

5.10. Příprava kultivačních médií

Jako základní médium bylo použito RPMI 1640. Jedná se o chemicky definované médium komerčně vyráběné, vhodné pro kultivace buněčných kultur. Obsahuje směs anorganických solí, aminokyselin, glukózy a vitamínů. Ve variantě R 8758 je navíc přítomen NaHCO_3 a L-glutamin. Základní médium o objemu 500 ml bylo dále obohaceno 10 ml 1M pufru HEPES, který je v dané koncentraci užíván v některých dalších variantách média 1640. Kvůli předcházení bakteriální a mykotické kontaminace, se kterou měla často problémy Pavlíčková (2015), bylo médium dále obohaceno o 300 μg penicilinu, 500 μg streptomycinu a roztokem amfotericinu B. Dle Turtona (1974) nemají tyto látky na růst *H. diminuta* negativní vliv.

Veškerá příprava a manipulace s kultivačními médii byla prováděna asepticky v laminárním boxu. Připravená média byla uchována při teplotě 4°C. Rozpisy jednotlivých médií jsou uvedeny v dalších oddílech.

5.11. Médium s jaterním extraktem

Příprava jaterního extraktu

Příprava jaterního extraktu byla založena na postupu, který popsali Sinha a Hopkins (1967). Zmražená játra (myší, potkaní, ovčí) byla při teplotě 4 °C rozmrazena 24 hodin před plánovanou přípravou. Z jater bylo odebráno 5 g tkáně, která byla nastříhána na drobné kousky. Tkáň byla s 15 ml fyziologického roztoku vložena do kyvety homogenizátoru umístěné v ledu a zhomogenizována. Po homogenizaci byl obsah přelit do kádinky, do které byl přidán následný výplach kyvety 5 ml fyziologického roztoku. Výsledný poměr tkáně (hmotnost) ku roztoku (objem) byl 1:4. Po úpravě pH na hodnotu 4,0 pomocí 1M HCl byl homogenát stočen v centrifuze při 5420 g po dobu jedné

hodiny při 4 °C. Supernatant byl v laminárním boxu přefiltrován přes 0,22 µm membránu do kryozkumavek a uchován při teplotě -20 °C do doby použití.

Příprava média s jaterním extraktem

Během testů byly jednotlivé jaterní extrakty přidávány k základnímu médiu obohacenému o sérum. Jako kontrolní médium sloužilo základní médium obohacené o sérum. Složení médií uvádí Tab. 2.

Tab. 2 Rozpis médií pro testování vlivu jaterních extraktů na růst excystovaných tasemnic

Médium	Složka	Množství
Kontrola	RPMI	10,5 ml
	Sérum	4,5 ml
Myší játra	RPMI	9 ml
	Sérum	4,5 ml
	Jaterní extrakt – myš	1,5 ml
Potkaní játra	RPMI	9 ml
	Sérum	4,5 ml
	Jaterní extrakt – potkan	1,5 ml
Ověčí játra	RPMI	9 ml
	Sérum	4,5 ml
	Jaterní extrakt – ovce	1,5 ml

Složky byly napipetovány do plastových 15 ml zkumavek. Po smísení a protřepání byla média obsahující jaterní extrakt (z důvodu obsahu zákalu, který znemožňoval pozdější pozorování pod mikroskopem) stočena v centrifuze při 2000 g po dobu 15 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl přepipetován do plastových zkumavek a připravená média uchována při teplotě 4 °C.

5.12. Médium s kvasnicovým extraktem

Zvolená výsledná koncentrace byla převzata z média Sinhy a Hopkinse (1967). Jako kontrolní médium sloužilo samotné RPMI (bez přídavku séra). Testované médium bylo připraveno navážením 0,25 g kvasnicového extraktu a rozpuštěním v 50 ml RPMI.

Po dokonalém rozpuštění byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm membránu do plastových zkumavek.

5.13. Médium s kvasnicovým a jaterním extraktem

Na základě výsledků předchozích testů byl zkoumán společný vliv kvasnicového extraktu a extraktu z ovčích jater (nejlepší vliv na růst tasemnice). Složení médií uvádí Tab. 3. Jako kontrolní médium bylo zvoleno RPMI s přidavkem séra.

Tab. 3 Rozpis médií pro testování vlivu kvasnicového a jaterního extraktu na růst excystovaných tasemnic

Médium	Složka	Množství
Kontrola	RPMI	10,5 ml
	Sérum	4,5 ml
Kvas. extrakt	RPMI	10,5 ml
	Sérum	4,5 ml
	Kvasnicový extrakt	75 mg
Kvas. + jater. extrakt	RPMI	9 ml
	Sérum	4,5 ml
	Kvasnicový extrakt	75 mg
	Jaterní extrakt – ovce	1,5 ml

5.14. Médium s kvasnicovým extraktem, jaterním extraktem a žlučí

Protože nebyla žluč dosud užita, byla kromě médií z předešlých experimentů přidána i ke kontrolnímu médiu pro ověření jejího vlivu samostatně. Rozpis médií uvádí Tab. 4.

Tab. 4 Rozpis médií pro testování vlivu kvasnicového extraktu, jaterního extraktu a žluči na růst excystovaných tasemnic

Médium	Složka	Množství
Kontrola	RPMI	10,35 ml
	Sérum	4,5 ml
	Žluč	0,15 ml
Kvas. + jater. extrakt	RPMI	9 ml
	Sérum	4,5 ml
	Kvasnicový extrakt	75 mg
	Jaterní extrakt – ovce	1,5 ml
Kvas. + jater. extrakt + žluč	RPMI	8,85 ml
	Sérum	4,5 ml
	Kvasnicový extrakt	75 mg
	Jaterní extrakt – ovce	1,5 ml
	Žluč	0,15 ml

5.15. Dvoufázové médium s agarem

Pro napodobení experimentů podle Schillera (1965) byl jako pevná fáze zvolen 0,5% roztok agarů v RPMI s 30 % séra. Do každé jamky v jamkové destičce bylo napipetováno 0,5 ml agarového roztoku. Po ztuhnutí byl roztok překryt 1 ml RPMI s 10 % séra.

5.16. Kultivace

Pro kultivaci byla užívána 24 jamková destička, do které byla v laminárním boxu napipetována média (1 ml na jamku). Pro každou testovanou skupinu bylo použito 6 jamek. Po excystaci byly pipetou pod stereolupou do každé jamky vloženy 1–3 tasemnice v závislosti na počtu získaných jedinců (počet tasemnic byl však vždy ve všech jamkách v daném testu stejný). Každá testovaná skupina tak byla reprezentována 6–18 tasemnicemi. Kultivace probíhala v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

Médium bylo pravidelně měněno po 2–4 dnech s pomocí pipety. Bylo nutné pracovat s velkou opatrností, aby nebyly nasány tasemnice. Nasazení tasemnic, ani výměna média nemohla být kvůli užití stereolupy prováděna asepticky v laminárním boxu. Proto v některých případech docházelo ke kontaminaci bakteriální či mykotickou nákazou a testy musely být předčasně ukončeny nebo opakovány.

5.17. Vyhodnocování nárůstu

Ve světelném mikroskopu s připojenou kamerou byly tasemnice nasnímány a změřeny s pomocí softwaru NIS-Elements. (viz Příloha 5). První měření ihned po nasazení tasemnic do kultivačního média bylo označováno jako den 0. Další měření byla prováděna vždy před výměnou média. Důležité bylo během snímání průběžně vkládat destičku opět do inkubátoru. Tím se předešlo poklesu teploty média s tasemnicemi². Po ukončení testování byla délka ze dne 0 odečtena od délek v následujících dnech kultivace a výsledná hodnota odpovídala nárůstu tasemnic. Při hodnocení výsledků byly navzájem porovnávány průměrné hodnoty sledovaných skupin.

