

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Farmacie

Autor: Veronika Závěská

Vedoucí práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Studium *in vivo* toxicity vybraných sloučenin s využitím bezobratlého modelu *Galleria mellonella*

**Cíl práce:** Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv hmotnosti larvy, respektive jejího vývojového stadia, na konečné výsledky po podání vybrané dávky DMSO. V experimentální práci byl toxický dopad DMSO na larvy hodnocen nejen z pohledu mortality. Velká pozornost byla věnována i charakteristickým znakům, které jsou v průběhu testů na larvách *Galleria mellonella* běžně pozorovány, jako stupeň melanizace, dopad na aktivitu a formování zámotku.

**Metody:** Pro jednotlivé experimenty byly na základě hmotnosti vytvořeny tři testované skupiny, vždy po šesti jedincích, jedna skupina larev s váhou  $250 \pm 10$  mg, druhá skupina s váhou  $350 \pm 15$  mg a třetí skupina o váze  $450 \pm 15$  mg. Pomocí Hamiltonovy stříkačky byl do každé larvy administrován objem  $10 \mu\text{l}$  testovacího roztoku o příslušné koncentraci DMSO přímo do haemocoelu přes poslední levou panožku. Administrována byla čtyři množství DMSO:  $12,751$  g DMSO/kg váhy larvy;  $15,714$  g DMSO/kg;  $18,850$  g DMSO/kg;  $22,0$  g DMSO/kg. Zahrnuty byly i dvě kontrolní skupiny, také vždy po šesti jedincích. Stejným způsobem bylo první kontrolní skupině aplikováno po  $10 \mu\text{l}$  čistého PBS a druhá skupina larev byla tvořena zástupci, kteří nebyli podrobeni jakékoliv injekční administraci. Následně byly všechny larvy vedené v experimentech (v celkovém počtu 108) inkubovány v termostatu v Petriho miskách při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Po dobu 168 hodin (vždy po 24, 48, 96 a 168 hodinách od podání) byla pro jednotlivé larvy hodnocena kritéria, pomocí kterých byl určeno skóre „zdraví“, v rámci hodnocení HISS (bodovací systém pro hodnocení viability larev). Smrt byla definována jako úplná ztráta pohyblivosti, včetně stavu bez pohybu po stimulaci pomocí plastové špičky.

**Výsledky:** Larvy váhové kategorie  $350 \pm 15$  mg vykazovaly nejvyšší míru přežití, dokonce i při vyšších administrovaných dávkách DMSO. Jedinci kategorie  $250 \pm 10$  mg byli vůči kategorii  $350 \pm 15$  mg méně odolné, avšak odolnější než larvy v kategorii  $450 \pm 15$  mg. Zjevně, skupina  $450 \pm 15$  mg vykazuje ve srovnání s ostatními váhovými kategoriemi nejmenší míru schopnosti přežití po expozici látkou DMSO. Intrahaemocoelická administrace by se dala považovat analogickou k intravenózní administraci u obratlovců. U obojího se jedná o administraci noxy do tělní tekutiny oběhové soustavy živočicha. Avšak, při porovnání všech tří hodnot  $\text{LD}_{50}$  po 24 hodinách pro larvy *G. mellonella* s hodnotami akutní toxicity (vyjádřené jako  $\text{LD}_{50}$  [g/kg], též po 24 hodinách), které jsou uvedené pro tři různé způsoby administrace vybraným

modelovým zvířatům, je možné si povšimnout jiného směru. Hodnoty LD<sub>50</sub> larev *G. mellonella* po intrahaemocoelové administraci byly bližší hodnotám LD<sub>50</sub> po perorální administraci DMSO vybraným živočichům.

**Závěr:** Využití larev *G. mellonella* jako modelového organismu přináší řadu výhod. Celá studie může být provedena i při nízkém finančním rozpočtu. Mimoto larvy *G. mellonella* jako živočišný model mají relativně univerzální použití a hodí se na mnoho různých typů studií. Jejich nespecifická složka imunity se až překvapivě podobá v řadě ohledech té savčí. Vůči nim se však *G. mellonella* nachází na nižší vývojové úrovni, díky čemuž dosud není pro jejich použití v experimentech potřebné schválení etickou komisí. Váhová kategorie larev 350 ± 15 mg se jevila jako nejodolnější, a to nezávisle na administrované dávce. Nejsenzitivnější však byla váhová kategorie 450 ± 15 mg. Což podporuje aplikaci larev této hmotnosti do toxikologického screeningu, kdy je spíše přínosnější se ve studiích ztotožnit s falešně pozitivní výsledky než s falešně negativními. Tento přístup lépe umožní do následných experimentů pro studium toxicity na jiných modelových organismech vymezit se toxickým látkám, které by zvířatům mohla zbytečně způsobit značné utrpení až smrt. Mimoto, pro předběžné studie není žádoucí zahrnovat hodně testovacích zvířat, musí se nahlížet na systém principů „Tří R“. Pro toxikologický screening stačí i méně početné skupiny, od kterých je snaha získat co možná nejvíce dat. Proto byl pro tyto experimenty, kde jednu skupinu tvořilo pokaždé šest jedinců, zaveden skórovací systém HISS, díky čemuž bylo získáno více informací o toxickém vlivu DMSO na testovací subjekty. Hodnocení pomocí systému HISS se osvědčil jako velmi šikovný nástroj, se kterým výstupy z experimentů mohou získat zcela jiný, přínosnější rozměr. Kromě mortalitních dat byly získány i komplexnější poznatky o vlivu noxy na organismus larev. Zavedení toho systému umožňuje získat mnohem racionálnější úhel pohledu na to, zda má být daná látka podrobena dalšímu pokročilému studiu toxického vlivu na vyšších organismech.

**Klíčová slova:** *Galleria mellonella*, *in vivo* toxicita, administrace léčiva, GM Health Index Scoring Systém, dimethylsulfoxid, principy „Tří R“, LD<sub>50</sub>, toxikologický screening, preklinické testování, redukce