UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, http://www.faf.cuni.cz
tel. +420495067111, fax +420495518002

Katedra biologických a lékařských věd

Posouzení práce na nálevnících z hlediska toxikologického testování chemických látek

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.
Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové 2010 Popovská Lenka

Prohlášení

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma „Posouzení práce na nálevnících z hlediska toxikologického testování chemických látek“ jsem vypracovala samostatně za využití odborné literatury a rad a nápadů svého školitele MUDr. Jiřího Hochmanna, CSc.

V Hradci Králové 13. května 2010

……

Poděkování

Děkuji především vedoucímu bakalářské práce MUDr. Jiřímu Hochmannovi, CSc. za trpělivost a vstřícnost při řešení této bakalářské práce. Neméně za jeho odborné a praktické rady a také za čas, který mi touto odbornou pomocí věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat paní ing. Zuzaně Müllerové, která mi poskytla materiál (chemikálie a paramecia) pro pokusy a předvedla, jak se na naší fakultě paramecia kultivují.

Souhrn

Tato bakalářská práce se pokouší ověřit nejjednodušší experimentální uspořádání, pomocí kterého by se za minimálních nákladů a experimentálních podmínek dal na parameciích orientačně testovat vliv některých látek, pro jejichž důkladnější toxikologický výzkum nejsou finance.

Ověřili jsme, že pro fotografickou dokumentaci lze použít mobilní telefon vybavený miniaturním fotoaparátem.

Parameica přežijí ve vhodných podmínkách ve zkumavce i několik týdnů. Přesto je ale důležité provádět pokusy se zhruba stejně starou suspenzí paramecií. Čím je suspenze starší, tím jsou paramecia citlivější k různým vlivům, hynou dříve.

Dlouhé působení ostrého světla mikroskopu nepůsobí na paramecia příznivě. Dochází k jejich předčasnému hynutí i bez přidání jakékoliv chemikálie.

Paramecia v Bürkerově komůrce přežívají asi 2x déle něž klasicky mezi podložním a krycím sklíčkem. Je to dáno nejspíše tím, že se k parameciím lépe dostává vzduch, nejsou zde tolik stísněná, mají možnost volnějšího pohybu.

Pokusem s Formalínem jsme dokázali velmi silný desinfekční účinek této látky. Formalín určený pro desinfekci je prodáván jako 10 % roztok. Tento roztok ještě v koncentraci 0,06 % (tzn. 166x naředěný) má na paramecia okamžitý smrtící účinek.

Námi testovaná barviva (používaná ke zvýrazňování různých buněčných struktur) příliš velkou toxicitu nevykazují (např. v porovnání s Jodisolem nebo Formalínem) a ani vzájemně se v účincích příliš neliší. Výjimku tvoří Janusiho zeleň, která je oproti Eozinu, Jádrové červeni a Toluidinové modři výrazně toxičtější.

Vůbec žádnou toxicitu neprojevila titanová běloba. Tak, jako titanová běloba by se měly chovat např. umělohmotné materiály určené pro výrobu implantátů (např. umělých srdečních chlopní), nebo stomatologické materiály.

Podobnou problematikou se na Masarykově univerzitě v Brně zabývá doc. Jan Šimůnek z Ústavu prevetivního lékařství, který na podobná témata také zadává diplomové práce studentům.

Z hlediska toxikologického lze říci, že jsme v orientačních pokusech prokázali jedovatost Formalínu, Jodisolu a některých organických barviv a naopak značnou neškodnost titanové běloby.

Abstract

This thesis attempts to verify the simplest experimental arrangement with the minimum cost and experimental conditions, by which it would be possible to test the influence of certain substances on paramecia for the further toxicological research of which there are no finance.

We verified that the mobile phone equipped with a miniature camera can be used for the photographic documentation.

The parameceia will survive in test tube for several weeks under appropriate conditions. Nevertheless, it is important to perform the experiments with approximately the similarly old suspenions of paramecia. The older the suspension, the more sensitive paramecia to different influences, they die earlier.

The long-effect of intense light of the microscope does not act favourably on paramecia. It leads to their premature death, even without adding of any chemicals.

Paramecia survive in Bürker chamber about 2 times longer than in conventional arrangement glass slide and cover glass. It's probably due to the fact that the air gets better to paramecia, they are there not so cramped, they have the possibility to move more freely.

By experimenting with Formalin, we were able to prove a strong germicidal effect of this substance. Formalin intended for disinfection is sold as a 10 % solution. This solution exerts the immediate killing effect on the paramecia even at a concentration 0.06 % (i.e. 166x diluted).

Colourants tested in our experiments (used for highlighting of different cell structures) do not exert too great toxicity (as compared with Jodisol or Formalin), and even in case of their mutual comparison their effects are not very different. The exceptionis the Janusi green, which is much more toxic in comparison with the Eozin, Nuclear red and Toluidin blue.

No significant toxicity was detected in case of the Titanium white. For example plastic materials for the manufacture of implants (eg artificial heart valves), or dental materials should behave as the Titanium white.

The associate professor Jan Simunek of the Institute of preventive Medicine at the Masaryk University in Brno, who also entered similar themes thesis to his students, is interesting in similar problems.

From the toxicological point of view we can say that we have proved the toxicity of Formalin, Jodisol and certain organic colourants. On the contrary titanium white proved to be quite harmless.

Obsah

1. ÚVOD 8
2. TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1. Prvoci, PROTOZOA (podříše) 8
2.1.1. Morfologie nálevníků 9
2.1.2. Ekologické zařazení prvoků 10
2.1.3. Prvoci jako původci chorob 11
2.1.3.1. Nejznámější nemoci u člověka 12
2.1.3.1.1. AFRICKÉ TRYPANOSOMY 12
2.1.3.1.2. TRICHOMONAS VAGINALIS 13
2.1.3.1.3. ENTAMOEBA HISTOLYTICA 13
2.1.3.1.4. TOXOPLASMA GONDII 14
2.1.3.1.5. MALÁRIE 15
2.1.4. Nálevníci (ciliophora) 16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 18
3.1. Materiál a metody 18
3.1.1. Laboratorní sklo, chemikálie a přístroje 18
3.1.2. Příprava roztoků barviv 18
3.1.2.1. 1% toluidinová modř 18
3.1.2.2. Eozin 19
3.1.2.3. Jádrová červeň 19
3.1.2.4. Janusiho zeleň 19
3.1.3. Kultivace paramecií 19
3.1.4. Metoda výpočtu výsledné koncentrace testované látky, která působí na paramecium 20
3.1.4.1. Jodisol 20
3.1.4.2. Formalín 21
3.1.4.3. Eozin, Jádrová červeň, Toluidinová modř, Janusiho zeleň 21
3.1.5. Experimentální ovlivňování paramecií 21
3.1.5.1. Experimentální prostředí 21
3.1.5.1.1. Zkumavka 21
3.1.5.1.2. Nepřikryté podložní sklíčko 22
3.1.5.1.3. Klasické podložní a krycí sklíčko 22
3.1.5.1.4. Bürkerova komůrka 22
3.1.5.2. Sledování fyziologických reakcí 22
3.1.5.2.1. Pokusy na tighmotaxi 22
3.1.5.3. Toxikologické pokusy 23
3.1.5.3.1. Pokus s methylenovou modří 23
3.1.5.3.2. Pokus s titanovou bělobou 23
3.1.5.3.3. Pokus s krystalky glukózy 23
3.1.5.3.4. Pokus s cibulovou drtí 23
3.1.5.3.5. Pokus s čerstvým a starým Jodisolem 24
3.1.5.3.6. Pokus s Formalínem 24
3.1.5.3.7. Pokus s Eozinem, Jádrovou červení, Toluidinovou modří, Janusiho zelení 24

3.1.6. Mikroskopování ... 24
3.1.6.1. Mikroskopování v normálním procházejícím světle ... 25
3.1.6.2. Mikroskopování v polarizovaném světle ... 25
3.1.7. Fotografování v mikroskopu pomocí mobilního telefonu ... 25
3.1.8. Mikrokinematografie v mikroskopu pomocí mobilního telefonu ... 26
3.1.9. Měření rychlosti pohybu v Bürkerově komůrce ... 26
3.2. Výsledky ... 27
3.2.1. Vliv různého prostředí ... 27
3.2.1.1. Vliv samotného prostředí ve zkumavce ... 27
3.2.1.2. Vliv samotného přemístění paramecií na nepřikryté podložní sklíčko ... 27
3.2.1.3. Vliv samotného přemístění paramecií mezi klasické podložní a krycí sklíčko ... 28
3.2.1.4. Vliv samotného přemístění do Bürkerovy komůrky ... 28
3.2.2. Sledování detailních fyziologických a patologických vlastností ... 29
3.2.2.1. Přímočarý pohyb kupředu a zpět ... 29
3.2.2.2. Vrtákovitý pohyb ... 29
3.2.2.3. Vrtulovitý pohyb ... 29
3.2.2.4. Rybí pohyb ... 30
3.2.2.5. Nekoordinovaný pohyb ... 30
3.2.2.6. Patologické změny těla paramecia ... 30
3.2.2.7. Pokusy na tighmotaxi ... 30
3.2.3. Vliv testovaných látek ... 31
3.2.3.1. Pokus s titanovou bělobou ... 31
3.2.3.2. Pokus s methylenovou modří ... 31
3.2.3.3. Pokus s krystalky glukózy ... 32
3.2.3.4. Pokus s cibulovou drtí ... 32
3.2.3.5. Pokus s čerstvým a starým Jodisolem ... 32
3.2.3.6. Pokus s Formalínem ... 33
3.2.3.7. Pokusy s Eozinem, Jádrovou červení, Toluidinovou modří, Janusiho zelení ... 33
3.2.4. Měření rychlosti pohybu v Bürkerově komůrce ... 33
4. DISKUSE ... 34
4.1. Spolehlivost metody (porovnatelnost výsledků) ... 34
4.2. Změny paramecií, které hodnotíme ... 35
4.3. Měření rychlosti v Bürkerově komůrce ... 35
4.4. Vzájemné porovnání toxicity testovaných látek mezi sebou ... 36
4.5. Práce na podobné téma ... 37
5. ZÁVĚR ... 38
6. SEZNAM LITERATURY ... 39
7. PŘÍLOHA ... 41

1. ÚVOD

Řešení této problematiky u nás začalo tím, že zahraniční studenti na praktických cvičeních z biologie – ze své vlastní iniciativy fotografovali paramecia nebo jiné objekty v mikroskopu pomocí mobilního telefonu přiloženého na okulár mikroskopu. Tuto jejich iniciativu Dr. Hochmann podpořil a vznikla z toho přednáška zahraničního studenta na studentské vědecké konferenci (KTENAS, A. 2008.). Zkušenosti s tímto pedagogickým přístupem pak byly prezentovány na sjezdu Biologické společnosti (HOCHMANN, J. 2008.).

V návaznosti na to byla vypsána témata bakalářských prací s tímto zaměřením. Od využití pro výuku byl již jen krůček k myšlence, zda by bylo možno s využitím takovýchto minimálních nákladů a experimentálních podmínek orientačně testovat na parameciích vliv některých látek, pro jejichž důkladnější toxikologický výzkum nejsou finance.

Proto se tato bakalářská práce pokouší ověřit nejjednodušší experimentální uspořádání a dokumentuje základní zobrazovací možnosti tohoto systému.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Prvoci, PROTOZOA (podříše)

Prvoci osídlují Zemi více než miliardu let. V průběhu této doby se neustále zdokonalovaly jejich schopnosti přežívat v nejrůznějších podmínkách a získávat v nich živiny. Nezvětšovala se jejich těla. Specializovaly se jejich organely. Evoluce organel prvoků dosáhla svého vrcholu u nálevníků.

V životním cyklu jedinců se může střídat aktivní stadium, klidová cysta i drobnější invazní stadium nebo bičíkatá pohlavní buňka, které mohou vzniknout rozpadem cysty nebo vegetativního plazmódia. Veškeré genetické informace řídící tvorbu různých stadií, a tedy i podob téhož druhu, jsou obsaženy v jádře. Vnější podmínky, ve kterých se momentálně prvok ocitá, určují, které části informace se budou realizovat.

Jedinou funkcí cyst není pouhé přečkání nepříznivých podmínek. Jejich prostřednictvím se mohou prvoci velmi dobře šířit. Lehoučké mikroskopické cysty prvoků jsou téměř všudypřítomné. O tom se můžeme přesvědčit přípravou nálevů z nejrůznějších vzorků (seno, tráva, zem, písek z pískovišť atd.). (PAPÁČEK, M. 2000.)

2.1.1. Morfologie nálevníků

Těla prvků jsou tvořena jedinou buňkou. Jednobuněčné organismy představují skupinu, v níž se stýká a prolíná říše rostlin s říší živočichů.