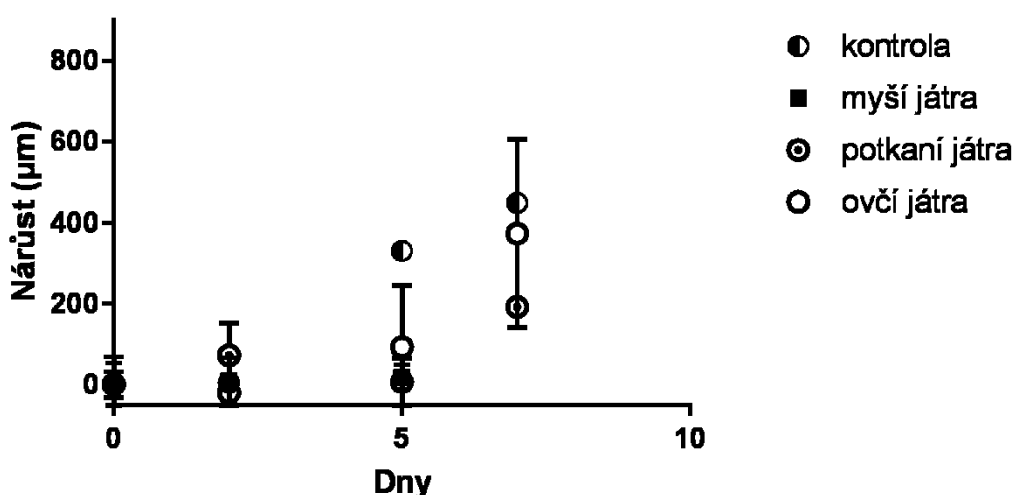
² Při poklesu teploty pod 37 °C postupně klesá aktivita tasemnic a ty se smršťují. Dochází tak k falešně negativním výsledkům. Aby se tomuto předešlo, byly tasemnice z inkubátoru vyndávány jen na krátkou dobu a v průběhu měření pravidelně zahřívány na 37°C.

6. VÝSLEDKY

Každý experiment (s výjimkou testování vlivu kvasnicového extraktu) byl opakován třikrát. Z toho dvě opakování trvala alespoň týden a jedno dlouhodobé alespoň dva týdny. Výsledky jsou pro větší přehlednost prezentovány jednotlivě. Pro každou testovanou skupinu bylo užíváno šest jamek, které byly podle počtu dostupných tasemnic obsazeny každá 1–3 tasemnicemi.

6.1. *Médium s jaterními extrakty*

Při prvním opakování byly nasazeny dvě tasemnice na jednu jamku. Nárůst tasemnic zobrazuje Obr. 5



Obr. 5 Grafické znázornění nárůstu vlivem jaterních extraktů

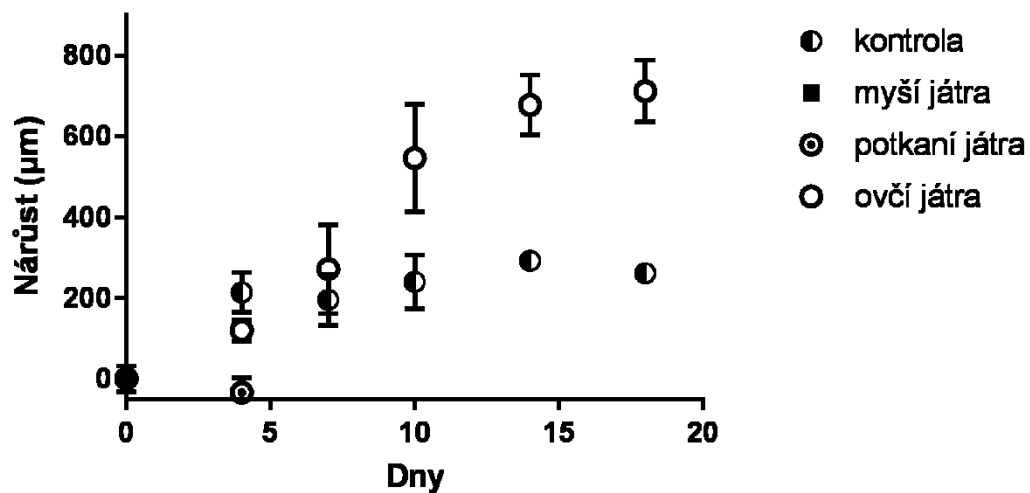
Největší nárůst byl pozorován v kontrolním médiu. Ačkoliv v médiu s extraktem z ovčích jater dosahovaly tasemnice první dny délky kratší než po excystaci, sedmý den dosahovaly nejvyššího nárůstu mezi jaterními extrakty (viz Tab. 5). V médiu s extraktem z myších jater tasemnice k sedmému dni uhynuly.

Tab. 5 Nárůst tasemnic vlivem jaterních extraktů (μm)

Den	2	5	7
kontrola	5,16	330,04	448,91
\pm s.d.	*	*	*
myší játra	9,09	17,89	úhyn
\pm s.d.	$\pm 57,5$	$\pm 31,4$	
potkaní játra	72,26	6,21	191,94
\pm s.d.	± 80	± 59	*
ovčí játra	-20,65	92,81	373,07
\pm s.d.	± 32	± 183	± 232

* V této skupině byla jediná tasemnice. s.d. tak není k dispozici

Při druhém opakování experimentu byla nasazena jedna tasemnice do každé jamky. Tasemnice opět hynuly v médiu s extraktem z myších jater a v tomto případě i v médiu s extraktem z potkaních jater. V médiu s extraktem z ovčích jater vykazovaly tasemnice v prvních dnech nižší nárůst v porovnání s kontrolním médiem (viz Obr. 6), při dlouhodobé kultivaci ale dosáhly nejvyššího nárůstu (viz Tab. 6). Všechny přeživší tasemnice vykazovaly 18. den sníženou pohybovou aktivitu (při pozorování pod mikroskopem) a četné patologické útvary (viz Příloha 6).

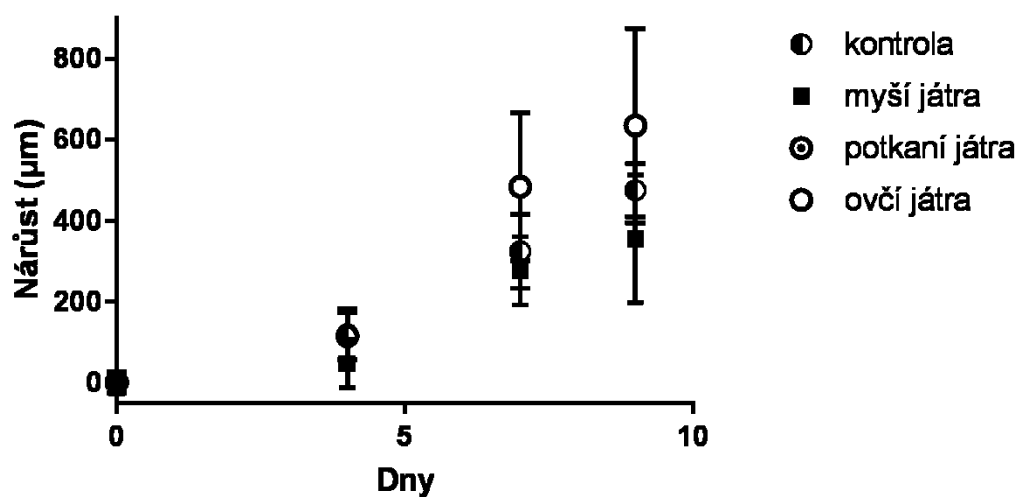


Obr. 6 Grafické znázornění nárůstu vlivem jaterních extraktů

Tab. 6 Nárůst tasemnic vlivem jaterních extraktů (μm)

Den	4	7	10	14	18
kontrola	214,01	195,64	240,47	292,13	261,68
± s.d.	±49,3	±63,3	±66,8	±16,1	±15,1
myší játra	úhyn				
potkaní játra	-34	úhyn			
± s.d.	±38				
ovčí játra	119,96	272,14	546,39	676,56	712,34
± s.d.	±26	±110	±133	±75	±77

Při třetím opakování testu byly nasazeny tři tasemnice na jamku. Grafické znázornění růstu a dosažené hodnoty nárůstu zobrazuje Obr. 7 a Tab. 7.



