

WARUNKI HODOWLI TASIEMCÓW Z RZĘDU *PSEUDOPHYLLIDEA* *IN VITRO*

BARBARA MACHNICKA-ROGUSKA

Zakład Parazytologii PAN, Warszawa

Hodowla pasożytów *in vitro* nasuwa szereg problemów natury biologicznej i technicznej. Największe trudności są związane z rekonstrukcją *in vitro* warunków, które określona forma pasożyta posiada *in vivo*. Jest to cały zespół czynników fizyko-chemicznych, jak pH, lepkość, stężenie tlenu, temperatura, ciśnienie osmotyczne. Warunki hodowli *in vitro* muszą zapewnić nie tylko przeżywanie formy pasożyta, ale również jego dynamiczny rozwój, wyrażający się we wzroście masy ciała, różnicowaniu się tkanek i tworzeniu się prawidłowo funkcjonujących narządów. Normalny rozwój jest związany z odpowiednim doбором substancji odżywczych zaspokajających potrzeby pasożyta.

Utrzymanie stworzonych warunków fizyko-chemicznych i żywieniowych sztucznego podłoża łączy się ściśle z zachowaniem aseptyki hodowli — jałowością pożywki i jałowością wyjściowego materiału hodowlanego. Hodowlę *in vitro* dojrzałego pasożyta musi poprzedzić wyjałowienie zewnętrznych powłok, stadia larwalne muszą być pobierane w sposób jałowy od żywicieli pośrednich.

Istotne jest również stworzenie warunków, które by pozwoliły na usuwanie produktów przemiany materii z otoczenia hodowanego pasożyta, a więc częste zmienianie podłoża oraz zapewnienie stałej wymiany tegoż podłoża wokół pasożyta.

W końcu sprawą najbardziej zasadniczą jest dokładne poznanie rozwoju pasożyta *in vivo*, celem stworzenia mu podobnych warunków *in vitro*, a także uzyskanie kryteriów porównawczych dla prawidłowego rozwoju hodowli *in vitro*. W przypadku hodowli dojrzałych pasożytów najważniejszą sprawą jest zachowanie procesów fizjologicznych, przede wszystkim związanych z rozmnażaniem. Przy hodowli postaci larwalnej ostatecznym kryterium jest uzyskanie dojrzałości płciowej. Wówczas

gdy hodowlę rozpoczyna się od jajeczek, sprawdzianem doboru odpowiednich warunków jest uzyskanie dużego procentu żywotnych koracidów.

Pierwsze pomyslnie wyniki w hodowli *in vitro* uzyskał J. D. Smith hodując plerocerkoid tasiemca *Schistocephalus solidus* do postaci dojrzalej. Larwa *Schistocephalus solidus*, bytująca w jamie ciała żywiciela pośredniego — ryby *Gasterosteus aculeatus*, cechuje się tym, iż u żywiciela ostatecznego — ptaka, dojrzałość płciową osiąga w ciągu 36 godzin. Proces dojrzewania nie jest połączony ze wzrostem ciała oraz pobieraniem z zewnątrz substancji odżywczych. Jałowo pobrane z jamy ciała ryb plerocerkoidy wkładano do rurki z błony półprzepuszczalnej zagiętej w kształcie litery „U“, a umieszczonej w naczyniu szklanym (duża probówka) zawierającym płynne podłoże. Podłoże to stanowiła surowica końska, działająca jednocześnie jako silny bufor o $\text{pH} > 7$. Całość utrzymywano w temperaturze 40°C (zbliżona do temperatury ciała ptaka — ostatecznego żywiciela), stale wstrząsając celem zapewnienia wymiany środowiska pomiędzy okolicą ciała pasożyta a dalszymi partiami naczynia. Po 72 godzinach hodowli plerocerkoidu *in vitro* obserwowano ukazywanie się na dnie rurki jajeczek, co świadczyło o osiągnięciu przez pasożyta dojrzałości płciowej. Jajeczka w 77% były zapłodnione. Jak wykazały kolejne próby hodowli *in vitro* plerocerkoidu do postaci dojrzalej, na proces zapłodnienia jajeczek posiada decydujący wpływ użycie rurki z błony półprzepuszczalnej imitującej jelito. Hodowanie swobodne plerocerkoidów w naczyniu powodowało zwijanie się ich, zaginanie i jako następstwo martwicę zagiętych fragmentów ciała, a ponadto uzyskane jajeczka były jedynie w 5% zapłodnione. Rurka z błony półprzepuszczalnej eliminuje niepożądane zjawisko zwijania się pasożyta, a ponadto stanowi widocznie niezbędne oparcie dla niego, umożliwiające proces zapłodnienia pomiędzy członami.