Buňky některých prvoků obsahují chloroplasty a na světle v jejich tělech probíhá fotosyntéza. Jsou tedy organismy autotrofními (podle formální dohody je řadíme k rostlinám). Jiní jsou zase výhradně heterotrofní (podle formální dohody je ředíme k živočichům). Protista se pokládají za jakousi evoluční kolébku, ze které se vyvinuly mnohobuněčné rostliny, houby i živočichové.

Z hlediska biochemické rozmanitosti jsou prvoci skupinou přinejmenším srovnatelnou s mnohobuněčnými živočichy. Mají většinou mikroskopické rozměry (μm – 10^{-1} mm). U některých druhů se může opakovaně dělit jádro, aniž by došlo k současnému dělení buňky. Tak mohou vznikat obrovské mnohojaderné útvary – **plazmódia**, které mohou být patrné i pouhým okem (10^{-2} m).

Membrána buněk prvoků bývá různými způsoby zesílená a zpevněná. Nazývá se **pelikula**.

Buňka prvoků zajišťuje všechny funkce jako tělo mnohobuněčných živočichů včetně vylučování, dýchání, reakce na podráždění a pohyb. Proto nezřídka obsahuje organely, které tkáňová buňka nemá.

Prvoci jsou vodní organismy. Žijí v mořích i sladkých vodách, řada zástupců i v půdě. Mnoho druhů je nebezpečnými cizopasníky mnohobuněčných. Živí se bakteriemi, sinicemi, rozsivkami, řasami, částečkami organické hmoty i jinými prvoky, cizopasníci pak látkami těla svého hostitele.

Živiny přijímají buď celým povrchem těla, nebo pohlcováním – **fagocytózou.** Pohlcenou potravu obklopují váčky s enzymatickým obsahem. Tímto způsobem vznikají trávicí vakuoly, organely s trávicí funkcí. Prvoci žijící ve sladkých vodách, které představují hypotonické prostředí, mají speciální osmoregulační organely – **pulzující vakuoly.** Jimi vylučují z buňky přebytečnou vodu (obr. č. 13 v příloze).

Nepříznivé podmínky mohou přežívat tak, že vytvoří ochranný obal a přemění se z aktivního pohyblivého stadia ve stadium nepohyblivé, klidové – **cystu**. Ta má u většiny prvoků vejčitý tvar.

Prvoci se mohou rozmnožovat nepohlavně, dělením na dvě dceřiné buňky nebo rozpadem na mnoho dceřiných útvarů. Rozmnožují se i jinými způsoby, které můžeme

označit jako rozmnožování pohlavní. Základním znakem pohlavního rozmnožování je kombinace genetického materiálu jader buněk různých jedinců. Zejména u cizopasných prvoků dochází ke střídání nepohlavního rozmnožování s pohlavním. Tento jev označujeme jako rodozměna (**metageneze**). Nepohlavní a pohlavní stadia střídající se v **životním cyklu** prvoků se tvarově liší. Jedinci určitého druhu prvoků mohou tedy mít různý tvar nejen v závislosti na podmínkách, ve kterých se vyskytují (aktivní stadium X cysta), ale i v závislosti na stadiu životního cyklu.

Kmeny: Praprvoci (*Sacromastigophora*) – bičíkovci a kořenonožci

Výtrusovci (*Apicomplexa*) – kokcidie, krvinkovky

Hmyzomorky (*Microspora*)

Výtrusenky (*Myxozoa*)

Nálevníci (*Ciliophora*)

(PAPÁČEK, M. 2000.)

2.1.2. Ekologické zařazení prvoků

Schopnost prvoků využít nejrůznějších potravních zdrojů je pozoruhodná. Můžeme u nich rozlišit snad všechny známé potravní vztahy k jiným organismům.

Všechny autotrofní rostliny jsou díky fotosyntéze schopné přetvářet anorganické látky na organické živiny. Produkují organické látky, a proto jsou stejně jako fotosyntetizující krásnoočka (prvoci), sinice a řasy označovány jako **producenti**. Ty prvoky, které se živí sinicemi a řasami, můžeme považovat za **konzumenty I. řádu** (jsou to vlastně „ býložraví prvoci“). Jiní prvoci, jako je např. téměř dvoumilimetrová mrskavka nebo řada rournatek, se živí heterotrofními organismy. Jsou vyloženými dravci (**predátory**) a požírají i jiné prvoky. Mají charakter **konzumentů II. řádu**. Samotní prvoci jsou složkou potravy některých mnohobuněčných organismů, např. ryb. Prvoci se ovšem živí také částečkami organické hmoty. Ty pocházejí z odumřelých rostlin a jiných živočichů. Prvoci tyto částečky tráví, zhodnocují jejich využitelnou energii ve svých buňkách a rozkládají je na jednodušší organické látky, popř. na látky anorganické. Nacházejí se tady na úplně opačném konci koloběhu látek v přírodě něž autotrofní rostliny. Organické látky naopak rozkládají, a mohou být proto řazeni k **reducentům**. Tito prvoci živící se hnijícími organickými látkami mají obrovský význam. Nejen že mohou půdě navracet živiny, ale podílejí se i na čištění vod.

Z hlediska potravní strategie je také označujeme jako **saprofágy** (živočich živící se hnijícími látkami). Charakteristickými saprofágy je např. celá řada bičíkovců rodu bodo a

nálevníci. Jednotlivé druhy mohou být přizpůsobeny prostředí s různým stupněm hnití, tj. rozkladu organických látek. Můžeme říci, že jsou vlastně potravními specialisty na různě „shnilé“ organické látky. Na této skutečnosti je založena jedna metod hodnocení čistoty vod, kdy podle zastoupení druhů můžeme určit její stupeň saprobity (soubor vlastností vody, vyvolaný přítomností organických látek schopných biochemického rozkladu a rozrušovaných činností destruentů). Hodnocení saprobity vod je jednou z metod, kdy prvoky využíváme jako **bioindikátory**. Svými potravními nároky na prostředí, ve kterém žijí, indikují jeho kvalitu.

Některé druhy prvoků (např. měňavka střevní) se živí odpadními látkami ve střevě obratlovců, aniž by jim prospívaly nebo škodily. Můžeme je považovat za **komenzální** prvoky. Naopak brvitky ve střevě termitů nebo bachořci v žaludku přežvýkavců svým hostitelům jednoznačně prospívají. Jejich hostitelé zajišťují přísun celulózy a oni ji štěpí na stravitelné sacharidy. Jde o vzájemně prospěšný vztah. Brvitky a bachořci jsou prvoci **symbiotičtí**.

Celá čtvrtina dosud známých druhů prvoků dlouhodobě využívá látek těl mnohobuněčných živočichů jako živin ke svému prospěchu. Cizopasí a svým hostitelům škodí. Tito **parazitičtí** prvoci jsou velmi specializovanými organismy. Stejně jako někteří saprofágní prvoci mohou žít v bezkyslíkatém prostředí. Nemají pulzující vakuoly. Žijí v izotonickém prostředí. Najdeme je mezi bičíkovci (bičenky, trypanozoma, lamblie), kořenonožci (měňavka úplavičná) i nálevníky (některé rournatky). (PAPÁČEK, M. 2000.)

2.1.3. Prvoci jako původci chorob

Výtrusovci, výtrusenky a hmyzomorky jsou kmeny, které zahrnují výhradně parazitické druhy. Parazitičtí prvoci mají relativně menší šanci nalézt zdroj potravy než prvoci žijící volně. Musí proniknout do těla svého hostitele při náhodné nákaze nebo musí být do jeho těla vpraveni přenašečem. Tuto menší šanci získat potravu (malá pravděpodobnost nalezení hostitele) a zachovat sled svých potomků si vynahrazují většinou obrovskou rozmnožovací schopností (rozpad plazmódií na mnoho dceřinných částic).

Nemoci způsobované parazitickými prvoky patří vedle tzv. civilizačních chorob k nejzávažnějším. Například podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) zemřou na malárii každoročně téměř 3 milióny lidí. Kromě spavé nemoci a malárie zná humánní a veterinární medicína mnoho set dalších chorob způsobovaných těmito jednobuněčnými parazity.

Z hlediska evoluce můžeme prvoky hodnotit jako velmi úspěšnou a až neuvěřitelně rozmanitou skupinu. Osídlili nejrůznější prostředí. Pronikli i do těl mnohobuněčných, kteří jsou vývojově mladšími živočichy. Dokáží využívat takové potravní zdroje, které jsou mnohdy pro ostatní organismy nedostupné. Různé druhy prvoků obývající stejné prostředí si přitom vůbec nemusí konkurovat. Např. měňavka střevní žije komenzálně nebo se může živit bakteriemi, zatímco jedna z forem měňavky úplavičné rozrušuje buňky výstelky střeva a živí se jejich látkami. Různé druhy mohou obývat stejný prostor, ale dělí se o jeho potravní zdroje. (PAPÁČEK, M. 2000.)

2.1.3.1. Nejznámější nemoci u člověka

Onemocnění způsobená prvoky lze rozdělit následujícím způsobem:
- parazité střevního traktu (*Giardia*, střevní měňavky, střevní kokcidie, *Balantidium*)
- parazité urogenitálního traktu (*Trichomonas vaginalis*)
- parazité CNS (*Toxoplasma gondii*, náhodné nákazy volně žijícími měňavkami)
- parazité krevního a lymfatického systému a k němu náležejících buněk (africké trypanosomy, leishmanie, *Plasmodium*, babesie)
- parazité tkání v nejrůznějších orgánech (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* aj.)

V dalším textu považujeme za vhodné alespoň krátce rozvést problematiku alespoň těch nejznámějších protozoárních chorob. Chtěli bychom tím naznačit, jak důležitý je jejich výzkum, a jak užitečným modelem jsou pokusy na parameciích.

2.1.3.1.1. AFRICKÉ TRYPANOSOMY

Trypanosoma gambiense (1), *Trypanosoma rhodesiense* (2)
Onemocnění: africká trypanosomóza, spavá nemoc chronická (1), akutní (2)
Organismus: Štíhlí bičíkovci (20-30 μm) s 1 bičíkem, který tvoří podél těla undulující membránu a vpředu volně vybíhá. Vyskytují se v lymfě, krevním řečišti a mozkomíšním moku. Množí se podvojným (binárním) dělením. Nevnikají do buněk, netvoří cysty.
Rozšíření: *T. gambiense* v západní Africe (povodí řek), *T. rhodesiense* ve střední a východní Africe v oblasti savan.
Přenos: Přenašečem je bodavá moucha *Glossina* („tse-tse“), ve které parazit prodělává vývoj. Při sání mouchy je parazit inokulován se slinami do krevního oběhu hostitele. Zdrojem

infekce u (1) je nejčastěji nemocný člověk, u (2) rezervoárová zvířata – volně žijící i domácí (antilopy, skot).

Symptomatika a patogeneze: Obdobná u obou druhů, liší se hlavně rychlostí průběhu. Nákaza *T. gambiense* má chronický průběh (1-6 let) s postižením CNS, u *T. rhodesiense* je akutní (2-4 měsíce). Z místa vpichu se trypanosomy šíří do lymfatického a krevního oběhu (časné stadium spavé nemoci), následně pronikají do plexus chorioides a CNS (pozdní stadium spavé nemoci).

Časné stadium: v místě bodnutí lokální kožní zánět, invaze lymfatického systému a krve. Charakteristické je zduření cervikálních uzlin. Pro rozvinuté hemalymfatické stadium jsou typické nepravidelné horečky s bolestmi hlavy a kloubů, malátnost a anémie. T. rhodesiense končí smrtí zpravidla již v tomto stadiu.

Pozdní stadium: průnik do CNS provází přetrvávající bolesti hlavy, poruchy spánku, psychické změny, kachektizace, koma.

2.1.3.1.2. TRICHOMONAS VAGINALIS

Onemocnění: urogenitální trichomonóza, trichomoniasis vaginalis

Organismus: Buňka nepravidelně oválného až hruškovitého tvaru se 4 dopředu namířenými bičíky a pátým bičíkem namířeným vzad a tvořícím krátkou undulující membránu. Množí se podvojným dělením, netvoří cysty, neproniká do sliznic.

Přenos: Pohlavním stykem; malá odolnost mimo tělo hostitele umožňuje pouze zcela mimořádně přenos předměty znečištěnými močí či vaginálním sekretem.

Symptomatika a patogeneze: **U žen**: od zcela asymptomatických nákaz, až po prudký zánět pochvy, charakterizovaný žlutozeleným sladce páchnoucím výtokem. Zánětem mohou být postiženy vulva, vagína, děložní hrdlo, někdy urethra. **U mužů**: Asi 70% nákaz je asymptomatických. Někdy urethritis, vzácně epididymitis a prostatitis.