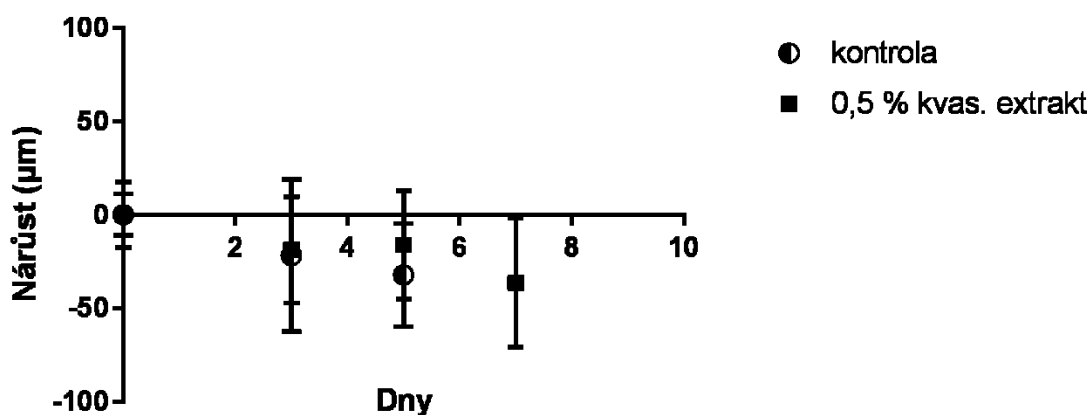
Obr. 7 Grafické znázornění nárůstu vlivem jaterních extraktů

Tab. 7 Nárůst tasemnic vlivem jaterních extraktů (µm)

Den	4	7	9
kontrola	120,16	324,33	475,25
± s.d.	±64	±92	±66
myší játra	47,26	276,27	356,03
± s.d.	±60	±84	±158
potkaní játra	úhyn		
± s.d.			
ovčí játra	114,97	484,06	635,32
± s.d.	±57	±183	±240

6.2. Médium s kvasnicovým extraktem

Při prvním opakování testu byla nasazena jedna tasemnice na jamku. V kontrolním médiu se tasemnice smršťovaly (viz Příloha 7A), až 7. den uhynuly. V 0,5% kvasnicovém extraktu se tasemnice smršťovaly pomaleji a 7. den stále vykazovaly pohyb. Grafické znázornění růstu a dosažené hodnoty nárůstu zobrazuje Obr. 8 a Tab. 8.



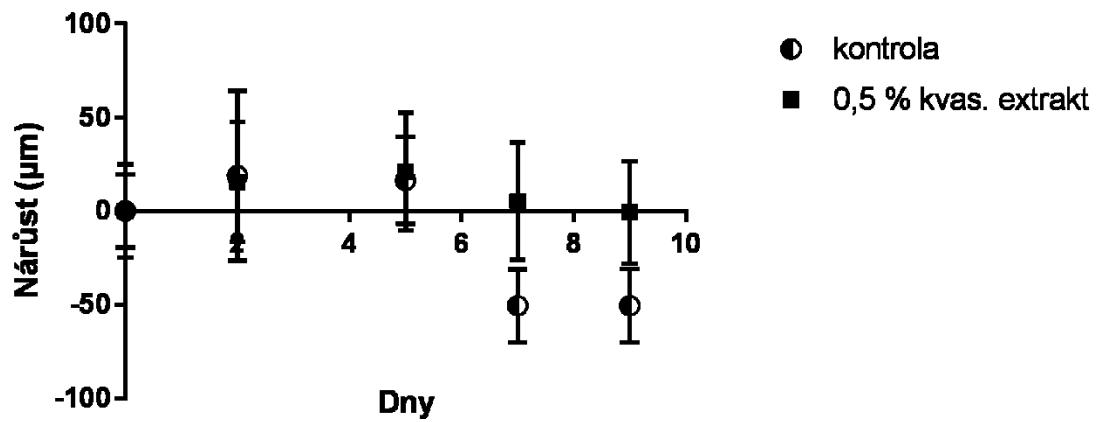
Obr. 8 Grafické znázornění nárůstu vlivem kvasnicového extraktu

Tab. 8 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového extraktu (µm)

Den	3	5	7
kontrola	-21,83	-32,1	úhyn
± s.d.	±40,7	±27,5	
0,5 % kvas. extrakt	-18,67	-16,06	-36,5
± s.d.	±28,6	±29,1	±34,6

Při druhém opakování experimentu byla nasazena opět jedna tasemnice na jamku. Navzdory mírnému nárůstu v prvních dnech kultivace dosahovaly tasemnice 9. den velikosti menší než při excystaci. Médium s kvasnicovým extraktem bylo stejně jako

v úvodním testu účinnější, ale v daném složení pro kultivaci neefektivní (viz Tab. 9 a Obr. 9). Z toho důvodu bylo ustoupeno od třetího opakování testu.



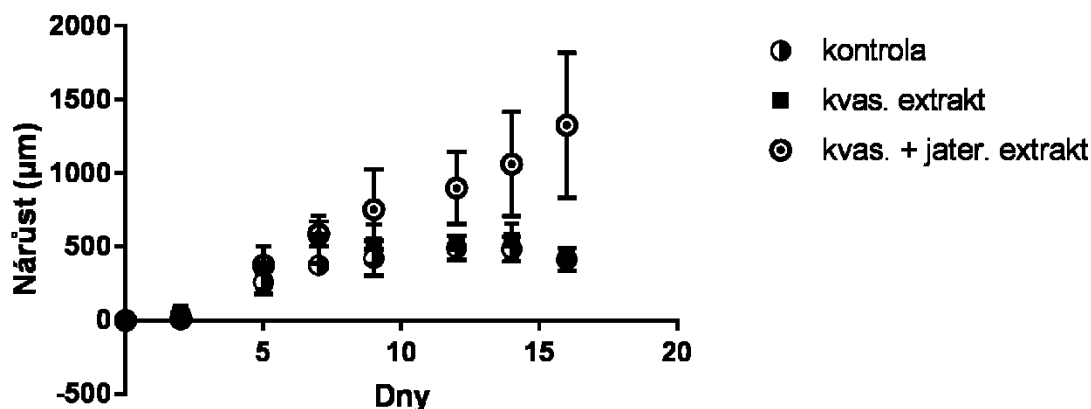
Obr. 9 Grafické znázornění nárůstu vlivem kvasnicového extraktu

Tab. 9 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového extraktu (µm)

Den	2	5	7	9
kontrola	18,94	16,36	-50,52	-50,61
± s.d.	±45,3	±23,3	±19,6	±19,7
0,5 % kvas. extrakt	15,51	21,05	5,25	-0,63
± s.d.	±32	±31,5	±31,4	±27,4

6.3. Médium s kvasnicovým a jaterním extraktem

Vzhledem k nízké efektivitě u předchozího testu bylo zde médium s kvasnicovým extraktem obohaceno o 30 % séra. Při prvním opakování testu byla nasazena jedna tasemnice na jamku.



