

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium *in vivo* toxicity vybraných sloučenin s využitím
bezobratlého modelu *Galleria mellonella***

Veronika Závěská

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce paní RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za její čas, vstřícný přístup, drahocenné rady či podnětné myšlenky, s jejichž pomocí vznikla tato práce.

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

V Hradci Králové

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 ± 10 mg, druhá skupina s váhou 350 ± 15 mg a třetí skupina o váze 450 ± 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°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 ± 15 mg vykazovaly nejvyšší míru přežití, dokonce i při vyšších administrovaných dávkách DMSO. Jedinci kategorie 250 ± 10 mg byli vůči kategorii 350 ± 15 mg méně odolné, avšak odolnější než larvy v kategorii 450 ± 15 mg. Zjevně, skupina 450 ± 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 LD_{50} po 24 hodinách pro larvy *G. mellonella* s hodnotami akutní toxicity (vyjádřené jako 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 LD₅₀ larev *G. mellonella* po intrahaemocoelové administraci byly bližší hodnotám LD₅₀ 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“, LD₅₀, toxikologický screening, preklinické testování, redukce

ABSTRACT

Charles university, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Pharmacy

Author: Veronika Závěská

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of thesis: Study of *in vivo* toxicity of selected compounds with the implementation of the invertebrate model *Galleria mellonella*

Background: The aim of this diploma thesis was to monitor the influence of the weight of the larvae, or rather its developmental stage, on the results after the administration of selected doses of DMSO. In the experimental work, the toxic impact of DMSO on larvae was evaluated not only from the point of view of mortality. Much attention was also paid to the characteristic features that are commonly observed during tests on *Galleria mellonella* larvae, such as the degree of melanization, the impact on activity and cocoon formation.

Methods: For individual experiments, three test groups of six individuals each were created based on weight, one group of larvae weighing 250 ± 10 mg, the second group weighing 350 ± 15 mg and the third group weighing 450 ± 15 mg. Using a Hamilton syringe, a volume of 10 μ l of the test solution with the appropriate concentration of DMSO was administered to each larva directly into the haemocoel through the last left proleg. The administered doses were: 12.751 g DMSO/kg larval weight; 15.714 g DMSO/kg; 18.850 g DMSO/kg; 22.0 g DMSO/kg larval weight). Two control groups were included. To the first control group has been administered 10 μ l of pure PBS, and the second group consisted of larvae without any administration. Subsequently, all larvae in the experiments (a total of 108 larvae) were incubated in a thermostat in Petri dishes at a temperature of 37°C. For a period of 168 hours (every time after 24, 48, 96 and 168 hours after administration), the criteria used to determine the "health" score were evaluated for individual larvae as part of the HISS (Health Index Scoring System) evaluation. Death was defined as complete loss of mobility.

Results: The larvae in the 350 ± 15 mg weight category showed the highest survival rates, even at the higher DMSO administered doses. The larvae in the 250 ± 10 mg category were less resistant to the 350 ± 15 mg category, but more resistant than larvae in the 450 ± 15 mg category. Apparently, the 450 ± 15 mg group shows the lowest survival rate after exposure to DMSO compared to other weight categories. Intrahaemocoelic administration could be considered analogous to intravenous administration in vertebrates. Both involve the administration of noxa into the body fluid of the animal's circulatory system. However, when comparing all three LD₅₀ values after 24 hours for *G. mellonella* larvae with acute toxicity values (expressed as LD₅₀ [g/kg], also after 24 hours) given for three different routes of administration to

selected model animals, it is possible notice a different direction. The LD₅₀ values of *G. mellonella* larvae after intrahaemocoelic administration were closer to the LD₅₀ values after peroral administration of DMSO to selected animals.