2.1.3.1.3. ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Onemocnění: amébóza, amébová dyzentérie, extraintestinální amébózy, amébový absces

Organismus: Trofozoit je středně velká měňavka, pohybující se širokými eruptivními panožkami. Žije v lumen tlustého střeva, kde se živí bakteriemi. Během vývoje se ve střevě mění v kulatou 4jadernou cystu, která je vylučována stolicí. Tato neškodná forma tvořící běžně cysty bývá označována jako *Entamoeba histolytica minuta*. Za určitých okolností se

tato forma mění ve větší invazivní formu *Entamoeba histolytica magna*, která je schopna napadat buňky střevního epitelu, které destruuje kontaktní cytolýzou a proteolytickými enzymy. Tvoří se hluboké ulcerace tvaru široké lahve s úzkým hrdlem. Hematogenním rozsevem mohou být měňavky zaneseny do dalších orgánů, kde se tvoří druhotné leze.
Přenos: Alimentární cestou značně odolnými cystami.
Symptomatika a patogeneze: Pokud měňavka nenapadne sliznici, nedochází k onemocnění. Při napadení sliznice se symptomy pohybují od nepatrných a nespecifických gastrointestinálních potíží až po těžké průjmy, charakterizované přítomností krve a hlenu (dyzentérie). Jaterní absces je doprovázen zvětšením jater, horečkami, hubnutím, bolestmi v pravém podžebří. Neléčená amébóza může být smrtelná.

2.1.3.1.4. TOXOPLASMA GONDII

Onemocnění: toxoplasmóza
Organismus: Parazit se složitým vývojovým cyklem a řadou morfologicky odlišných stadií. Infekčním stadiem je odolná oocysta, která se vytváří pouze ve střevě nakažené kočky (definitivní hostitel) a je vylučována s trusem. Čerstvě vyloučená oocysta není infekční, dozrává teprve po několikahodinovém pobytu na vzduchu. Člověk (mezihostitel) se může nakazit pozřením zralé oocysty. V jeho střevě se z ní aktivně uvolňují sporozoity, které pronikají do nejrůznějších tkání nakaženého jedince a intenzivně se v nich množí. Po zástavě množení imunitní odpovědí vznikají tkáňové cysty, ve kterých parazité dlouhodobě přežívají. Z nich se může parazit reaktivovat při snížení imunokompetence mezihostitele (např. při AIDS). Podmínkou dokončení vývoje parazita je pozření stadií ze tkání mezihostitele kočkou. Kočka se také může nakazit pozřením oocyst vyloučených jinou kočkou a pak v ní proběhne celý vývojový cyklus parazita. Člověk je tedy pouze jedním z mnoha možných a asi 200 známých mezihostitelů parazita.
Přenos: Člověk se může nakazit třemi způsoby: pozřením oocysty vyloučené kočkou, pozřením nedostatečně tepelně upraveného masa jiných mezihostitelů, které obsahuje vývojová stadia parazita, a transplacentárně. K poslednímu způsobu dochází téměř vždy výlučně při primoinfekci matky během gravidity.
Symptomatika a patogeneze: Většina lidských infekcí získaných mimo graviditu jsou asymptomatické a benigní. Symptomy jsou obvykle mírné: zduření mízních uzlin na krku a šíji, horečka, bolest hlavy a svalů. Závažnější jsou infekce získané *in utero*. Při relativně vzácném, těžkém poškození plodu dochází k potratu, případně se rodí děti s hydrocefalem,

mikroftalmem, s chorioretinitis, encefalomyelitis. U latentních infekcí se toxoplazmóza reaktivuje při ztrátě imunokompetence či při imunosupresi.

2.1.3.1.5. MALÁRIE

Plasmodium falciparum (1), *Plasmodium vivax* (2), *Plasmodium ovale* (3), *Plasmodium malariae* (4)

Onemocnění: (1) tropická malárie, (2,3) malárie třídenní, terciána, (4) malárie čtyřdenní, kvartána

Organismus: Řádově několik μm velké krvinkovky se složitým vývojovým cyklem. Parazit dokončuje svůj vývoj v samicích komára *Anopheles* (definitivní hostitel). Člověk slouží parazitu jako mezihostitel a nakazí se při sání komára, kdy infekční stadia, sporozoity, obsažené ve slinných žlázách komára jsou inokulovány do krevního oběhu. U člověka dochází k sérii rozmnožovacích cyklů (schizogonií), z nichž prvý nebo několik dalších probíhá asymptomaticky v buňkách jaterního parenchymu, kde mohou parazité dlouhodobě přežívat. Odtud parazité infikují erytrocyty člověka, ve kterých probíhají další schizogonie. Erytrocyty naplněné parazity praskají a právě při tom dochází k typickému malarickému záchvatu. Schizogonie probíhají u jednotlivých druhů s různou časovou periodicitou, čemuž odpovídá periodicita horečnatých záchvatů. Výjimkou je (1), kde periodicita je jen slabě naznačena. Po určité době se v krvi objevují sexuální stadia parazita, tzv. gametocyty, která zahajují další vývoj parazita v komárovi po nasátí infikované krve.

Rozšíření: Hlavně tropy a subtropy, (2,4) zasahují přirozeným výskytem i do mírného pásma. Ojedinělé případy se objevují i v mírném pásmu, kam mohou být importovány jedinci nakaženými v malarických oblastech nebo komáry importovanými letadly (letištní malárie). Vhodní komáří přenašeči žijí i v mírném pásmu a parazit je schopen v nich ukončit vývoj za předpokladu, že po určitou dobu teplota vzduchu nepoklesne pod určitou hodnotu.

Přenos: Inokulativní, sáním nakaženého komára, krevní transfúzí.

Symptomatika a patogeneze: Inkubační doba je obvykle 1-2 týdny, ale počátek onemocnění může být zpožděn až o několik měsíců. Symptomy nespecifické: bolest hlavy, fotofobie, bolesti ve svalech, nevolnost, zvracení. Typický malarický záchvat začíná náhlým pocitem mrazení, třesavkou, která je bezprostředně následována vysokou horečkou. Bez léčení se záchvaty opakují pravidelně po dobu několika týdnů až měsíců s postupně slábnoucí intenzitou. Obecným jevem je anémie. Život ohrožující je tropická malárie (1), při které infikované erytrocyty mají tendenci adherovat ke stěně krevních kapilár vnitřních orgánů a

mezi sebou. Tím dochází k místním obstrukcím kapilár s těžkými následky pro jimi zásobované orgány. Tropická malárie může být provázena řadou závažných a život ohrožujících komplikací („mozková malárie“, edém plic, hypoglykémie, tubulární nekróza ledvin). Značná část klinických příznaků a poškození hostitele je způsobována spíše než vlastním parazitem reakcí hostitelského organismu na jeho přítomnost (vylučování cytokinů, nadprodukce TNF). (BEDNÁŘ, M. 1996.)

2.1.4. Nálevníci (ciliophora)

Za své české jméno vděčí nálevníci tomu, že se jejich aktivní stadia objevují v nálevech připravených ze sena nebo trávy a vody. Objevují se tam proto, že do nálevu jsou se senem přenesena zároveň i jejich klidová stadia, cysty, které se ve vodním prostředí opět zaktivují. Jejich latinské jméno Ciliophora (= řasinky nesoucí) charakterizuje jeden z jejich tří základních znaků. **Pelikula** nálevníků je značně silná, tvořená **dvojitou membránou**. Nese pravidelně rozmístěné pohybové organely, **řasinky**, které se svou stavbou podobají bičíkům.

Nálevníci mají dva typy nestejnocenných jader ležících vedle sebe. **Velké jádro vegetativní** (makronukleus) řídí všechny životní funkce kromě rozmnožování. **Malé jádro generativní** (mikronukleus) se uplatňuje při pohlavním rozmnožování.

V silné pelikule jsou zeslabená místa, kterými nálevníci přijímají potravu a vylučují ji, tzv. **buněčná ústa** a **buněčná řiť.** V pelikule jsou drobné **trichocysty**. Jsou to váčkovité organely obsahující látky s charakterem buněčných jedů. Při podráždění svůj obsah „vystřelují“ a ten ve vodě tuhne v rosolovité vlákno.

Pod pelikulou se nachází síť jemných bílkovinných vláken, která spojuje báze řasinek. Vede podráždění a koordinuje pohyb řasinek. Nejnápadnějšími organelami uloženými v cytoplazmě jsou **jádra** a **pulzující vakuoly.**

Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje příčným dělením nebo dělením nerovnoměrným, tzv. **pučením**. Pohlavní rozmnožování probíhá zvláštním způsobem označovaným jako **konjugace**. Pří konjugaci se k sobě dva jedinci přiloží buněčnými ústy, vegetativní jádra se rozpadnou a generativní prodělají meiózu. Oba jedinci si buněčnými ústy předají po jednom haploidním jádru. Toto cizí migrující haploidní pak splyne s haploidním jádrem, které zůstává na místě. Poté se znovu utvoří celý jaderný aparát. Při konjugaci se tedy jedná o výměnu a splývání haploidních jader.

Nejznámější nálevníci jsou druhy rodu **trepka** (*Paramecium*). V nálevech je nejčastěji objevíme v bakteriální bláně na hladině. Zdržují se tu z toho důvodu, že zde vyhledávají bakterie a živí se jimi.

V přírodě se vyskytují v rybnících, tůních, rašeliništích, ale i loužích a příkopech.

Dalšími běžnými druhy nálevníků jsou **bobovka** (*Colpidium*) a **vejcovka** (*Glaucoma*). Známe i přisedlé nálevníky, jako je např. **vířenka** (*Vorticella*) a **mrskavka** (*Stentor*). Mrskavka má více vegetativních i generativních jader rozložených většinou v podobě korálkovitého řetězce. Přisedlé kolonie tvoří např. **keřenka** (*Carchesium*).

Pozoruhodnou skupinou nálevníků jsou **rournatky** (*Suctoria*). Rozmnožují se pučením a řasinky mají pouze dceřiná stadia (čerstvě oddělené pupeny). Ta posléze přisedají na povrch rostlin nebo vodních korýšů či hmyzu a řasinky ztrácejí. Žijí většinou dravě. Rourkovitými výrůstky chytají a vysávají jiné prvoky.

Mnozí **bachořci** (*Entodiniomorpha*) žijí v bachoru a čepci žaludků přežvýkavců. Mají řasinky soustředěné pouze v několika kruzích a zesílenou pelikulu s výběžky. Společně se symbiotickými bakteriemi štěpí nestravitelnou celulózu buněčných stěn rostlin na stravitelné sacharidy. Tak připravují přežvýkavcům důležité živiny. (PAPÁČEK, M. 2000.)

Nečas (2000), jako učebnice obecné biologie na naší fakultě, se o skupině nálevníků zmiňuje jen velmi okrajově, a to ve spojitosti se sexuálními procesy u jednobuněčných eukaryont.

Buchta (2002), jako učebnice mikrobiologie pro farmaceuty, pojednává o skupině prvoků obsáhleji, a to především ve spojitosti s onemocněními, která vyvolávají.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál a metody

3.1.1. Laboratorní sklo, chemikálie a přístroje

Laboratorní sklo: zkumavky, kádinky, pipety, kapátka, podložní sklíčka, krycí sklíčka, Bürkerova komůrka, dutý plexisklový váleček

Chemikálie:

a) Barviva a pigmenty: jádrová červeň, Janusiho zeleň, toluidinová modř, eozin, methylenová modř (krystalky), titanová běloba (krystalky)
b) desinfekční roztoky: Jodisol (5 let po exspiraci X čerstvý), Formol

Přístroje: mikroskop, mobilní telefon vybavený fotoaparátem

Ostatní: jemně krystalická glukóza, cibulová drť, vata, suspenze paramecií.

3.1.2. Příprava roztoků barviv

Při zhotovování barviv – tedy roztoků se vždy původně vychází ze sypké látky, z ní se zhotovuje tzv. mateřský nebo zásobní roztok, který lze uchovávat dlouhou dobu a z tohoto roztoku se ředěním s další látkou (voda, etylalkohol apod.) zhotovuje další roztok přímo k použití. A nebo se rovnou ze sypké látky zhotovuje roztok k upotřebení. Záleží na barvivu a použití. (MÜLLEROVÁ, Z. 2010)

3.1.2.1. 1% toluidinová modř

Způsob přípravy: Ve 100 ml redestilované vody rozpustíme 1 g Toluidinové modři (sypká) a 1 g Boritanu sodného (Borax). Roztok se uchovává v lednici, časem zraje do kvality.

Použití: Jako histologická barvička k barvení tkání, dobře patrné struktury a jádra buněk, barví vše do modra. (MÜLLEROVÁ, Z. 2010; Merck KgaA. *Toluidine blue.* 2010)

3.1.2.2. Eozin

Způsob přípravy: Do 100 ml redestilované vody nasypeme 0,05 g Eosinu, dobře rozpustíme na magnetické míchačce, roztok musíme přefiltrovat. Barví vše do červenooranžova.
Barvička vlivem světla uvolňuje volné radikály a ničí živé buňky – jejich metabolizmus, tzv. fotodynamický efekt. Barvičku lze uchovat pouze v tmavé lahvi omezeně dlouho. (MÜLLEROVÁ, Z. 2010)

Použití: Eozin je fluorescenční červené barvivo, které se používá k barvení cytoplazmy, kolagenu a svalových vláken. Struktury, které se barví Eozinem nazýváme eozinofilní. (Merck KgaA. *Eosin*. 2010)

3.1.2.3. Jádrová červeň

Způsob přípravy: Na magnetické míchačce rozpustíme ve 100 ml vařící redestilované vody 5 g kamence (síran hlinitodraselný) a 0,1 g sypké jádrové červeně. Po vychladnutí roztok přefiltrujeme.
Použití: Histologická barvička k barvení především jader buněk a barví je do červena. Roztok se musí připravovat vždy čerstvý. (MÜLLEROVÁ, Z. 2010; VACEK, Z. 1988)
)

3.1.2.4. Janusiho zeleň

Způsob přípravy: Rozpustíme 0,25g Janusiho zeleně v 25ml destilované vody a přefiltrujeme.