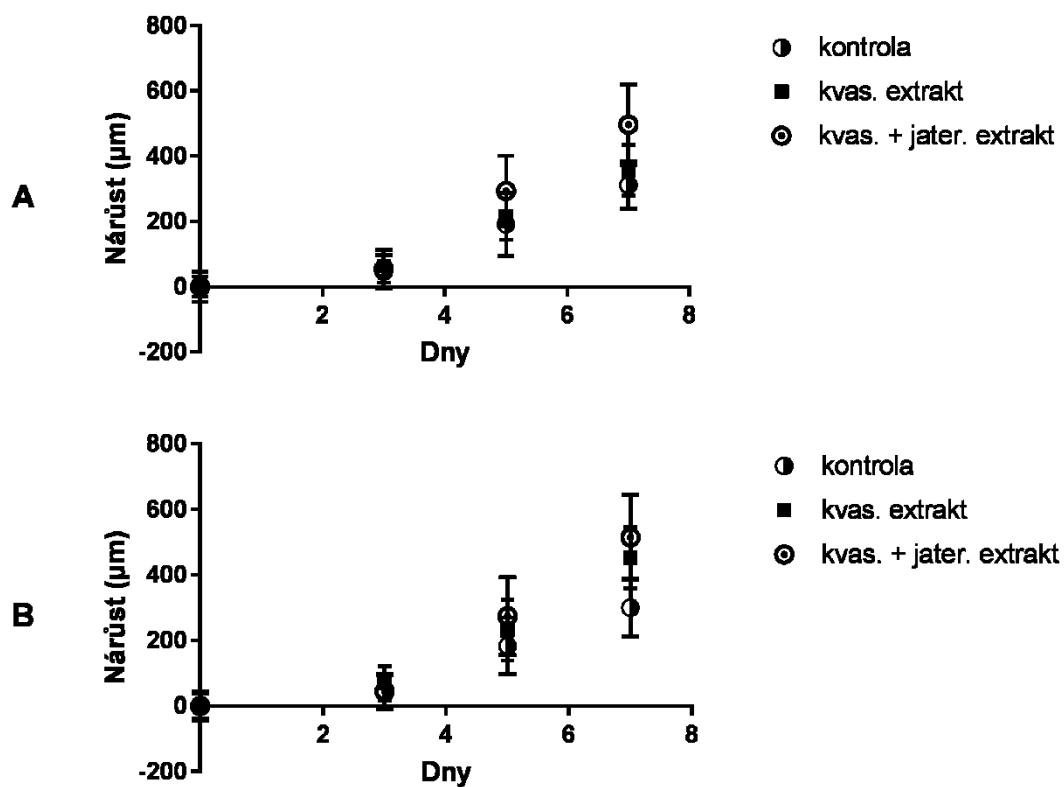
Obr. 10 Grafické znázornění nárůstu vlivem kvasnicového a jaterního extraktu

Z Obr. 10 je zřejmé, že nejefektivnější nárůst byl v médiu s jaterním a kvasnicovým extraktem. Od 14. dne kultivace zde dosahovaly tasemnice dvojnásobného nárůstu oproti kontrolnímu médiu a médiu bez jaterního extraktu. Kultivace byla ukončena k 16. dni z důvodu výskytu patologických nálezů na jedincích kultivovaných v kontrolním médiu a médiu s kvasnicovým extraktem. Hodnoty nárůstů zobrazuje Tab. 10.

Tab. 10 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového a jaterního extraktu (μm)

Den	2	5	7	9	12	14	16
kontrola	35,58	258,4	374,95	422,11	492,1	484	414,09
± s.d.	±53,3	±82,3	±58,3	±199,5	±82,5	±83,2	±75,4
kvas. extrakt	40,01	356,87	548,95	516,89	522,69	541,77	433,09
± s.d.	±61,5	±144	±162,8	±135	±48	±117,1	±59,9
kvas. + jater. extrakt	11,87	374,45	585,8	753,04	898,28	1062,16	1327
± s.d.	±27,9	±48,8	±85,7	±270,6	±245,9	±355,8	±492,3

Obě následující opakování experimentu potvrdila nejvyšší nárůst v médiu s kvasnicovým a jaterním extraktem. V obou případech byla média měněna stejný den a kultivace prováděna s jednou tasemnicí na jamku, proto jsou výsledky uvedeny ve společné Tab. 11 a Obr. 11.



Obr. 11 Grafické znázornění nárůstu vlivem kvasnicového a jaterního extraktu, A – druhé opakování, B – třetí opakování

Tab. 11 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového a jaterního extraktu (μm). A – druhé opakování, B – třetí opakování

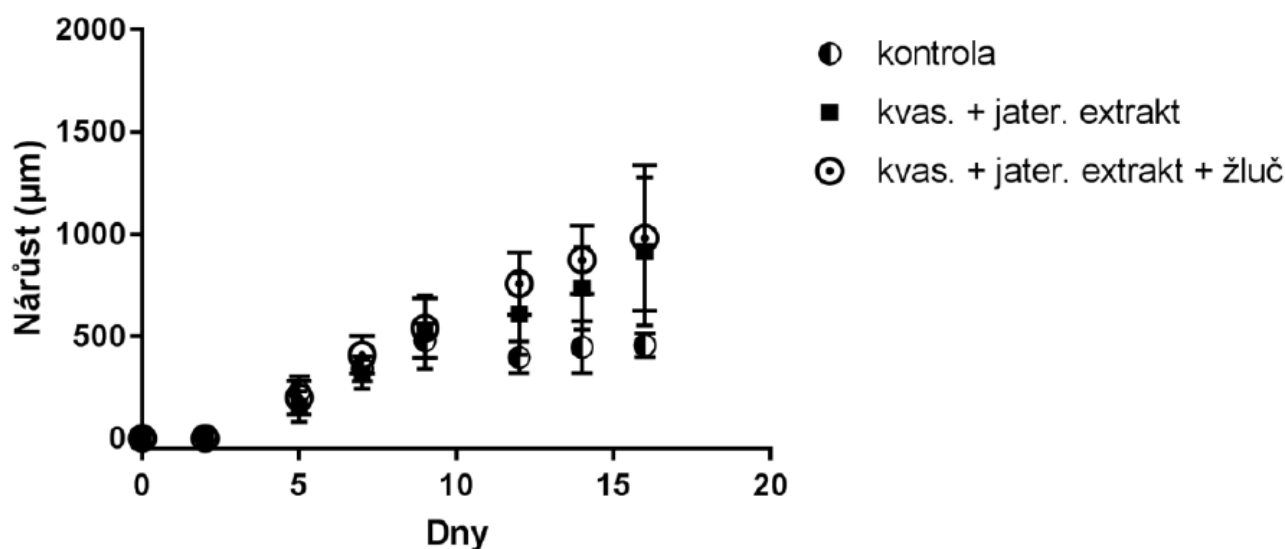
Den		3	5	7
A	kontrola	46,93	192,3	312,27
	\pm s.d.	$\pm 50,8$	$\pm 97,7$	$\pm 72,3$
	kvas. extrakt	64,05	216,44	357,2
	\pm s.d.	$\pm 51,5$	$\pm 73,0$	$\pm 78,3$
	kvas. + jater. extrakt	54,19	293,76	497,48
	\pm s.d.	$\pm 59,3$	$\pm 107,2$	$\pm 124,5$
B	kontrola	44,2	184,15	300,57
	\pm s.d.	$\pm 53,9$	$\pm 86,2$	$\pm 88,2$
	kvas. extrakt	69,67	232,21	453,28
	\pm s.d.	$\pm 51,5$	$\pm 92,4$	$\pm 93,7$
	kvas. + jater. extrakt	45,71	69	514,27
	\pm s.d.	$\pm 49,9$	$\pm 118,4$	$\pm 130,2$

6.4. *Médium s kvasnicovým extraktem, jaterním extraktem a žlučí*

Při prvním opakování byly nasazeny tři tasemnice na jamku. Grafické znázornění nárůstu zobrazuje Obr. 12. Nejvyšší nárůst byl pozorován u média obsahujícího kvasnicový extrakt, jaterní extrakt a žluč (viz Tab. 12).