Formowanie się skorupki jajeczek powinno przebiegać w warunkach beztlenowych. Stężenie tlenu uzyskane w naczyniu zawierającym słup pożywki około 12-15 cm okazało się wystarczająco niskie, aby zapewnić prawidłowe formowanie się jajeczek. Uzyskane w opisany sposób jajeczka *Schistocephalus solidus* wyciągano za pomocą jałowej pipety z rurki imitującej jelito, przemywano kilkakrotnie przez wstrząsanie w wodzie destylowanej. Następnie umieszczano znów w podobnej rurce z błony półprzepuszczalnej, tym razem wstawionej do kąpielii wodnej o temp. $+25^{\circ}\text{C}$ — poruszanej stale za pomocą mieszadła. Ośmiodniowe przetrzymywanie w zaciemnieniu w opisanych warunkach powodowało embrionicowanie jajeczek. Kilkugodzinne wystawienie hodowli na intensywne światło słoneczne prowadziło do wylęgania się koracidów. To zjawisko wyjaśniło fakt znaczenia światła jako czynnika aktywowującego

enzym rozpuszczający spoinę wieczka jajeczkowego. Zastosowanie do hodowli jajeczek temp. $+25^{\circ}\text{C}$ odbiegało znacznie od tej temperatury, w której znajdują się *in vivo* — $+6 - +15^{\circ}\text{C}$, jednak pozwoliło na znaczne przyspieszenie procesu embrionowania, który w warunkach naturalnych trwa około 3 tygodni.

Kontynuacja hodowli koracidiów do procerkoidów w warunkach *in vitro* imitujących środowisko jamy ciała widłonoga nie przyniosła zadowalających rezultatów. Koracidia obumierały po 2-3 godzinach.

Podział ontogenezy tasiemców na szereg kolejno po sobie następujących stadiów:

- 0) niezróżnicowanej larwy,
- 1) namnażania komórek,
- 2) segmentacji,
- 3) organogenezy,
- 4) wczesnej gametogenezy,
- 5) późnej gametogenezy,
- 6) formowania się gruczołów żółtnikowych i skorupki jajeczek,
- 7) składania jajeczek

pozwała na stwierdzenie, iż uzyskiwane plerocerkoidy *Schistocephalus solidus* od żywiciela pośredniego — ryby — znajdują się w stadium wczesnej gametogenezy. W przeciwieństwie do tego przedstawiciela podrodziny *Lingulinae* plerocerkoidy przedstawicieli podrodziny *Diphyllobothrinae* są znacznie słabiej rozwinięte — znajdują się w stadium niezróżnicowanej larwy. Stąd, o ile hodowla plerocerkoidu do postaci dojrzałej *Schistocephalus solidus* ograniczała się jedynie do zapewnienia odpowiednich warunków fizyko-chemicznych, o tyle hodowla plerocerkoidu *Diphyllobothrium dendriticum* wymaga doboru składników odżywczych, które zapewniłyby dostateczny wzrost somatyczny oraz prawidłowe formowanie się narządów.

Do hodowli *in vitro* wybrano *Diphyllobothrium dendriticum* ze względu na stosunkowo niewielkie rozmiary tego tasiemca, a także z uwagi na fakt posiadania żywiciela zastępczego — szczura laboratoryjnego. Zarażenie szczurów plerocerkoidami *D. dendriticum*, a następnie zabijanie ich w krótkich odstępach czasu pozwoliło na dokładne prześledzenie kolejnych etapów rozwoju pasożyta, aż do całkowitej dojrzałości, którą osiągnął po 7 dniach bytowania w jelicie szczura. W ten sposób spre-cyzowano kryteria morfologiczne, cytologiczne i histochemiczne dla prawidłowego rozwoju *D. dendriticum* od plerocerkoidu do postaci dojrzałej. Kryteria te pozwalały na stwierdzenie po 24 godzinach hodowli *in vitro*, czy zastosowane warunki są odpowiednie dla pasożyta, czy zapewniają postęp w jego rozwoju.