Použití: Janusiho zeleň je bazické barvivo používané v histologii k supravitálnímu barvení mitochondrií. Tato látka mění barvu struktury podle množství kyslíku, které struktura obsahuje. Je-li kyslík přítomen, Janusiho zeleň se oxiduje a mění svou barvu na modrou. (Merck KgaA. *Janus green B*. 2010)

3.1.3. Kultivace paramecií

Následující text byl sepsán na základě konzultace s ing. Zuzanou Müllerovou (2008) z katedry biologických a lékařských věd..

V laboratoři farmaceutické fakulty se paramecia kultivují následujícím způsobem:

Do zkumavky se vloží 3 větší zrna pšenice a zalijí se odstátou přefiltrovanou vodou z rybníka nebo potoka asi do ¾ zkumavky. Poté se směs vaří na mírném ohni do té doby, až zrna vypadají, že každou chvíli začnou praskat, popř. do té chvíle, než praskne první z nich. Směs se nechá zcela vychladnout a tento postup se opakuje ještě 2x.

Druhý den už může dojít k naočkování paramecií (pasterkou) do takto připravenho živného roztoku. Po zaočkování paramecií do roztoku se zkumavka zazátkuje a uloží do temna. Optimální teplota pro kultivaci je okolo 21°C.

Asi po 3-5 dnech najdeme ve zkumavce několikanásobek původního množství paramecií.

3.1.4. Metoda výpočtu výsledné koncentrace testované látky, která působí na paramecium

3.1.4.1. Jodisol

K dispozici máme komerčně vyráběný Jodisol, který se prodává v koncentraci 3%. Tato koncentrace je příliš vysoká, usmrtí všechna paramecia okamžitě. Potřebujeme tedy jeho koncentraci snížit tak, abychom dosáhli takové, která neusmrtí paramecia ihned a my budeme moci pozorovat změny v jejich chování. Ředíme ho tedy následujícím způsobem: do zkumavky dáme např. 50 kapek vody a 1 kapku Jodisolu (máme několik úplně stejných kapátek a dá se tedy předpokládat, že objemy jedné kapky vody, jedné kapky Jodisolu a jedné kapky suspenze paramecií se rovnají). Koncentrace se tedy mění takto: (1/51) . 3 % = 0,0588 %. Roztok Jodisolu, který budeme přidávávat ke kapce suspenze paramecií má tedy koncentraci 0,0588 %. To ale není výsledná koncentrace látky, která na paramecium působí! Tuto koncentraci musíme ještě vydělit dvěma, protože kapka suspenze paramecií je totéž, jako kapka vody a my k jedné kapce suspenze paramecií na podložním sklíčku přidáváme jednu kapku 0,0588 % rozotku Jodisolu. 0,0588 % / 2 = 0,029 %. Výsledná koncentrace Jodisolu, která na paramecia působí je 0,029 %.

3.1.4.2. Formalín

Formalín neboli Formol je 40% vodný roztok formaldehydu. My máme k dispozici komerčně vyráběný 10% roztok Formalínu. Tato koncentrace je opět příliš vysoká, musíme roztok naředit a postupujeme analogicky jako při ředění Jodisolu.

3.1.4.3. Eozin, Jádrová červeň, Toluidinová modř, Janusiho zeleň

Roztoky těchto barviv máme k dispozici v 1 % koncentraci. Tato koncentrace není příliš vysoká, není tedy potřeba ji předem výrazně ředit jako tomu bylo u Jodisolu nebo Formalínu. Začínáme dělat pokusy hned s původní koncentrací 1 % a tuto pozvolna snižujeme.

3.1.5. Experimentální ovlivňování paramecií

3.1.5.1. Experimentální prostředí

3.1.5.1.1. Zkumavka

Optimální uchování paramecií je ve zkumavce při pokojové teplotě, v temnu a se zátkou z buničinového polštářku (ta umožňuje přívod kyslíku k suspenzi, zabraňuje nadměrnému vypařování vody a zanesení cizorodých látek do suspenze). Čas od času je dobré odstranit blanku, která se tvoří na hladině, ta totiž zhoršuje okysličování suspenze paramecií.

Paramecia špatně snášejí vysoké a nízké teploty (kolísání teplot hrozí zejména při transportu zkumavek s paramecii vnějším prostředím), třepání zkumavkou a přímé sluneční světlo.

Paramecia vydrží ve zkumavce po několik týdnů. Čím starší suspenze je, tím se paramecia pohybují pomaleji a jsou citlivější na vnější vlivy (chemikálie, světlo mikroskopu apod.). Proto je poměrně důležité provádět pokusy vždy se zhruba stejně starou suspenzí paramecií, aby byly výsledky vzájemně porovnatelné!

Stářím suspenze rozumíme dobu kultivace paramecií od naočkování do živného roztoku do provedení pokusu.

Pokusy s ovlivněním paramecií přímo ve zkumavce jsme neprováděli.

3.1.5.1.2. Nepřikryté podložní sklíčko

Na podložní sklíčko dáme kapku suspenze paramecií (krycí sklíčko nepřikládáme) a pozorujeme. Toto uspořádání není pro pokusy ani sledování neovlivněných paramecií běžné. Udělali jsme takto pouze orientační pokusy, kterými jsme chtěli zjistit, jak uspořádání bez krycího sklíčka parameciím celkově svědčí, přežijí-li déle, popř. jak se bude měnit jejich chování.

3.1.5.1.3. Klasické podložní a krycí sklíčko

Na podložní sklíčko dáme kapku suspenze paramecií, přiložíme krycí sklíčko a pozorujeme. Toto klasické uspořádání používáme při pozorování jak neovlivněných paramecií, tak i pro jednotlivé pokusy.

3.1.5.1.4. Bürkerova komůrka

Bürkerova komůrka je vybroušená tak, že tloušťka vodní vrstvy, ve které se paramecia pohybují, je 0,100 mm (to je mnohem více než klasicky mezi podložním a krycím sklíčkem). K parameciím se lépe dostává vzduch, nejsou zde tolik stísněná, mají možnost volnějšího pohybu, jejich pohyb je také rychlejší a vydrží téměř 2x delší dobu naživu než klasicky mezi podložním a krycím sklíčkem.

3.1.5.2. Sledování fyziologických reakcí

3.1.5.2.1. Pokusy na tighmotaxi

Slovo tighmotaxe je odvozeno od anglického sova tight (hmat). Metoda spočívá v tom, že na kapku suspenze paramecií se položí chomáček několika vláken vaty. Po přiložení krycího sklíčka lze v mikroskopu sledovat, jak paramecium, které narazilo na vlákno vaty, tento pokus několikrát opakuje, ale po druhém nebo třetím nárazu zvolí jinou cestu, aby se překážce vyhnulo. (KLUSOŇOVÁ, H. 2006)

Tighmotaxe je patrná také u pokusů s titanovou bělobou. Paramecia zde narážejí na větší hrudky nerozpustného pigmentu a jako v předchozím případě mění směr, aby se překážce vyhnula.

3.1.5.3. Toxikologické pokusy

3.1.5.3.1. Pokus s methylenovou modří

V tomto pokusu sledujeme, jaký vliv má methylenová modř na paramecia. Do suspenze paramecií na podložním sklíčku přidáme několik krystalků methylenové modři. Pozorujeme změny v chování paramecií (KLUSOŇOVÁ, H. 2006).

3.1.5.3.2. Pokus s titanovou bělobou

Díky nerozpustnému pigmentu titanové běloby můžeme sledovat přijetí těchto zrnek buněnčými ústy prvoka. „Fagocytované“ částice jsou zviditelněny pomocí polarizačního filtru, který můžeme připevnit na mikroskop (obr. č. 6 v příloze).

Tyto pokusy jsme prováděli jak v prostředí Bürkerovy komůrky, tak i v klasickém uspořádání podložní – krycí sklíčko.

3.1.5.3.3. Pokus s krystalky glukózy

V tomto pokusu sledujeme, jaký vliv na paramecia má nízká a poté vysoká koncentrace glukózy.

Na podložní sklíčko naneseme kapku suspenze paramecií a vedle kapku vody, do které dáme pár krystalků glukózy. Obě kapky spojíme stružkou a pozorujeme, jak se mění chování paramecií (KLUSOŇOVÁ, H. 2006).

3.1.5.3.4. Pokus s cibulovou drtí

Provádíme pozorování paramecií ve visící kapce. Porovnáváme účinky čerstvé a vyčpělé cibule.

Kousek čerstvé cibule rozdrtíme ve třecí misce, poté ji vložíme do válečku, který pomocí vazelíny přilepíme na podložní sklíčko. Na krycí sklíčko dáme kapku suspenze paramecií a umístíme na váleček (kapka je uvnitř válečku) a pozorujeme.

Totéž provedeme s cibulí, která byla ponechána 60 minut volně na vzduchu (KLUSOŇOVÁ, H. 2006).

3.1.5.3.5. Pokus s čerstvým a starým Jodisolem

Tímto pokusem jsme chtěli porovnat účinnost čerstvého Jodisolu a Jodisolu, který je už 5 let po exspiraci.

Ke kapce suspenze paramecií na podložní sklíčko přidáme kapku Jodisolu (již zředěného a o známé koncentraci). Mačkáme stopky, rohem krycího sklíčka jemně promícháme, přiklopíme a pozorujeme změny paramecií.

Provedeme několik pozorování pokaždé s jinou koncentrací Jodisolu. Začínáme vyšší koncentrací, pokračujeme sestupně až po koncentraci, která nemá na paramecia vliv.

3.1.5.3.6. Pokus s Formalínem

Pokusem s Formalínem jsme chtěli dokázat silný desinfekční účinek této látky. Postupovali jsme obdobně jako u pokusu s Jodisolem.

3.1.5.3.7. Pokus s Eozinem, Jádrovou červení, Toluidinovou modří, Janusiho zelení

Přidáváním různých koncentrací barviv k suspenzi paramecií na podložním sklíčku jsme chtěli zjistit, do jaké míry jsou tato barviva (používaná ke zvýrazňování různých buněčných struktur) toxická a také porovnat jejich toxicitu vzájemně mezi sebou.

Při provedení pokusu jsme postupovali obdobně jako u Jodisolu a Formalínu, jen ve vyšších koncentracích.

3.1.6. Mikroskopování

Mikroskopování jsme prováděli na mikroskopu NU2 (Zeiss Jena) a BIOLUX ST (Bresser).

3.1.6.1. Mikroskopování v normálním procházejícím světle

Pro základní pozorování a popis změn jako např. změna rychlosti paramecií, vrtákovitý, vrtulovitý pohyb, shlukování apod. využíváme zvětšení objektivu 4x. Pro pořízení fotografií a detailnější popis, např. změny na membráně, vystřílení trichocyst apod. využíváme zvětšení objektivu 10x, výjimečně i větší.

3.1.6.2. Mikroskopování v polarizovaném světle

Pomocí mikroskopování v polarizovaném světle sledujeme fagocytózu titanové běloby. Fagocytované částice jsou zviditelněny pomocí soustavy polarizačních filtrů v mikroskopu. Využíváme schopnosti titanové běloby otáčet rovinu polarizovaného světla (obr. č. 6 v příloze).

3.1.7. Fotografování v mikroskopu pomocí mobilního telefonu

Použili jsme mobilní telefon s fotoaparátem (Nokia 5300), obyčejnou gumičku (např. do vlasů) a jednoduchou pomůcku – dřevěný špalíček velikosti mobilního telefonu, který má v sobě otvor, velikostí přesně odpovídající okuláru daného mikroskopu (uspořádání podle Dr. Hochmanna).

Z mikroskopu opatrně vyndáme okulár a nasadíme ho do otvoru ve špalíčku. Poté ke dřívku připevníme mobilní telefon gumičkou tak, aby objektiv mobilního telefonu ležel přímo na vyjmutém okuláru. Nakonec toto celé „zařízení“ zasuneme zbylou částí okuláru zpět do tubu mikroskopu. Poté už jen zkontrolujeme, že objektiv mobilního telefonu leží přesně na středu okuláru mikroskopu, a to pomocí obrazu zorného pole při pohledu na displej mobilu. Na mobilním telefonu dále nastavíme tzv. „zoom“ (zvětšení), který nám pro dané fotografování vyhovuje nejvíce, doostříme mikrošroubem mikroskopu a můžeme fotografovat. (obr. č. 1 v příloze)

Všechny fotografie použité v této bakalářské práci byly pořízeny tímto způsobem.