Tab. 12 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového extraktu, jaterního extraktu a žluči (μm)

Den	2	5	7	9	12	14	16
kontrola	11,81	229,12	341,96	479,54	397,32	446,54	456,41
\pm s.d.	$\pm 44,9$	$\pm 76,1$	$\pm 61,4$	$\pm 86,7$	± 78	$\pm 126,7$	$\pm 58,2$
kvas. extrakt	2,39	155,82	314,25	519,6	607,87	735,82	913,9
\pm s.d.	± 49	$\pm 75,4$	$\pm 69,7$	$\pm 179,7$	$\pm 198,1$	± 203	$\pm 364,4$
kvas. + jater. extrakt + žluč	-0,43	200,46	408,13	541	757,2	872,81	980,73
\pm s.d.	$\pm 48,5$	$\pm 82,8$	$\pm 92,8$	$\pm 148,3$	$\pm 151,5$	$\pm 168,5$	± 357



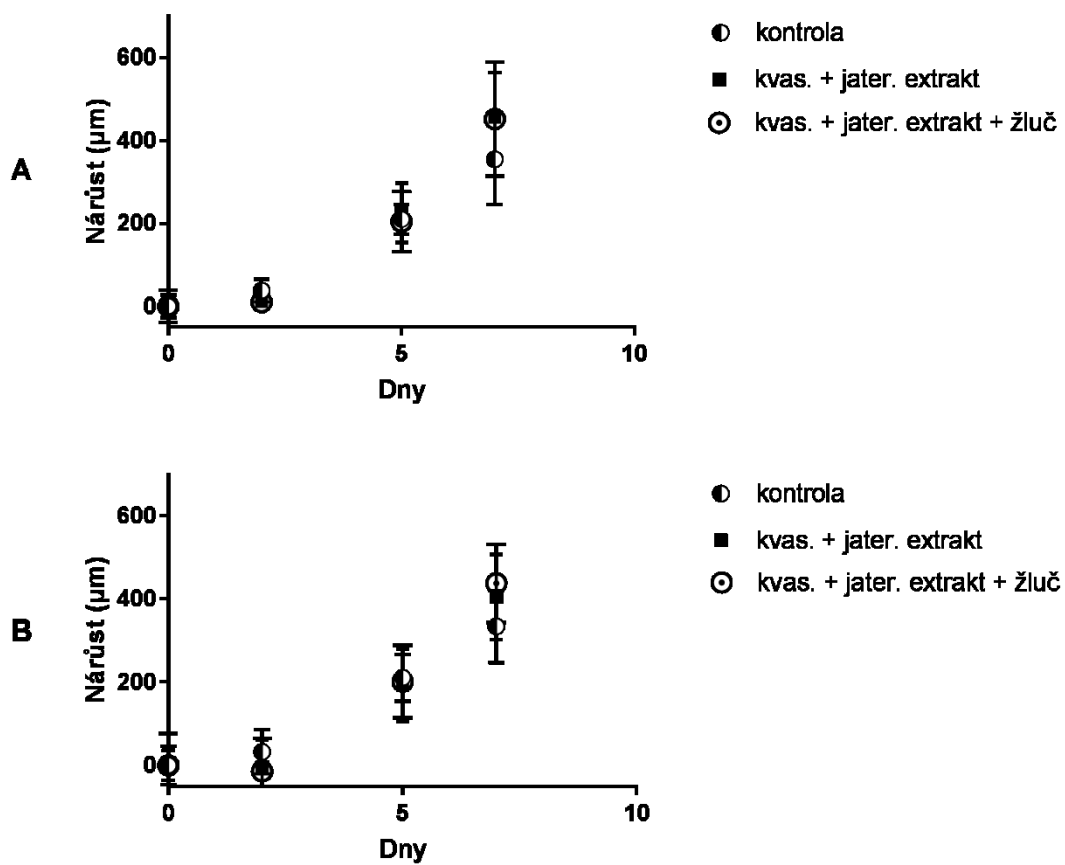
Obr. 12 Grafické znázornění nárůstu vlivem kvasnicového extraktu, jaterního extraktu a žluči

Při dalších opakováních experimentu byla nasazena jedna tasemnice na jamku a média byla měněna po stejných časových úsecích. Proto jsou dosažené hodnoty nárůstu zobrazeny ve společné Tab. 13.

Tab. 13 Nárůst tasemnic vlivem kvasnicového extraktu, jaterního extraktu a žluči (μm). A – druhé opakování, B – třetí opakování

Den	2	5	7
kontrola	38,46	210,27	355,01
\pm s.d.	$\pm 27,6$	$\pm 38,8$	$\pm 109,5$
A			
kvas. extrakt	16,36	226,4	456,8
\pm s.d.	± 18	$\pm 71,1$	$\pm 108,6$
kvas. + jater. extrakt + žluč	10,01	204,87	452,26
\pm s.d.	$\pm 21,4$	$\pm 72,9$	$\pm 137,5$
B			
kontrola	32,92	211,04	334,22
\pm s.d.	$\pm 53,2$	$\pm 56,3$	$\pm 86,6$
kvas. extrakt	-4,38	192,62	404,6
\pm s.d.	± 67	$\pm 86,5$	$\pm 101,8$
kvas. + jater. extrakt + žluč	-13,86	201,57	437,74
\pm s.d.	$\pm 79,4$	$\pm 87,2$	$\pm 93,7$

Při druhém opakování experimentu dosahovaly tasemnice v médiu obsahujícím žluč 7. den shodného nárůstu s médiem bez žluči. Při třetím opakování byl nejvyšší nárůst pozorován stejně jako při prvním opakování u média obsahujícího kvasnicový extrakt, jaterní extrakt a žluč. Grafické znázornění nárůstu bylo prakticky shodné (viz Obr. 13).



Obr. 13 Grafické znázornění nárůstu vlivem jaterního extraktu, kvasnicového extraktu a žluči. A – druhé opakování, B – třetí opakování

7. DISKUSE

Hlavní náplní této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro kultivaci *H. diminuta*. Úspěšná metoda *in vitro* kultivace by umožňovala získat dospělé tasemnice bez nutnosti užívání potkanů jako finálních hostitelů a snížila tak jejich spotřebu.