Początkowo usiłowano prowadzić *in vitro* hodowlę całych plerocerkoidów, stosując jako podłoże surowicę końską lub ekstrakty tkankowe. Te pożywki pozwalały jedynie na rozwój plerocerkoidów do pierwszego stadium — namnażania komórek — po czym rozwój ulegał zahamowaniu, następowała degeneracja komórkowa i wegetacja materiału do kilku lub kilkunastu dni. Hodowla plerocerkoidów w woreczku żółtkowym lub w worku omoczniovym zarodka kurzego albo kaczego przyniosła pewien postęp, doprowadzając do stadium drugiego — segmentacji. Zastosowanie pożywki składającej się z ekstraktu zarodka kaczego wraz z surowicą, monosacharydami i hydrolizatami białkowymi pozwoliło na rozwój *D. dendriticum* do stadium trzeciego — organogenezy — po czym następowało zahamowanie postępu w tworzeniu się narządów, natomiast pojawiały się komplikacje w postaci zwijania się strobili i obumierania zagiętych fragmentów. Poprawianie strony technicznej hodowli przez wprowadzenie rurki z błony półprzepuszczalnej, zwiększanie lepkości podłoża nie przyniosły poprawy tego stanu. Dopiero znaczny postęp dało zastosowanie do hodowli zamiast całego plerocerkoidu wycinka plerocerkoidu o długości około 2 mm, pochodzącego z tylnej części jego ciała. Wycinki hodowano w butelkach Carrela, w temp. 40°C, wstrząsając je około 100 razy na minutę. Podłoże hodowlane stanowił już wymieniony ekstrakt z embrionu kaczego wraz z dodatkami uzupełniającymi w ilości około 20 ml, zmieniany co 24, 48 lub 72 godziny. Ta metoda hodowli początkowo pozwoliła również tylko na doprowadzenie plerocerkoidów do stadium organogenezy. Dopiero zastosowanie dwukrotnie większej ilości składników odżywczych na jednostkę objętości pożywki spowodowało osiągnięcie po 6 dniach hodowli stadium późnej gametogenezy. Otrzymane z hodowli *in vitro* człony *D. dendriticum* miały wielkość $1/5 - 1/10$ członu tego tasiemca wyhodowanego u szczura laboratoryjnego. Posiadały one normalnie rozwinięte jajniki, macicę, jądra, prącie i plemniki, brak było natomiast zawiązków gruczołów żółtnikowych. Po dojściu do stadium późnej gametogenezy następowało zahamowanie rozwoju, a w 7 dniu dochodziło do autolizy wyhodowanych fragmentów. Można przypuszczać, iż podłoże wykazywało braki koniecznych substancji odżywczych nie tylko w sensie ilościowym — karłowatość członów — ale także w składzie jakościowym. Dowodem tego jest brak tworzenia gruczołów żółtnikowych, których rozwój połączony jest z intensywną syntezą białkową. Wzbogacanie podłoża w różne składniki odżywcze nie pozwoliło jednak na przekroczenie „progu“ formowania gruczołów żółtnikowych i materiału skorupkotwórczego. Samorzutną autolizę w 7 dniu hodowli plerocerkoidu *D. dendriticum* można tłumaczyć jako wyraz dążności pasożyta do zaspokożenia we własnym zakresie deficytu substancji odżywczych.

Zastosowane kryteria cytologiczne, histologiczne i histochemiczne po-

zwolniły na określenie każdego stadium rozwojowego *D. dendriticum* oraz na skontrolowanie jego prawidłowości.

W stadium namnażania komórek podstawowym kryterium było porównawcze liczenie wrzecion mitotycznych materiału uzyskanego z hodowli *in vitro* i materiału rozwijającego się *in vivo*, po jednakowym okresie inkubacji w kolchicynie. Materiał hodowany *in vitro* powinien mieć w polu widzenia w przybliżeniu podobną ilość wrzecion mitotycznych jak materiał uzyskany *in vivo*, mniejsza ilość wrzecion mitotycznych świadczyła o zakłóceniach w namnażaniu komórek.

W stadium segmentacji posługiwano się bezpośrednią obserwacją lub obserwacją skrawków histologicznych barwionych acetoorceiną. Obecność uformowanych narządów — macicy i zawiązków jąder — w materiale żywym lub skrawkach histologicznych dawała miarodajną informację o prawidłowym przebiegu stadium organogenezy. Stadium wczesnej gametogenezy charakteryzowało pojawienie się w obrazie histologicznym komórek spermatycznych o wydłużonych jądrach, układających się w rozety. Dla stadium późnej gametogenezy było znamienne pojawienie się plemników. Okres formowania się gruczołów żółtnikowych i materiału skorupkotwórczego w gruczołach żółtnikowych — kompleksów fenolowo-białkowych — mógł być precyzowany metodami histochemicznymi: za pomocą próby dwuazowej lub próby inkubowania w katecholu. Obie te metody są oparte na reakcji odczynników z fenolem gruczołów żółtnikowych lub materiału skorupkotwórczego. Prawidłowy stan wyprodukowanych przez *D. dendriticum* jajeczek może być sprawdzany biologicznie drogą hodowli do uzyskania koracidiów lub również za pomocą próby katecholowej, ewentualnie dwuazowej z otoczką jajeczek.