3.1.8. Mikrokinematografie v mikroskopu pomocí mobilního telefonu

Při natáčení krátkých videosekvencí s paramecii postupujeme úplně stejně, jako při pořizování fotografií, jen si ještě před umístěním mobilního telefonu na okulár mikroskopu změníme nastavení telefonu z „foto“ na „video“.

Natáčíme-li jedno konkrétní paramecium při pohybu, můžeme pomocí šroubu křížového posunu pohybovat s preparátem po pracovním stolku a udržet si tak dané paramecium delší dobu v zorném poli.

3.1.9. Měření rychlosti pohybu v Bürkerově komůrce

Orientační měření rychlosti pohybu paramecia jsme prováděli na základě hodnocení, kolik středních čtverců Bürkerovy komůrky „přeplave“ za časovou jednotku. (V hematologii slouží tyto střední čtverce pro počítání leukocytů.)

Zhotovíme několik videozáznamů a potom z nich vybereme takový, ve kterém některé z paramecií alespoň jednu sekundu nemění svůj směr a plave rovnoběžně s některým vrypem Bürkerovy komůrky. Poté z videozáznamu pomocí stopek (nebo jednodušeji vyslovováním číslovky „jednadvacet“ jako trvání jedné sekundy) měříme čas a zároveň počítáme uraženou vzdálenost paramecia. Začínáme počítat čtverce a měřit čas ve chvíli, kdy paramecium přední částí těla vstupuje do čtverce, přestaneme počítat čtverce např. po dvou sekundách (➔ víme tedy, že paramecium urazilo X čtverců za 2 sekundy). Nebo opačně. Přestaneme měřit čas po uražení vzdálenosti např. pěti čtverců (➔ víme tedy, že paramecium urazilo 5 čtverců za X sekund).

3.2. Výsledky

3.2.1. Vliv různého prostředí

3.2.1.1. Vliv samotného prostředí ve zkumavce

Parameica přežijí ve vhodných podmínkách ve zkumavce i několik týdnů. Přesto je ale důležité provádět pokusy se zhruba stejně starou suspenzí paramecií. Čím je suspenze starší, tím jsou paramecia citlivější k různým vlivům, hynou dříve.

Všechny pokusy v této bakalářské práci jsem proto prováděla v rozmezí max. 3 dnů, paramecia byla stará něco okolo 11 dní.

Stářím suspenze rozumíme dobu kultivace paramecií od naočkování do živného roztoku do provedení pokusu.

3.2.1.2. Vliv samotného přemístění paramecií na nepřikryté podložní sklíčko

Kapka suspenze paramecií se na nepřikrytém podložním sklíčku vystavená přímému světlu mikroskopu začíná okolo 10. minuty od okrajů zmenšovat. Paramecia ale vycestovávají do středu kapky, kde je vody stále dost (vyšší nahuštění paramecií v centru).

Okolo 15. minuty dochází k přischnutí některých paramecií z okraje kapky na sklíčko. Dochází k tomu proto, že se paramecia z okrajů již do středu kapky nevejdou. S vysychající vodou okolo těla vypouštějí svou tekutinu ven z těla – svraští se a následně zůstanou na sklíčku daleko od vody jakoby „připečení“.

Ve 22. minutě zůstávají poslední 3 paramecia ve zbývajícím nepatrném množství vody. Jsou svraštělá, ale stále je znatelný mírný pohyb.

Ve 23. minutě jsou již všechna paramecia mrtvá v důsledku úplného vypaření vody.

Takto jsme provedli pouze orientační pokusy. Na paramecia jsme nepůsobili žádnou chemikálií.

3.2.1.3. Vliv samotného přemístění paramecií mezi klasické podložní a krycí sklíčko

Dlouhé působení ostrého světla mikroskopu nepůsobí na paramecia příznivě. Dochází k jejich předčasnému hynutí i bez přidání jakékoliv chemikálie.

Okolo 11. minuty dochází k lehkému zpomalení přímočarého pohybu paramecií. Po 12. minutě se jejich štíhlé tělo stává objemnější (zaoblení). Po 13 minutách dochází k poměrně znatelnému zpomalení přímočarého pohybu paramecií. V 15. minutě je pohyb paramecií velmi pomalý, vrtákovitý. Okolo 16. minuty zůstávají některá paramecia téměř nehybně na místě a můžeme při zvětšení objektivu 10x pozorovat vystřílené trichocysty. (obr. č. 3 v příloze). V 17. minutě pozorujeme pouze nepatrný přímočarý pohyb, vrtákovitý pokračuje a asi polovina paramecií je mrtvá. V 18 minutách jsou již všechna paramecia mrtvá. U déle stojících se začínají objevovat první neurčité deformační změny těla (obr. č. 4 v příloze) a na vnitřní straně membrány první „bubliny“ (obr. č. 5 v příloze). Po 20 minutách se již tyto „bubliny“ objevují u všech paramecií. Po 21 minutách se u některých paramecií objevují první výchlipky na povrch membrány. Po 22. minutě jsou již velké „bubliny“ při vnitřní a i vnější straně membrány. Po 24 minutách přestávají být paramecia v zorném poli mikroskopu vidět, viditelné jsou jen nepatrné tmavší skvrnky. Okolo 25. minuty dochází k úplnému rozplynutí těl paramecií – zorné pole mikroskopu je bílé.

3.2.1.4. Vliv samotného přemístění do Bürkerovy komůrky

V 15. minutě první lehké zpomalení přímočarého pohybu paramecií. Okolo 19. minuty dochází k mírnému zpomalení přímočarého pohybu. Okolo 22. minuty výrazné zpomalení pohybu, štíhlé tělo paramecií se stává objemnější, mrtvých paramecií přibývá. V 25. minutě je již většina paramecií mrtvá, mají citronovitý tvar těla. Po 26 minutách jsou již úplně všechna paramecia mrtvá.

Na rozdíl od mikroskopování paramecií mezi podložním a krycím sklíčkem nevznikají „bubliny“ a ani po 70 minutách nedochází k rozkladu (rozplynutí) jejich těl, zachovávají citronovitý tvar těla.

Paramecia v Bürkerově komůrce přežívají asi 2x déle něž klasicky mezi podložním a krycím sklíčkem. Je to dáno nejspíše tím, že se k parameciím lépe dostává vzduch, nejsou zde tolik stísněná, mají možnost volnějšího pohybu.

3.2.2. Sledování detailních fyziologických a patologických vlastností

Zdravá paramecia se v kapce vody pohybují poměrně rychle a přímočaře, zároveň se ještě otáčejí kolem své vlastní osy (vrtákovitý pohyb).

3.2.2.1. Přímočarý pohyb kupředu a zpět

Přímočarý pohyb paramecia kupředu a zpět je realizován pomocí řasinek, které nejsou při běžném mikroskopování patrné. Mikroskopováním v polarizovaném světle (po přidání pigmentu - titanové běloby) však bylo možno pozorovat zrnka pigmentu, která se pohybují vždy ve směru opačném, než je pohyb paramecia. Řasinky se od zrn pigmentu „odráží“, vidíme tak pohyb zrnek pigmentu i paramecia.

3.2.2.2. Vrtákovitý pohyb

Vrtákovitý pohyb je rotace těla paramecia kolem podélné (delší) osy. Tento pohyb provádí paramecium fyziologicky zároveň s rychlým přímočarým pohybem kupředu. Může ho ale také provádět po ovlivnění různými toxickými látkami, kdy přímočarý pohyb ustává, ale vrtákovitý pohyb pokračuje. Vrtákovitý pohyb na místě je častým jevem při ovlivňování paramecií různými látkami, nebo jen při dlouhém působení ostrého světla mikroskopu.

3.2.2.3. Vrtulovitý pohyb

Vrtulovitý pohyb je rotace těla paramecia okolo příčné (kratší) osy těla. Tento pohyb paramecium fyziologicky neprovádí. Jedná se o pohyb, který paramecium provádí vždy až po zastavení přímočarého pohybu. Pozorujeme ho po ovlivnění paramecií určitou toxickou látkou (např. Eozinem).

Dokumentace vrtulovitého pohybu (obr. č. 2 v příloze).

3.2.2.4. Rybí pohyb

Rybí pohyb je zvláštní komíhavý pohyb paramecia. Paramecium se při přímočarém pohybu jakoby „kýve“ ze strany na stranu (místo vrtákovitého pohybu). Tento pohyb opět fyziologicky nepozorujeme. Nastává v případě, kdy se paramecium „vzpamatuje“ po přídavku některých toxických látek (např. toluidinové modři) do suspenze na podložním sklíčku.

3.2.2.5. Nekoordinovaný pohyb

Nekoordinovaným pohybem je myšlen pohyb paramecií, který je oproti normálu výrazně rychlejší, není přímočarý, ale působí jakoby zmateně. Paramecium plave kousek dopředu, v zápětí nazpátek, poté se o určitý úhel pootočí a opět dopředu, nazpět atd. Po chvíli dochází k „uklidnění“ a tento pohyb většinou přechází v pohyb rybí, nebo výrazně vrtákovitý spíše na místě.

3.2.2.6. Patologické změny těla paramecia

Rozlišujeme patologické tvary těla: kapkovitý, citronovitý, zaoblený. Dále může dojít ke scvrknutí těla paramecia do malé kuličky, tvorbě „bublin“ na membráně, vystřílení trichocyst, lýze buňky, shlukování paramecií, obarvení cytoplazmy, organel.

3.2.2.7. Pokusy na tighmotaxi

V tomto pokusu jsme dokázali, že zdravá paramecia jsou schopna vyhýbat se bez větších problémů překážkám. Paramecium, které narazilo na větší hrudku nerozpustného pigmentu (titanové běloby) změní směr, aby se překážce vyhnulo. Změna směru spočívá v tom, že paramecium po nárazu začne pohybovat brvami v opačném směru, tak od překážky „vycouvá“ (drobná zrnéčka pigmentu se v těsném okolí paramecia pohybují opačně v porovnání s pohybem paramecia). Paramesium se pootočí o určitý úhel a pokračuje dále normálním způsobem.

Paramecia ovlivněná toxickou látkou už nejsou schopna tak pohotově zareagovat, celý proces změny pohybu jim trvá déle, nebo se u překážky zastaví a na tomtéž místě po určité době také zahynou.

3.2.3. Vliv testovaných látek

3.2.3.1. Pokus s titanovou bělobou

Z hlediska toxikologického je výsledkem tohoto pokusu, že titanová běloba, ani když je fagocytována, nezpůsobí rozklad cytoplazmy nebo lýzu buňky, dokonce ani nezastavuje pohyb paramecií. Pokud jsme změny pohybu nalézali, byly vyvolány především délkou pobytu paramecií v nepříznivém prostředí (pod krycím sklíčkem, na ostrém světle mikroskopu) a méně již současným vlivem fagocytovaného pigmentu. Titanová běloba je tedy z tohoto hlediska téměř zcela netoxická.

Kromě toho jsme v tomto pokusném uspořádání pozorovali pohyb brv na povrchu paramecia. Drobná zrnéčka pigmentu se v těsném okolí paramecia pohybují opačně v porovnání s pohybem paramecia. Zrnéčka pigmentu vzdálenější od paramecia se nepohybují vůbec. Tyto jevy jsme zachytili na videozáznam.

3.2.3.2. Pokus s methylenovou modří

Tímto pokusem jsme si demonstrovali jednak toxický vliv methylenové modři na paramecia, ale také negativní chemotaxi.

Po přidání několika krystalků methylenové modři do suspenze paramecií na podložním sklíčku jsme pozorovali, jak se paramecia oblastem s methylenovou modří vyhýbají (negativní chemotaxe), později po rozpuštění krystalků, když koncentrace látky v suspenzi stoupla, paramecia uhynula.

Podrobněji jsou tyto změny zaznamenány v tabulce č. 8 a na obrázku č. 12 v příloze.

3.2.3.3. Pokus s krystalky glukózy

Pokusem s krystalky glukózy jsme si demonstrovali jednak pozitivní chemotaxi, ale i negativní působení vyšší koncentrace glukózy na paramecia.

Do kapky vody nanesené vedle kapky suspenze paramecií na podložním sklíčku jsme přidali pár krystalků glukózy a obě kapky jsme propojili stružkou. Poté jsme pozorovali, jak se paramecia pohybují směrem ke krystalkům glukózy (pozitivní chemotaxe). Ale po přidání dalších krystalků glukózy paramecia změnila svůj tvar, smrštila se a uhynula. Příčinou byla „hypertonickost“ okolního roztoku vůči parameciím.

3.2.3.4. Pokus s cibulovou drtí

U čerstvé cibule pozorujeme zpomalování přímočarého pohybu paramecií a jejich smrt. U cibule, která byla ponechána 60 minut volně na vzduchu, pozorujeme lehké zpomalení přímočarého pohybu paramecií, ke smrti ale nedochází.