Dlouhodobou komplikací doprovázející experimenty bylo získání dostatečného počtu životaschopných larev při excystaci. Prodloužené vystavení již excystovaných larev trávicím enzymům snižuje jejich životaschopnost (Rothman 1959). Během excystace však byly larvy ve velké míře poškozeny ještě před opuštěním ochranných obalů cysticerkoidu (porovnání zdravé a poškozené larvy viz Příloha 4). Pro jediný experiment bylo nutno excystovat často více než 150 cysticerkoidů. K výraznému zlepšení došlo po modifikaci metody, kdy byly cysticerkoidy umístěny v excystačním médiu kratší čas. Problém byl zcela vyřešen užíváním nové šarže L-cysteinu po zjištění, že má být uchováván pod inertním plynem a chráněn před světlem. Původní L-cystein byl nesprávně uchováván a pravděpodobně zoxidován.

Vzhledem k problematické excystaci se lišil počet tasemnic v jedné jamce u jednotlivých opakováních experimentů, a proto lze očekávat, že se v různé míře projevoval i crowding efekt. Dle Robertse (1961) může být crowding efekt detekovatelný nejdříve 8. – 10. den po infekci. Hodnoty nárůstu do 8. dne kultivace lze tedy porovnávat bez ohledu na proměnný počet tasemnic v jedné jamce. V následujících dnech kultivace se již crowding efekt pravděpodobně uplatňuje. Proto lze porovnávat pouze hodnoty z daného opakování nebo z experimentů se stejným počtem tasemnic v jedné jamce, kde se crowding efekt projevoval stejnou měrou.

Mezi jaterními extrakty vykazovaly tasemnice nejvyšší nárůst u extraktu z ovčích jater, což bylo překvapivé vzhledem k tomu, že ovce nepatří na rozdíl od myši a potkana mezi hlodavce, typické definitivní hostitele *H. diminuta*. V médiu s extraktem z myších a potkaních jater byl naopak zaznamenán nejnižší nárůst, případně úhyn. Sinha a Hopkins (1967) při kultivaci *H. nana* hodnotili extrakt z potkaních a ovčích jater jako stejně účinný.

Při testování vlivu kvasnicového extraktu nebylo v médiích obsažené sérum. Tasemnice od nasazení v médiu nevykazovaly žádný nárůst a pouze se smršťovaly.

Nárůst zaznamenaný v prvních dnech při druhém opakování experimentu byl pravděpodobně v důsledku dřívější výměny média. Společně se sérem přidaným v dalších experimentech bylo dosaženo většího nárůstu.

Během všech dlouhodobých testů po určité době ustával růst a na tasemnicích se objevovaly četné patologické útvary (viz Příloha 6). Žádný z citovaných autorů tyto útvary nepopisuje. Jejich histologie a důkladnější prozkoumání by mohlo napovědět, kvůli čemu tasemnice při svém růstu strádají.

Dalšími látkami, které mají vliv na vývoj tasemnic, jsou pohlavní hormony. Addis (1946) zkoumal vliv gravidity, kastrace a aplikace hormonů potkanům na nárůst tasemnic. Berntzen (1961) pozoroval při *in vitro* kultivaci *H. diminuta* diferenciaci proglotid, pokud médium obsahovalo methyl-testosteron. V návaznosti na tyto informace byla provedena kultivace s obsahem testosteronu a estradiolu odpovídajícího fyziologickým hodnotám v krvi potkana (na rozdíl od Berntzena, který používal několikanásobně vyšší hodnoty). Nebyly pozorovány významné odchylky od kultivačního média bez hormonů, proto nebylo testování hormonů dále rozvíjeno. Bylo by jistě přínosné v budoucnu otestovat vliv dalších hormonů při vyšších koncentracích na kultivaci tasemnic.

Ačkoliv média obsahovala všechny látky nutné pro růst a diferenciaci, ve větší míře k němu nedocházelo. *In vivo* se tasemnice po excystaci za pomoci přísavky přichytí ke střevní stěně hostitele. Při *in vitro* kultivaci se tasemnice nemá kde uchytit a na přísavkách lze i po dnech stále pozorovat periodické kontrakce. Během testování dvoufázového média inspirováno Schillerovo kultivací (1965) se žádná z tasemnic nepřichytila agarové fáze. Berntzen (1961) při kultivaci poukázal na nutnost proudění média, aby tasemnice rostly a diferencovaly se. Bylo by vhodné experiment zopakovat s užitím orbitální třepačky, která by způsobila pohyb kultivačního média a napodobila tak střevní peristaltiku.

8. ZÁVĚR

Potemník moučný (*T. molitor*) se prokázal jako vhodný mezihostitel pro získávání cysticerkoidů. Jeho vlastní chov z larev do stádia dospělého brouka je nenáročný a lze jednoduše infikovat potkaním trusem obsahujícím vajíčka tasemnice. Pokud je dodržována doba nutná pro vývoj cysticerkoidu (v našich experimentech 3 týdny), zajišťuje stabilní zdroj cysticerkoidů v dostatečném množství.

Při excystaci cysticerkoidů prováděné na základě výsledků McVeigh et al. (2014) bylo prokázáno, že kromě doby setrvání v excystačním roztoku má zásadní vliv jakost užívaného L-cysteinu. Dokud byla užívána stará šarže pravděpodobně zoxidovaného L-cysteinu, nedařilo se získat ani přes snížení doby vlivu excystačního roztoku, dostatečný počet životaschopných larev tasemnice.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo najít podmínky pro maximální dobu kultivace *H. diminuta*. Po prozkoumání vlivu vybraných látek v minulosti užívaných pro kultivaci tasemnic rodu *Hymenolepis* tasemnice nejlépe prospívaly v médiu RPMI 1640-R 8758 obohaceném o sérum, kvasnicový extrakt a extrakt z ovčích jater. K 16. dni zde dosahovaly průměrného nárůstu 1327 μm při celkové délce 1561 μm . Jejich další vývoj byl limitován výskytem patologických útvarů a zastavením růstu. Byly navrženy podněty pro další výzkum.

9. LITERATURA

- Addis, C. J. (1946). Experiments on the relation between sex hormones and the growth of tapeworms (*Hymenolepis diminuta*) in rats. *The Journal of parasitology*, 32(6), 574-580.
- Arai H. P., (1980). Biology of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. New York: Academic Press, XII, 733 p. ISBN:012058980x.
- Auer, H., & Aspöck, H. (2014). Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(19-20), 405-413.
- Berntzen, A. (1961). The *In vitro* Cultivation of Tapeworms. I. Growth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *The Journal of Parasitology*, 47(3), 351-355.
- Berntzen, A. (1962). *In vitro* Cultivation of Tapeworms. II. Growth and Maintenance of *Hymenolepis nana* (Cestoda: Cyclophyllidea). *The Journal of Parasitology*, 48(6), 785-797.
- Berntzen, A., & Voge, M. (1965). *In vitro* Hatching of Oncospheres of Four Hymenolepidid Cestodes. *The Journal of Parasitology*, 51(2), 235-242.
- Brant, S. V., & Hanelt, B. (2000). Quantitative investigation of the crowding effect of *Hymenolepis diminuta* in *Rattus norvegicus*. Tested studies for laboratory teaching (SJ Karcher, Editor). Proceedings of the Twenty-first Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
- Castro, G.A., (1996). Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 86. ISBN:0963117211