Dotychczas publikowana literatura dysponuje stosunkowo niewielką ilością w pełni opracowanych pozycji na temat hodowli pasożytów *in vitro*. Hodowla zarówno tasiemców, jak i przywr wskazuje na obecność dwóch zasadniczych linii: 1. hodowla dojrzałych pasożytów przez jak najdłuższy okres czasu, 2. hodowla form larwalnych do dojrzałości płciowej. Potrzeby hodowli pasożytów *in vitro* były dużym bodźcem do poznania ich fizjologii *in vivo*. Doskonalenie techniki hodowli *in vitro* przyczyniło się do głębszego poznania ontogenezy pasożytów, do sprecyzowania kryteriów cytologicznych, histologicznych i histochemicznych. Kryteria te stały się obiektywną podstawą oceny wyników hodowli, a ponadto rzuciły światło na związek pomiędzy pasożytem a żywicielem. Pozwoliły częściowo ocenić wkład żywiciela w rozwój organizmu pasożytującego, chociaż zapotrzebowanie na produkty odżywcze pasożyta w hodowli *in vitro*, jak dotąd, zostało określone jedynie empirycznie, bez dokładnego sprecyzowania rodzajów składników pokarmowych, jak poszczególne aminokwasy, określone cukry itp. Wydaje się, że dalsze próby hodowli *in*

vitro powinny powoli wypełniać tę lukę. Jak wskazują obserwacje fauny pasożytniczej, jest ona w dużym stopniu uzależniona od wieku, kondycji i stanu fizjologicznego żywiciela. Dlatego też wydaje się, że pasożyt hodowany *in vitro* może być przydatnym modelem do badania czynników, mogących mieć wpływ na jego rozwój, a decydujących o stanie fizjologicznym żywiciela, a więc hormonów, witamin i substancji śladowych.

Otrzymano 24 II 1961

Adres autora:
Warszawa, Pasteura 3

LITERATURA

1. Bell, E. J., Smyth, J. D.: Cytological and histochemical criteria for evaluating development of *Trematodes* and Pseudophyllidean *Cestodes* *in vivo* and *in vitro*. — *Parasitology*, 48, 1, 2, 1958.
2. Smyth J. D.: Problems relating to the *in vitro* cultivation of Pseudophyllidean *Cestodes* from egg to adult. — *Revista Iberica de Parasitologia*, Tomo Extraordinario, Marzo, 1958.
3. Smyth J. D.: Cultivation and development of larval Cestode Fragments *in vitro*. — *Nature*, 181, 1958.
4. Smyth J. D.: Maturation of larval Pseudophyllidean *Cestodes* and strigeid *Trematodes* under axenic conditions; the significance of nutritional levels in Platyhelminth development. — *Annals of the New York Academy of Sciences*, 77, 1959.

CONDITIONS OF PSEUDOPHYLLIDEA TAPEWORM CULTIVATION IN VITRO

B. MACHNICKA-ROGUSKA

The review covers previous publications of Smyth dealing with cultivation of larval Cestode *in vitro*. Plerocercoides were rearing in axenic conditions *in vitro* and obtained after 72 hours a mature form of *Schistocephalus solidus*. The plerocercoids were kept in a tube made of half permeable membrane which was placed in a vessel with fluent medium — horse serum; above vessel was heated to a temperature of 40° C being all the time shaken. The rearing of the coracides, out of *Schistocephalus solidus* ova obtained *in vitro*, proceeded in water with a temperature of 25° C. The incubation of the coracides took place after 8 days. When the culture was treated with sun rays for several hours the process of the ova operculi opening was accelerated.

The best results in cultivating plerocercoids *Diphyllobothrium dendriticum* *in vitro* up to a mature form was obtained on a medium containing an extract of duck embryo together with serum, monosaccharides and albuminous hydrolysates. The plerocercoids after 6 days of breeding attained the stadium of late gametogenesis and showed a defective somatic development. Any enrichment of the medium in nutritive substances failed to evoke further progress in the plerocercoids development — viz. formation of vitellous glands.

In order to check whether the methods chosen for the development of tapeworms reared *in vitro* have been correct, cytologic, histological and histochemical tests have been performed. Cultivation *in vitro* is a contribution to the better understanding of relations and dependency existing between the parasite and its host.