Podrobněji jsou změny paramecií ovlivněných cibulovou drtí zaznamenány v tabulce č. 9 v příloze.

Pokusem s cibulovou drtí jsme se přesvědčili o tom, že cibule ponechaná delší dobu volně na vzduchu ztrácí svoje antiseptické vlastnosti. A naopak, že čerstvá cibule skutečně má schopnost paramecia usmrtit.

3.2.3.5. Pokus s čerstvým a starým Jodisolem

Rozdíly mezi čerstvým a starým Jodisolem byly velice nepatrné, dalo by se říci zanedbatelné. Např. při naředění čerstvého Jodisolu na koncentraci 0,025 % byla paramecia mrtvá ihned. Tatáž koncentrace starého Jodisolu způsobila okamžitou smrt asi u ¾ paramecií, zbylá ¼ zahynula do 1 min (tabulka č. 1 a 2 v příloze). Koncentrace originálního nenaředěného Jodisolu je ale 3 %. Tato koncentrace spolehlivě usmrtí všechna paramecia ihned, ať se jedná o látku čerstvou nebo starou

.

3.2.3.6. Pokus s Formalínem

Pokusem s Formalínem jsme dokázali velmi silný desinfekční účinek této látky. Formalín určený pro desinfekci je prodáván jako 10 % roztok. Tento roztok ještě v koncentraci 0,06 % (tzn. 166x naředěný) má na paramecia okamžitý smrtící účinek.

Změny paramecií jsou podrobněji zaznamenány v tabulce č. 3 a na obrázku č. 7 v příloze.

3.2.3.7. Pokusy s Eozinem, Jádrovou červení, Toluidinovou modří, Janusiho zelení

Celkově tato barviva příliš velkou toxicitu nemají (např. v porovnání s Jodisolem nebo Formalínem) a ani vzájemně se v účincích moc neliší. Výjimku tvoří Janusiho zeleň, která je oproti Eozinu, Jádrové červeni a Toluidinové modři výrazně toxičtější.

Koncentrace těchto látek se pohybovala od 0,80 % do 0,10 %, u Janusiho zeleně do 0,005 %.

Podrobněji jsou změny paramecií zaznamenány v tabulkách č. 4, 5, 6, 7 a na obrázcích č. 8, 9, 10, 11 v příloze.

3.2.4. Měření rychlosti pohybu v Bürkerově komůrce

V jednom videozáznamu zdravých neovlivněných paramecií jsme zjistili, že vhodně se pohybující paramecium urazilo 6 středních čtverců Bürkerovy komůrky za dvě sekundy. (Velikost jednoho středního čtverce je 0,25 mm, paramecium jich přeplavalo 6.) Paramecium se tedy pohybovalo rychlostí 1,5 mm za sekundu ($1{,}5.10^{-3}$ m/sek).

4. DISKUSE

Tato bakalářská práce se pokouší ověřit nejjednodušší experimentální uspořádání, pomocí kterého by se za minimálních nákladů a experimentálních podmínek dal na parameciích orientačně testovat vliv některých látek, pro jejichž důkladnější toxikologický výzkum nejsou finance.

4.1. Spolehlivost metody (porovnatelnost výsledků)

Přestože parameica přežijí ve vhodných podmínkách ve zkumavce i několik týdnů, je důležité provádět pokusy se zhruba stejně starou suspenzí paramecií. Čím je suspenze starší, tím jsou paramecia citlivější k různým vlivům a hynou dříve. O tom jsme se přesvědčili hned v počátcích našich pokusů. V jeden den jsme na parameciích testovali Jádrovou červeň, o 14 dní později jsme tentýž pokus zopakovali (všechny ostatní podmínky byly stejné), čekali jsem, že i výsledky budou obdobné, ale ty se výrazně lišily. Proto byly všechny následující pokusy prováděny v rozmezí max. 3 dnů, paramecia byla stará něco okolo 11 dní.

Z toho vyplývá, že tato meotda je použitelná pro porovnání toxicity různých látek, ale jen v případě, že testovanými látkami ovlivňujeme vždy stejně starou suspenzi paramecií.

Otázkou zůstává, zda by dvě stejně staré suspenze paramecií poskytly shodné výsledky i pokud by každá ze zkumavek pocházela z jiné laboratoře (drobné rozdíly v kultivaci, rozdílná teplota a zatemnění při uchování apod.).

Jako další problém se jeví poměrně výrazné subjektivní hodnocení. Např. popisujeme: asi ½ paramecií mrtvá, lehké zpomalení přímočarého pohybu, výrazné zpomalení přímočarého pohybu, lehké zabarvení organel apod. Hodnotí-li účinky určitých látek jeden člověk, pak jsou výsledky navzájem porovnatelné. Pokud by ale dvě rozdílné látky hodnotili dva lidé, výsledky už by mohly být rozdílné.

U této metody by byl pravděpodobně problém s objektivizací výsledků, nemožnost porovnání výsledků různých laboratoří apod. Ale pro rychlé porovnání toxicity několika látek je naprosto dostačující.

4.2. Změny paramecií, které hodnotíme

V této bakalářské práci jsme porovnávali toxicitu jednotlivých látek podle toho, jak na danou látku paramecia reagují. Sledovali jsme čas, kdy jsou všechna paramecia mrtvá a popisovali jsme změny jejich chování (jak změny pohybu, tak i tvarové změny). Vysledovali jsme, že určité jevy jsou typické pouze pro 2 nebo 3 látky, jiné nastávají vpodstatě u všech testovaných látek. Např. vystřílení trichocyst a vrtákovitý pohyb na místě nastává u všech látek, je to tedy jev nespecifický. Paramecia mění svůj tvar na „kapku“ nebo „citron“ po působení Jodisolu, Formalínu a Eozinu. Naopak, tvarové změny tohoto charakteru nenastávají u Jádrové červeně ani Toluidinové modři. Zvláštním jevem je shlukování paramecií, toto jsme pozorovali pouze u Jodisolu a Jádrové červeně. Specifickým pohybem je pohyb vrtulovitý, který sledujeme při působení Eozinu a Toluidinové modři. Nekoordinovaným pohybem reagují paramecia na působení Eozinu, Janusiho zeleně a čerstvé cibule. Rybí pohyb můžeme sledovat u Eozinu a Toluidinové modři. Tvar těla se zaobluje pouze u Janusiho zeleně a Methylenové modři. Na tomto podkladě by se mohly tetsované látky řadit do skupin. Jako např. látky, způsobující u paramecií vrtulovitý pohyb: Eozin, Toluidinivá modř (a jistě ještě některé další, které v této práci testovány nebyly). Atd.

4.3. Měření rychlosti v Bürkerově komůrce

Dále by se dalo pro hodnocení toxicity látek využít měření rychlosti paramecií v Bürkerově komůrce. Tuto metodu jsme zkoušeli pouze orientačně na neovlivněných parameciích. Je časově náročnější, ale výsledky z ní by sa daly považovat za objektivnější, než pouhé konstatování, že např. ve 2 minutách došlo k výraznému zpomalení přímočarého pohybu paramecií.

Pro měření rychlosti v Bürkerově komůrce je pořízení videozáznamu velkou výhodou, protože zachytíme pohyb ještě zcela zdravých paramecií a v dalších minutách působení látky pak můžeme videosekvence libovolně dlouho procházet, vybrat nejvhodněji se pohybující paramecium, záznam vrátit a poté v klidu změřit.

Kdybychom se pokoušeli měřit rychlost přímo při pohledu do mikroskopu, hrozilo by poměrně výrazné zkreslení výsledků, protože, než by se nám podařilo najít vhodné paramecium (které plave rovnoběžně s některým vrypem Bürkerovy komůrky a zároveň alespoň jednu vteřinu nemění směr), mohl by uběhnout čas, po který jsou paramecia ještě

zcela neovlivněná. Ta už by mohla dlouhým působením ostrého světla mikroskopu zpomalovat svůj pohyb, což by vedlo k chybnému výsledku.

Tato metoda je hrubě orientační, ale přece jen dokáže kvantifikovat vliv testovaných látek na pohyb paramecií mnohem objektivněji než pouhý odhad.

Podobně i pomocí pokusů na tighmotaxi by se dal sledovat vliv testovaných látek na paramecia. Porovnávali bychom např. jak rychle paramecium dokáže zareagovat (změnit směr) po nárazu na vlákno vaty nebo hrudek pigmentu po ovlivnění určitou látkou. Tyto pokusy jsme provedli opět pouze orientačně.

4.4. Vzájemné porovnání toxicity testovaných látek mezi sebou

Tabulka porovnání koncentrací látek usmrcujících paramecia ve shodných časech.

Pokusy provedeny v klasickém uspořádání podložní-krycí sklo	c [%], která usmrtí všechna paramecia ihned	c [%], která usmrtí všechna paramecia do 2 minut	c [%], která na paramecia nemá vliv (sledováno po dobu 15 minut)
Jodisol (čerstvý)	0,025	0,013	0,008
Jodisol (starý)	0,037	0,019	0,010
Formalín	0,060	0,013	0,005
Jádrová červeň	(*)	0,800	0,100
Toluidinová modř	0,800	0,500	0,100
Janusiho zeleň	0,800	0,013	<0,005
Eozin	(*)	0,500	0,100

(*)…původní koncentrace těchto barviv (1 %) není dostatečně vysoká k tomu, aby po přidání do kapky suspenze paramecií usmrtila všechna paramecia okamžitě; výsledná koncentrace barviva 0,8 % usmrtila všechna paramecia do 1 minuty

Z tabulky je patrné, že látky, které působí na paramecia nejtoxičtěji jsou Jodisol (čerstvý i starý), Formalín a Janusiho zeleň. Z těchto čtyř látek se nedá vybrat ta nejškodlivější, protože, jak je patrno, čerstvý Jodisol sice usmrtí ihned všechna paramecia už při koncentraci 0,02 5%, ale Janusiho zeleň má mírný toxický vliv ještě při koncentraci 0,005 %, kdy ostatní látky už žádný vliv neprojevují. Navíc jsou rozdíly v koncentracích tak nepatrné (např. mezi čerstvým Jodisolem, starým Jodisolem a Formalínem se pohybují v řádech tisícin), že je otázkou, zda má vůbec smysl z takto nepatrných rozdílů přisoudit jedné látce přívlastek „nejtoxičtější“ zvlášť, když metoda je pouze orientační a my sledujeme, že např. do 2 minut byla všechna paramecia mrtvá (ale nevíme už přesně, jestli všechna

paramecia uhynula za 1 min. a 45 sek., nebo 1 min. a 55 sek. apod.). Má tedy smysl pouze konstatovat, že jako nejtoxičtější se jeví Jodisol (čerstvý i starý), Formalín a Janusiho zeleň.

Nejméně toxická jsou barviva Jádrová červeň a Eozin. Vůbec žádnou toxicitu neprojevila titanová běloba. Tak jako titanová běloba by se měly chovat např. umělohmotné materiály určené pro výrobu implantátů (např. umělých srdečních chlopní), nebo stomatologické materiály. Podobně jako titanová běloba by se mohly toxikologicky testovat kontrastní látky pro rentgenovou diagnostiku. Avšak přece jen zůstává otázka, zda stimulace buněk k bezúčelné fagocytóze není toxickým vlivem vyvolaným povrchovými vlastnostmi pigmentu.

4.5. Práce na podobné téma

Při vyhledávání prací na podobné téma se nám podařilo navázat kontakt s prof. Romanem Janischem z Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Od něj jsme získali odkazy na dvě práce z oblasti testování účinků mykotoxinů na parameciích, které u pana profesora publikovala v devadesátých letech studentka postgraduálního studia:

- KULTOVÁ, M. - JANISCH, R. *Metody studia účinků aflatoxinu B1 na úrovni buňky. In Proceedings from International Scientific Conference Biologické dni.* Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 1998. ISBN 80-8050-177-7.
- KULTOVÁ, M. - JANISCH, R. *The effect of aflatoxin B1 on the morphology and behaviour of Tetrahymena thermophila cells.*Brno: Scripta medica, Lékařská fakulta MU Brno, 1999. ISSN 1211-3395. Vol. 72, No. 7.

Dále nám prof. Janisch sdělil, že na jejich fakultě kultivují prvoky: *Tetrahymena thermophila, Euglena gracilis* a jejich mutanty, *Paramecium caudatum, Paramecium multimicronucleatum, Blepharisma undulans.*

V současné době se na Masarykově univerzitě touto problematikou zabývá doc. Jan Šimůnek z Ústavu prevetivního lékařství, který na podobná témata také zadává diplomové práce studentům.

Nálevníci byli také použiti v pokusech Elizabeth Blackburnové a Joe Galla v roce 1978 jako model pro studium telomer a telomerázy. Pomocí pokusů s nálevníky se snažili potvrdit nebo vyvrátit, zda má stárnutí buněk přímou souvislost se zkracováním telomer. Dále se ve svých pokusech zabývali souvislostmi mezi telomerázou a vznikem rakovinných buněk (Entomologický atlas, Biologické centrum AV ČR; Přírodovědecký časopis Vesmír, ISSN 1214-4029).