- Cook, R. L. (1989). *In vivo* effects of putative crowding factors on *Hymenolepis diminuta* (Doctoral dissertation, Texas Tech University).
- Evans, W. S. (1970). The *in vitro* cultivation of *Hymenolepis microstoma* from cysticeroid to egg-producing adult. *Canadian journal of zoology*, 48(5), 1135-1137.
- Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Laloo, D., White, N. (2013). *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-Third Edition)* London: Saunders Ltd., 1360 p. ISBN:9780702057700.
- Graham, J., & Berntzen, A. (1970). The Monoxenic Cultivation of *Hymenolepis diminuta* Cysticeroids with Rat Fibroblasts. *The Journal of Parasitology*, 56(6), 1184-1188.
- Hurd, H., & Fogo, S. (1991). Changes induced by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in the behaviour of the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera). *Canadian Journal of Zoology*, 69(9), 2291-2294.
- Hurd, H., Warr, E., & Polwart, A. (2001). A Parasite That Increases Host Lifespan. *Proceedings: Biological Sciences*, 268(1477), 1749-1753.
- Chervy, L. (2002). The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic parasitology*, 52(1), 1-33.
- Lethbridge, R. C. (1971). The hatching of *Hymenolepis diminuta* eggs and penetration of the hexacanth in *Tenebrio molitor* beetles. *Parasitology*, 62(3), 445-456.
- Lukeš, J., Kuchta, R., Scholz, T., & Pomajbíková, K. (2014). (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in parasitology*, 30(8), 377-385.
- McVeigh, P., McCammick, E. M., McCusker, P., Morphew, R. M., Mousley, A., Abidi, A., ... & Dalton, J. P. (2014). RNAi dynamics in Juvenile *Fasciola spp.* Liver flukes reveals the persistence of gene silencing *in vitro*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(9), e3185.

- Melon, A., Wang, A., Phan, V., & McKay, D. M. (2009). Infection with *Hymenolepis diminuta* is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice. *BioMed Research International*.
- Ogren, R. (1961). The Mature Oncosphere of *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 47(2), 197-204.
- Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Bray, R.A., Mariaux, J., 2001. Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 19, Issue 3, 2001, 443-467, ISSN 1055-7903.
- Patamia, I., Cappello, E., Castellano-Chiodo, D., Greco, F., Nigro, L., & Cacopardo, B. (2010). A Human Case of *Hymenolepis diminuta* in a Child from Eastern Sicily. *The Korean Journal of Parasitology*, 48(2), 167–169.
- Pavlíčková V. (2015). *In vitro* kultivace tasemnice *Hymenolepis diminuta*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce PhDr. Ivan Vokřál, Ph.D.
- Read, C. P. (1967). Longevity of the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*, 53(5), 1055-6.
- Roberts, L. S. (1961). The influence of population density on patterns and physiology of growth in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea) in the definitive host. *Experimental Parasitology*, 11(4), 332-371.
- Rothman, A. (1957). The Larval Development of *Hymenolepis diminuta* and *H. citelli*. *The Journal of Parasitology*, 43(6), 643-648.
- Rothman, A. H. (1959). Studies on the excystment of tapeworms. *Experimental parasitology*, 8(4), 336-364.
- Rybicka, K. (1967). Embryogenesis in cestodes. *Advances in Parasitology*, 4, 107-186.
- Rybicka, K. (1972). Ultrastructure of Embryonic Envelopes and Their Differentiation in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *The Journal of Parasitology*, 58(5), 849-863.

- Schiller, E. (1965). A Simplified Method for the *In vitro* Cultivation of the Rat Tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 51(4), 516-518.
- Sinha, D. P., Hopkins, C. A. (1967). *In vitro* cultivation of the tapeworm *Hymenolepis nana* from larva to adult. *Nature* 215, 1275-1276
- Šlais, J. (1973). Functional morphology of cestode larvae. *Advances in parasitology*, 11, 395-480.
- Turton, J. A. (1974). *In vitro* cultivation of *Hymenolepis diminuta*: effect of antibiotics on the growth of three-day-old worms removed from the rat. *Experimental parasitology*, 36(1), 62-69.
- Voge, M., & Graiwer, M. (1964). Development of Oncospheres of *Hymenolepis diminuta*, Hatched *In vivo* and *In vitro*, in the Larvae of *Tenebrio molitor*. *The Journal of Parasitology*, 50(2), 267-270.
- Volf P., Horák P. a kol. (2007). Paraziti a jejich biologie. 1. vydání Praha: Triton, ISBN 9788073870089.
- Wiwanitkit, V. (2004). Overview of *Hymenolepis diminuta* Infection Among Thai Patients. *Medscape General Medicine*, 6(2), 7.

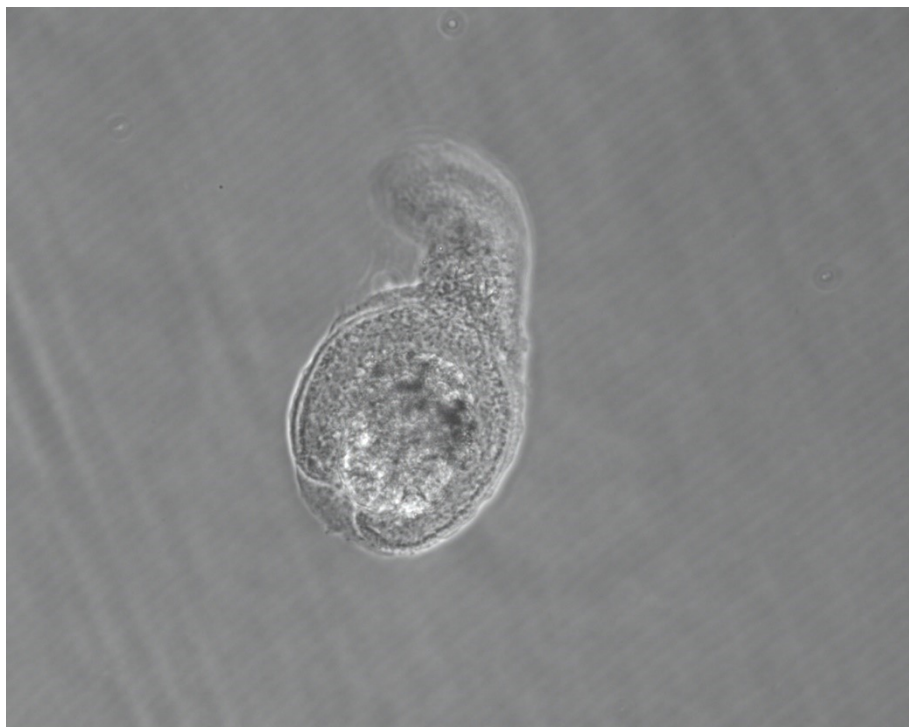
10. PŘÍLOHY

Seznam příloh

- Příloha 1 Plně vyvinutý (infekční) cysticerkoid
- Příloha 2 Nedostatečně vyvinutý (neinfekční) cysticerkoid
- Příloha 3 Larva *H. diminuta* uvězněná v obalech cysticerkoidu
- Příloha 4 Larvy *H. diminuta* po excystaci
- Příloha 5 Měření tasemnic v programu NIS Elements
- Příloha 6 Patologické útvary na tasemnicích dlouho kultivovaných
- Příloha 7 *H. diminuta* smrštěná v kontrolním médiu
- Příloha 8 *H. diminuta* 14. den kultivace v médiu s jaterním a kvasnicovým extraktem
- Příloha 9 Dospělá *H. diminuta* získaná z potkana