5. ZÁVĚR

Provedli jsme některá základní pozorování a pokusy s cílem ověřit možnost testování biologických účinků chemických sloučenin látek na parameciích pro podmínky s minimálním laboratorním vybavením. Byla ověřena možnost pracovat s tímto experimentálním systémem doma nebo na studentské ubytovně – pokud student má doma k dispozici alespoň starší mikroskop. Ověřili jsme, že pro fotografickou dokumentaci lze použít mobilní telefon vybavený miniaturním fotoaparátem.

Jako nepříznivé experimentální prostředí se ukázalo, když paramecia v kapce vody byla přikryta klasickým krycím sklíčkem. Naopak mnohem šetrnější pro paramecia je testování účinků chemikálií v prostornějším prostředí Bürkerovy komůrky.

Vytypovali jsme některé změny tvaru a chování, které by byly použitelné pro popis účinků chemických sloučenin na tyto buňky. Některé z tvarových změn jsme dokumentovali mikrofotografiemi.

Tato práce by mimo jiné měla posloužit pro popularizaci práce s biologickým materiálem. Takovéto pokusy by mohly být prováděny v biologických kroužcích při základních nebo středních školách. Naopak je ale možno připomenout i možnost využití tohoto biologického materiálu pro testování výrobků chemického průmyslu, neboť u tisíců chemických sloučenin se neví vůbec nic o možnosti toxických účinků. Je tedy nutno hledat ty nejlacinější a nejdostupnější biologické testovací systémy.

Z hlediska toxikologického lze říci, že jsme v orientačních pokusech prokázali jedovatost Formalínu, Jodisolu a některých organických barviv a naopak značnou neškodnost titanové běloby.

6. SEZNAM LITERATURY

1. BEDNÁŘ, M. – FRAŇKOVÁ, V. – SCHINDLER, J. – SOUČEK, A. – VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání – dotisk. Praha 2: Marvil, 1996. 560 s. ISBN - . (Str.: 488-501)

2. BUCHTA, V. – JÍLEK, P. – HORÁČEK, J. – HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha 1: Karolinum, 2002. 193 s. ISBN 80-7184-565-5. (Str.158-165)

3. Entomologický atlas, Biologické centrum AV ČR. *Stárnutí buněk*. http://www.entu.cas.cz/fyziol/students/lecture5/lecture5.htm (dostupné v roce 2010)

4. HOCHMANN, J. *Exploitation of the telephonic mobile apparatus for photography of education preparations in biology* (poster, abstrakt ve sborníku). XIX. Biologické dny, Hradec Králové, Říjen 2008.

5. JANISCH, R. *Osobní sdělení.* Masarykova Univerzita. Lékařská fakulta Brno. 2007.

6. KLUSOŇOVÁ, H. – LENČO, J. *Praktická cvičení a otázky ze základů cytologie a genetiky*. 3. vydání. Praha 1: Karolinum, 2006. 60 s. ISBN 80-246-1211-9.

7. KTENAS, A. *Exploitation of the telephonic mobile apparatus for photography of education preparations in biology* (přednáška, abstrakt ve sborníku). XVI. Ročník studentské vědecké konference, Hradec Králové, duben 2008.

8. KULTOVÁ, M. - JANISCH, R. *Metody studia účinků aflatoxinu B1 na úrovni buňky. In Proceedings from International Scientific Conference Biologické dni.* Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 1998. ISBN 80-8050-177-7. (Str.:116-117)

9. KULTOVÁ, M. - JANISCH, R. *The effect of aflatoxin B1 on the morphology and behaviour of Tetrahymena thermophila cells.*Brno: Scripta medica, Lékařská fakulta MU Brno, 1999. ISSN 1211-3395. Vol. 72, No. 7. (Str.: 277-293)

10. Merck KgaA. *Microscopy. Toluidine blue O.* http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1278260/115930en.pdf (dostupné v roce 2010)

11. Merck KgaA. *Microscopy. Janus green B.* http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1288370/101324en.pdf (dostupné v roce 2010)

12. Merck KgaA. *Microscopy. Eosin.* http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1278000/109844115934115935115936en.pdf (dostupné v roce 2010)

13. MÜLLEROVÁ, Z. *Osobní sdělení.* UK. Farmaceutická fakulta Hradec Králové. 2008.

14. NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty.* 3. přepracované vydání. Jinočany: H & H, 2000. 556s. ISBN 80-86022-46-3. (Str.344)

15. PAPÁČEK, M. – MATĚNOVÁ, V. – MATĚNA, J. – SOLDÁN, T. *Zoologie*. 3. upravené vydání. Praha 6: Scientia, spol. s r. o., pedagogické nakladatelství, 2000. 290s. ISBN 80-7183-203-0. (Str.: 20-21, 24-28)

16. Přírodovědecký časopis Vesmír, ISSN 1214-4029. *Od nálevníků k rakovině*. http://www.vesmir.cz/clanek/od-nalevniku-k-rakovine (dostupné v roce 2010)

17. VACEK, Z. *Histologie a histologická technika*. SZN Praha 1988, str. 366.

7. PŘÍLOHA

TABULKA č. 1

Jodisol (EXP 04-2005 ➔ 5 let po exspiraci), paramecia stará 10 dní

c [%]	*změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití*
0,037	- paramecia mrtvá ihned
0,029	- většina paramecií mrtvá ihned, pár přežilo několik sekund
0,025	- asi ¾ paramecií mrtvé ihned - ostatní se pohybují pomaleji, výrazně vrtákovitý pohyb - do 1 minuty všechna paramecia mrtvá – deformace tvaru těla (tvar kapky nebo citronu)
0,019	- asi ½ paramecií mrtvá ihned - ostatní se pohybují pomaleji, výrazně vrtákovitý pohyb - do 2 minut všechna paramecia mrtvá
0,013	- několik paramecií mrtvých ihned - po 2 minutách lehké zpomalení přímočarého pohybu - po 5 minutách výraznější zpomalení pohybu a asi ¼ paramecií mrtvá - po 7 minutách – počet mrtvých se nezvyšuje, ale začíná „shlukování“ (*) - po 10 minutách výraznější zpomalení pohybu a asi ½ paramecií mrtvá - po 12 minutách mrtvých něco málo přes ½ paramecií, ostatní pohyb poměrně pomalý - ani po 15 minutách nedošlo ke smrti všech paramecií (mrtvých něco přes ½)
0,010	- paramecia nejeví žádné změny, tato koncentrace Jodisolu už toxicky nepůsobí
(*) *shlukování*: látka pravděpodobně ve vyšších koncentracích poškodí membránu tak, že prvok hyne okamžitě a mění se i jeho tvar; v nižších koncentracích membránu jen lehce naruší tak, že se stává „lepivou“ a dochází k tvorbě shluků, i někteří živí prvoci plavou ve shlucích	

TABULKA č. 2

Jodisol (čerstvý), paramecia stará 10 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,029	- paramecia mrtvá ihned
0,025	- paramecia mrtvá ihned
0,019	- většina paramecií (asi 9/10) mrtvá ihned, deformace tvaru těla („bubliny“ na membráně, citronovitý, kapkovitý tvar těla) - do 1 minuty všechna paramecia mrtvá
0,013	- asi 1/5 paramecií mrtvá ihned - po 1 minutě mrtvá asi ½ paramecií - do 2 minut všechna paramecia mrtvá – deformace tvaru těla (tvar kapky nebo citronu)
0,010	- po 2 minutách lehké zpomalení přímočarého pohybu - po 5 minutách výraznější zpomalení pohybu a asi ¼ paramecií mrtvá - po 7 minutách – počet mrtvých se nezvyšuje, ale začíná „shlukování“ - po 10 minutách výraznější zpomalení pohybu a asi ½ paramecií mrtvá - po 12 minutách mrtvých něco málo přes ½ paramecií, ostatní pohyb poměrně pomalý - ani po 15 minutách nedošlo ke smrti všech paramecií (mrtvých něco přes ½)
0,008	- paramecia nejeví žádné změny, tato koncentrace Jodisolu už toxicky nepůsobí

TABULKA č. 3

Formalín = Formol (= 40% vodný roztok formaldehydu), paramecia stará 11 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,455	- paramecia mrtvá ihned
0,055	- pouze vrtákovitý pohyb na místě, do 15 sekund všechna paramecia mrtvá, tvar těla se mění na kapkovitý (obr. č. 7), trichocysty patrny
0,025	- od začátku pomalejší přímočarý pohyb - ve 30 sekundách všechna paramecia pohyb pouze na místě, vrtákovitý - do 1 minuty všechna paramecia mrtvá
0,013	- přímočarý pohyb pomalejší - v 1 minutě ½ paramecií vrtákovitý pohyb na místě, ostatní pohyb pomalý - ve 2 minutách všechna paramecia mrtvá
0,008	- v 1 minutě a 30 sekundách zpomalení pohybu - ve 3 minutách ½ paramecií vrtákovitý pohyb na místě, zbytek pohyb velmi pomalý - ve 4 minutách všechna paramecia mrtvá
0,005	- paramecia nejeví žádné změny, tato koncentrace Formalínu už toxicky nepůsobí

TABULKA č. 4

Eozin, paramecia stará 10 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,80	- v prvních sekundách pohyb výrazně vrtákovitý, nekoordinovaný - později pohyb vrtulovitý na jednom místě (asi ¾ paramecií) - do 1 minuty všechna paramecia mrtvá, změny tvaru těla (kapka, citron – obr. č. 8), obarvená cytoplazma
0,50	- v prvních sekundách pohyb vrtulovitý na místě (u většiny) - po 1. minutě u ½ paramecií „vzpamatování“ – pomalý pohyb (rybí), u 2. poloviny smrt, deformace tvaru těla (scvrknutí do malé kuličky, popř. lýza – obr. č. 8) - do 2 minut všechna paramecia mrtvá, obarvená cytoplazma (začíná se barvit při zpomalujícím se pohybu u živých), deformace tvaru těla
0,30	- v prvních sekundách pohyb výrazně neuspořádaný, u některých paramecií vrtákovitý, u jiných vrtulovitý na místě - v 1 minutě a 30 sekundách je asi ½ paramecií mrtvá (změny tvaru jako u c 0,50 %), zbytek paramecií pohyb výrazně pomalý - ve 3 minutách všechna paramecia mrtvá
0,17	- v prvních sekundách u většiny paramecií pohyb vrtulovitý na místě - okolo 1. minuty „vzpamatování“ všech paramecií a pohyb pomalejší (rybí) - po 5 minutách pohyb pomalejší, žádná mrtvá paramecia - po 10 minutách několik málo paramecií mrtvých, ostatní pohyb pomalý, nebo vrtulovitý na místě - po 15 minutách většina paramecií mrtvá („bubliny“ na membráně, rozplynutí těla – asi spíše působením ostrého světla mikroskopu než samotnou látkou)
0,10	- paramecia nejeví žádné změny, tato koncentrace Eozinu už toxicky nepůsobí

TABULKA č. 5

Jádrová červeň, paramecia stará 11 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,80	- v prvních sekundách vrtákovitý pohyb spíše na místě, některá paramecia mrtvá ihned - poté pohyb ustává - do 1 minuty všechna paramecia mrtvá (jsou patrny vystřílené trichocysty, nedochází k výrazným změnám tvaru těla, cytoplazma začíná lehce růžovět asi po 2 minutách po smrti, po delší době je sytě růžová – výrazně sytější než okolní roztok jádrové červeně – obr. č. 9, dochází také ke shlukování – obr. č. 10)
0,50	- několik paramecií mrtvých ihned - u ostatních po 1. minutě výrazné zpomalení přímočarého pohybu - ve 2 minutách asi ½ paramecií mrtvá - po 4 minutách všechna paramecia mrtvá (bez tvarových změn, trichocysty patrny)
0,30	- po 2 minutách výrazné zpomalení přímočarého pohybu, několik paramecií mrtvých - ve 4 minutách asi ½ paramecií mrtvá, ostatní vrtákovitý pohyb na místě - v 5. minutě ¾ paramecií mrtvé, ostatní vrtákovitý pohyb na místě - v 6. minutě všechna paramecia mrtvá
0,17	- po 4 minutách první známky zpomalování přímočarého pohybu - v 6 minutách prvních několik mrtvých paramecií, některá pohyb pomalejší, jiná beze změny - ve 10 minutách asi ¼ paramecií mrtvá, ¼ paramecií pohyb pomalejší, vrtákovitý, spíše na místě, ½ paramecií beze změny - po 15 minutách asi ½ paramecií stále beze změny (na ně tato koncentrace Jádrové červeně toxicky nepůsobí)
0,10	- paramecia nejeví žádné změny, tato koncentrace Jádrové č. už toxicky nepůsobí