Příloha 1 Plně vyvinutý (infekční) cysticerkoid



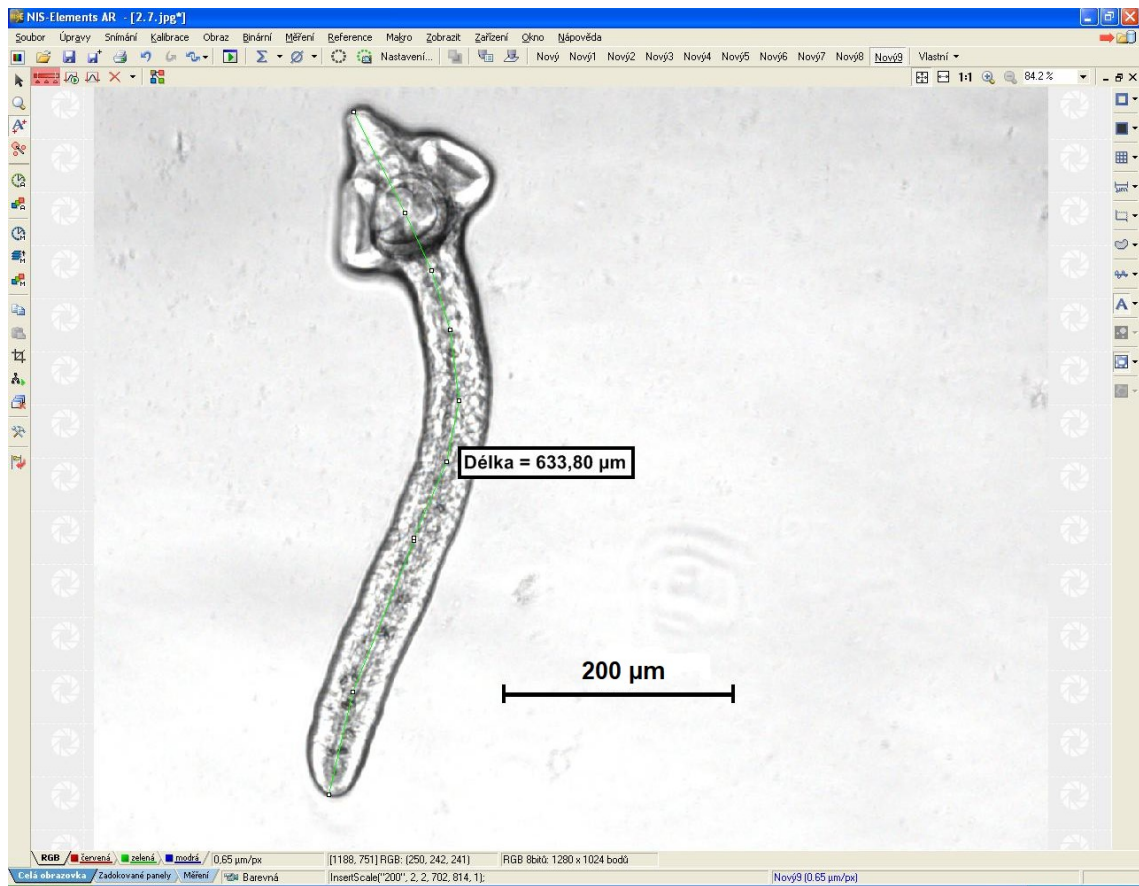
Příloha 2 Nedostatečně vyvinutý (neinfekční) cysticerkoid



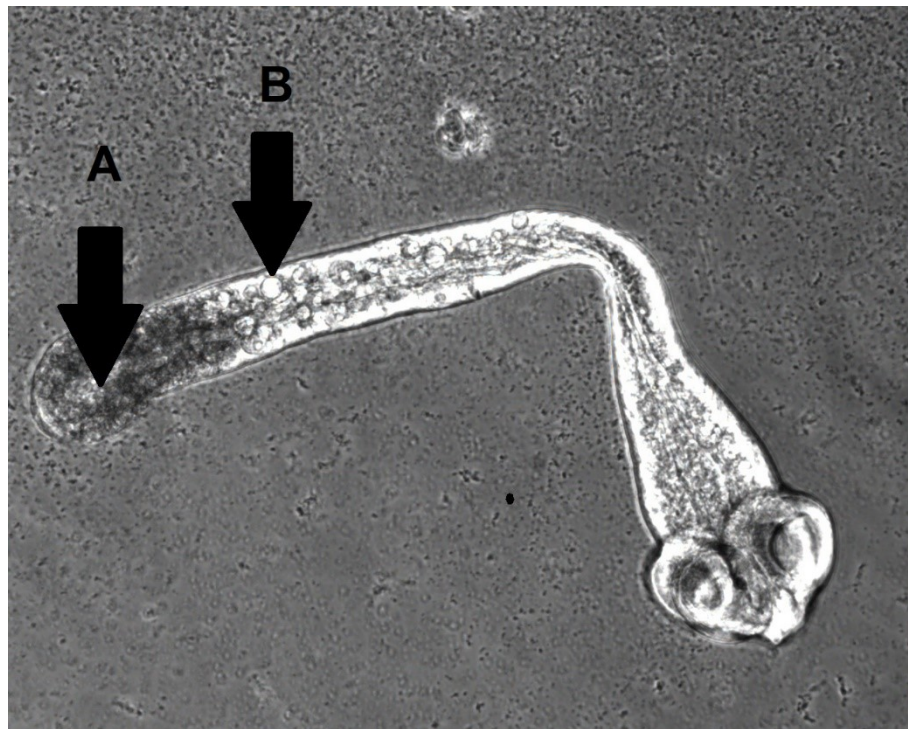
Příloha 3 Larva *H. diminuta* uvězněna v obalech cysticerkoidu



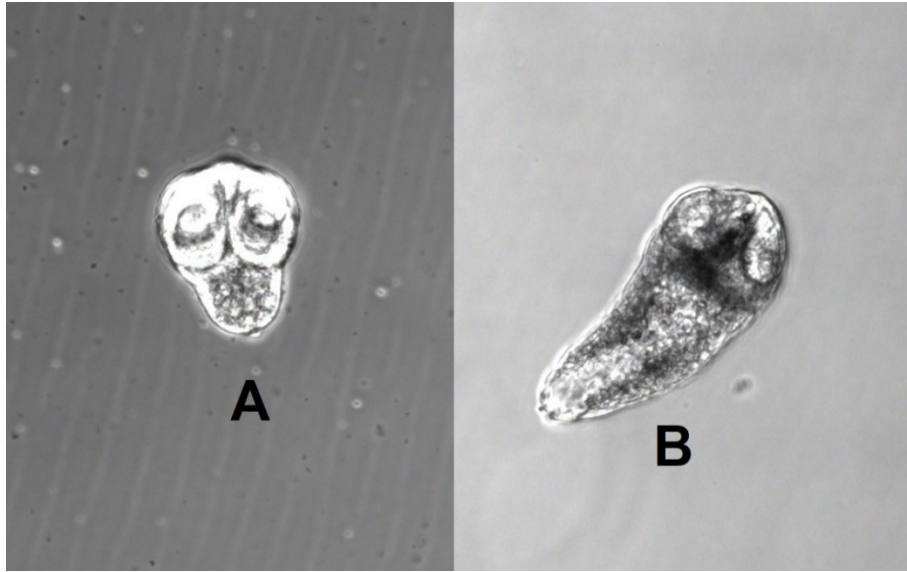
Příloha 4 Larvy *H. diminuta* po excystaci. A – deformovaná, B – zdravá



Příloha 5 Měření tasemnic v programu NIS Elements



Příloha 6 Patologické útvary na tasemnicích. A – lýza kaudální části, B – kulovité útvary



Příloha 7 *H. diminuta*. A – smrštěná v kontrolním médiu, B – stav po excystaci



Příloha 8 *H. diminuta* 14. den kultivace v médiu s jaterním a kvasnicovým extraktem. Délka: 1113 μm



Příloha 9 Dospělá *H. diminuta* získaná z potkana. Foto: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.