TABULKA č. 6

Toluidinová modř, paramecia stará 11 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,80	- paramecia mrtvá ihned, tvar těla výrazně nezměněn, trichocysty patrny
0,50	- většina paramecií mrtvá ihned - zbytek vrtákovitý pohyb na místě, mrtvá do 1 minuty
0,30	- v prvních sekundách pohyb pomalý, vrtákovitý - později se pohyb mění na vrtulovitý na místě - v 1 minuty „vzpamatování“ – pomalejší „rybí“ pohyb - ve 3 minutách pohyb výrazně zpomaluje - ve 4 minutách ¼ paramecií mrtvá, ostatní vrtákovitý pohyb téměř na místě - v 5. minutě ¾ paramecií mrtvé - v 6. minutě všechna paramecia mrtvá
0,17	- ve 3 minutách zpomalení přímočarého pohybu (u většiny) - ve 4 minutách výraznější zpomalení pohybu u všech - v 6 minutách ½ paramecií mrtvá, ostatní pohyb pomalý - v 7 minutách všechna paramecia mrtvá
0,10	- po 8 minutách první lehké zpomalování pohybu, žádné další změny, tato koncentrace Toluidinové modři už nemá výraznější toxický vliv

TABULKA č. 7

Janusiho zeleň, paramecia stará 11 dní

c [%]	***změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití***
0,800	- paramecia mrtvá ihned, tvar těla výrazně nezměněn, trichocysty patrny (obr. č. 11)
0,045	- většina paramecií mrtvá ihned, několik málo mrtvých do 30 sekund
0,025	- ½ paramecií mrtvá ihned, ostatní mrtvá do 1 minuty, tvar těla se zaobluje
0,013	- v prvních sekundách pohyb paramecií nekoordinovaný, vrtákovitý - pohyb postupně zpomaluje - do 2 minut všechna paramecia mrtvá
0,008	- ve 2. minutě pohyb zpomaluje - ve 3 minutách výrazné zpomalení pohybu, ¼ paramecií mrtvá, tvar těla zaoblený - v 5. minutě ¾ paramecií mrtvé - po 8 minutách všechna paramecia mrtvá
0,005	- okolo 8. minuty zpomalování přímočarého pohybu, tato koncentrace Janusiho zeleně ještě mírný toxický vliv vykazuje

TABULKA č. 8

Methylenová modř (krystalky), paramecia stará 11 dní

	změny v chování paramecií, změny tvaru těla po přidání krystalku methylenové modři do suspenze paramecií na podložním sklíčku
1. fáze	- krystalek není zcela rozpuštěn a paramecia se barvě vyhýbají – negativní chemotaxe (do 1 minuty)
2. fáze	- krystalek je z větší části rozpuštěn - voda, ve které paramecia plavou je zbarvena modře - na parameciích není viditelná žádná změna (okolo 2 minut)
3. fáze	- po chvíli se paramecia začnou zbarvovat modře a zpomalují svůj přímočarý pohyb (do 4 minut)
4. fáze	- vrtákovitý pohyb na místě (okolo 6. minuty) - zabarvení začíná být intenzivnější (sytěji jsou zabarveny organely, světleji cytoplazma), poměrně zřetelně jsou vidět „vystřílené“ trichocysty (obr. č. 12)
5. fáze	- všechna paramecia mrtvá (okolo 8. minuty) - přestává být patrný rozdíl ve zbarvení mezi organelami a cytoplazmou, podlouhlé úzké tělo se zaobluje (obr. č. 12)

TABULKA č. 9

Cibulová drť, paramecia stará 11 dní

	změny v chování paramecií, změny tvaru těla, doba přežití
čerstvá	- v prvních sekundách se paramecia rychle, neuspořádaně pohybují, ke změnám tvaru nedochází - po 2 minutách dochází ke zpomalení přímočarého pohybu, paramecia ztrácejí koordinaci - po 4 minutách pohyb velmi pomalý, vrtákovitý - po 6 minutách vrtákovitý pohyb na místě - po 8 minutách všechna paramecia mrtvá
ponechaná 60 minut volně na vzduchu	- v prvních sekundách se paramecia rychle, neuspořádaně pohybují, ke změnám tvaru nedochází - ve 3 minutách dochází k mírnému zpomalování pohybu, tvar těla se nemění - ani po 10 minutách nedohází k žádným dalším změnám, takto „vyčpělá“ cibule nemá výrazné toxické účinky

Obr. č. 1 Fotografování v mikroskopu pomocí mobilního telefonu

Obr. č. 2 Dokumentace vrtulovitého pohybu jednoho paramecia

Obr. č. 3 Trichocysty

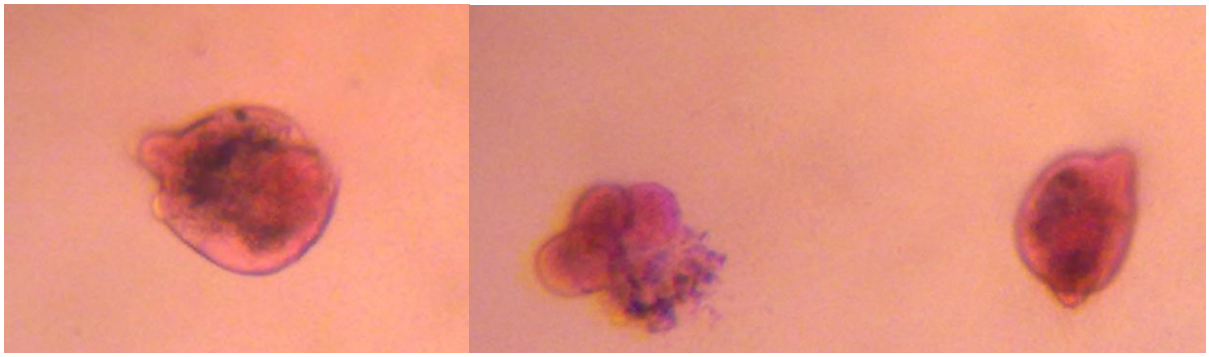
Obr. č. 4 Deformace tvaru těla

Obr. č. 5 Povrchové bublinovité útvary na parameciu

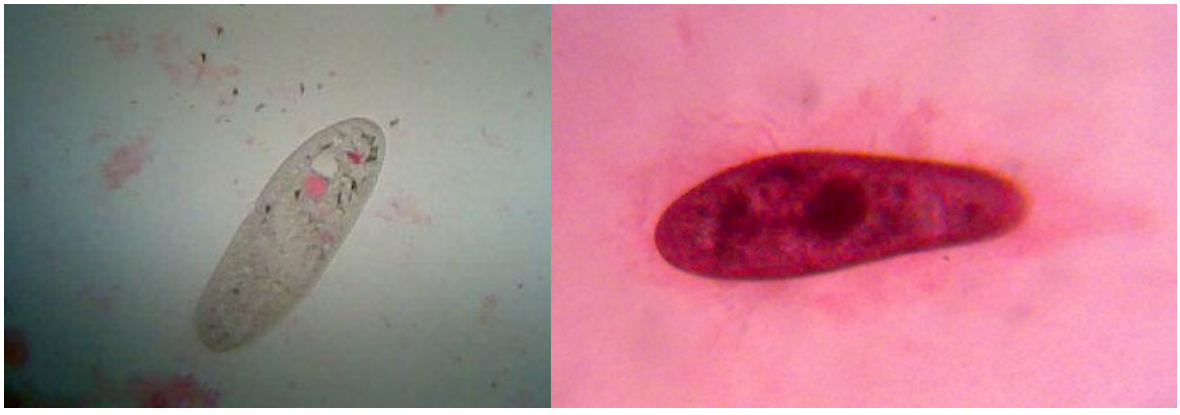
Obr. č. 6 Titanová běloba

Obr. č. 7 Formalín (kapkovitý tvar těla)

Obr. č. 8 Eozin (scvrknutí do malé kuličky, lýza buňky, citronovitý tvar těla)

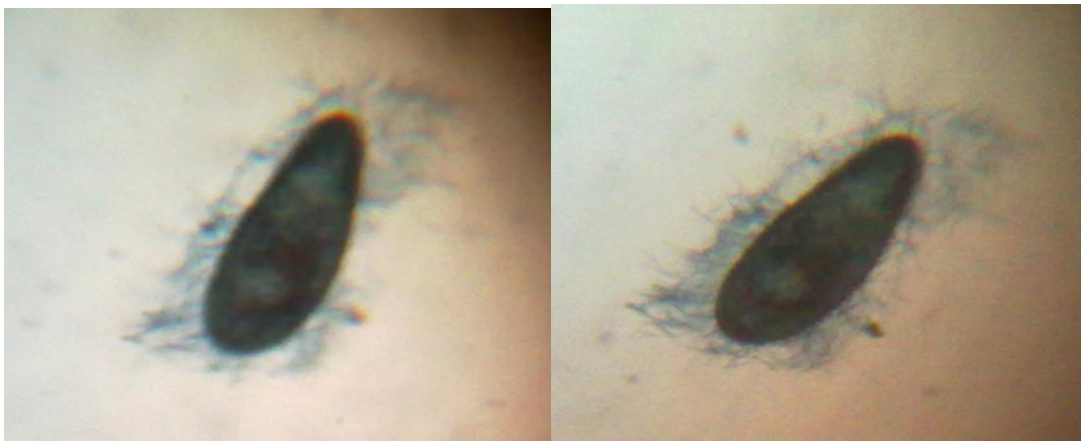


Obr. č. 9 Jádrová červeň (nižší a vyšší koncentrace)



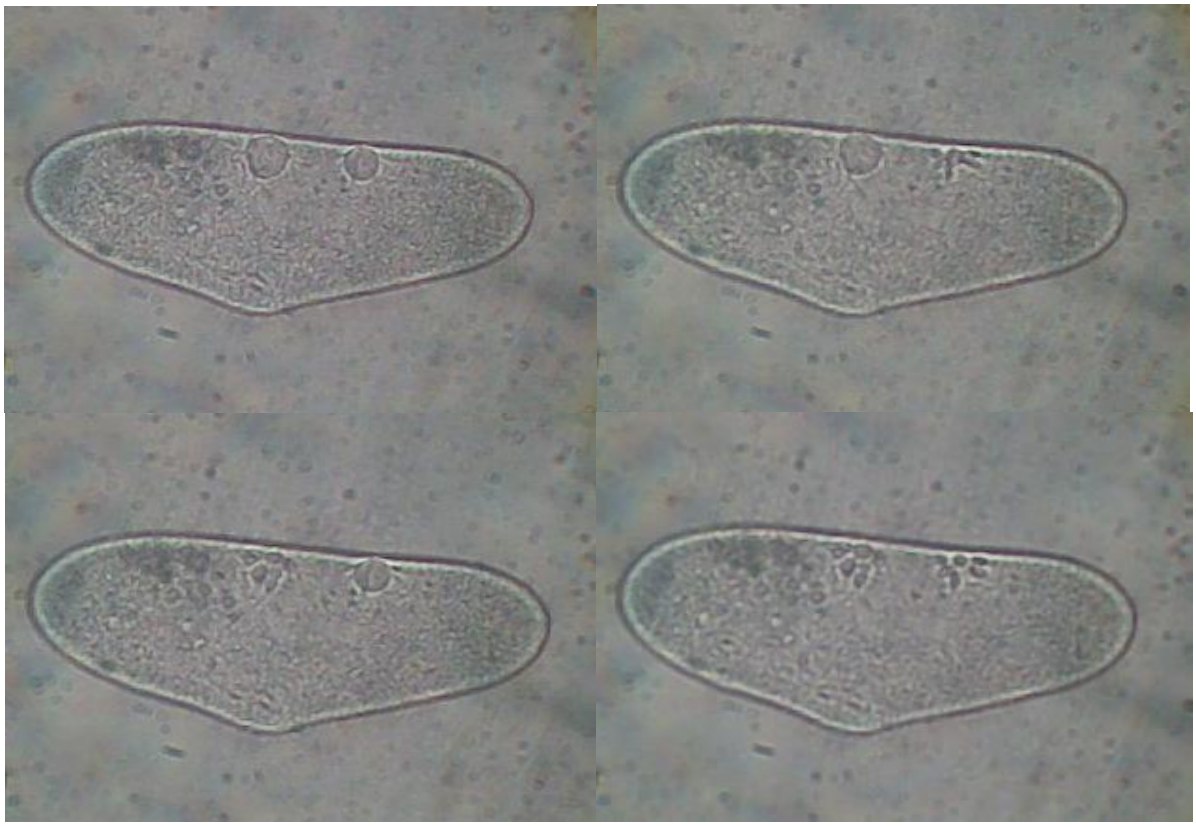
Obr. č. 10 Shlukování (Jádrová červeň)

Obr. č. 11 Janusiho zeleň



Obr. č. 12 Methylenová modř

Obr. č. 13 Pohyb kontraktilní vakuoly (slouží parameciím k vylučování přebytečné vody)



Obr. č. 14 Mikroskopický členovec přítomný v kultuře paramecií