Conclusion: Employment of *G. mellonella* larvae as a model organism brings many advantages. The entire study can be carried out even with a low financial budget. In addition, *G. mellonella* larvae as an animal model are relatively versatile and suitable for many different types of studies. Their innate immunity is in many points of view surprisingly similar to mammal innate immunity. However, *G. mellonella* is at a lower developmental stage, which is why their use in experiments does not require any approval by the ethics committee. The larval weight category of 350 ± 15 mg appeared to be the most resistant, independently of the dose administered. However, the weight category 450 ± 15 mg was the most sensitive. Which supports the employment of larvae of this weight in toxicological screening when it is more beneficial to identify with false positive results than with false negative ones. This approach should enable to study toxicity on other model organisms to identify toxic substances that could in subsequent experiments unnecessarily cause significant suffering or even death to animals. In addition, for preliminary studies it is not desirable to include a lot of animals, the "Three Rs" system of principles must be observed. For toxicological screening, even smaller groups are appropriate, then the aim is to obtain as much data as possible. Therefore, the HISS scoring system was implemented for these experiments, therefore much more information was obtained about the toxic effect of DMSO on the test subjects. The HISS score system has proven to be very useful, and the obtained data could acquire a completely different and more worthwhile way of view. In addition to mortality data, more comprehensive information about the influence of noxa on larval health could be also obtained. The HISS gives us an opportunity to obtain a more rational point of view on toxicity of tested substances in order to further toxicological studies on higher level animals.

Keywords: *Galleria mellonella*, *in vivo* toxicity, drug administration, GM Health Index Scoring, dimethyl sulfoxide, The principles of 3 R's, LD₅₀, toxicological screening, preclinical trials, reduction

Obsah

Teoretická část	10
Úvod	10
1. Studium toxicity léčiv na zvířecích modelech	10
2. Směrnice a zásady OECD.....	11
3. Princip „Tří R“	12
4. Zavíječ voskový	12
4.1. Životní cyklus <i>Galleria mellonella</i> se zaměřením na larvální stádium.....	14
4.2. <i>Galleria mellonella</i> jako alternativa k běžným zvířecím modelům ve výzkumu léčiv	15
4.3. Potrava larev <i>Galleria mellonella</i>	19
4.4. Imunitní systém <i>Galleria mellonella</i>	19
4.4.1. Tělní bariéry	20
4.4.2. Buněčná imunitní odpověď	20
4.4.3. Humorální imunitní odpověď	21
4.4.4. Fenoloxidázová kaskáda	22
4.5. Hemolymfa a její buněčné komponenty	22
4.6. Tukové těleso	24
5. Dimethylsulfoxid	25
Experimentální část.....	26
6. Seznam pomůcek a materiálů	26
6.1. Pomůcky	26
6.2. Materiál	26
6.3. Přístrojové vybavení	26
7. Pracovní hypotéza:.....	26

8. Podmínky experimentů pro určení vlivu váhy larev <i>Galleria mellonella</i> v rámci studia toxicity <i>in vivo</i>	29
8.1. Odchov larev <i>Galleria mellonella</i>	29
8.2. Příprava testovacích roztoků DMSO	29
8.3. Postup experimentu	30
9. Výsledky	36
9.1. Zpracování a hodnocení získaných dat pomocí Kaplan-Meier křivek.....	36
9.2. Stanovení LD ₅₀ (median lethal dose, střední smrtelná dávka)	40
9.3. Medián přežití	45
9.4. Skórovací systém HISS (Health Index Score System)	52
9.4.1. Váhová kategorie 250 ± 10 mg	53
9.4.2. Váhová kategorie 350 ± 15 mg	60
9.4.3. Váhová kategorie 450 ± 15 mg	67
9.4.4. Vyhodnocení obou kontrolních skupin a stanovení skóre HISS	73
9.4.5. Průměrné hodnoty skóre HISS každé testovací skupiny.....	80
9.4.6. Samostatné hodnocení parametru HISS „formování zámotku“.....	84
10. Diskuse	89
Závěr.....	96
Seznam zkratk	98
Seznam grafů.....	99
Seznam tabulek.....	102
Seznam ilustrací	103
Použitá literatura.....	104

Teoretická část

Úvod

K zajištění bezpečné a účinné humánní terapie je nutné, aby nově vyvíjené léčivo prošlo postupně celou kaskádou testování (preklinické a klinické zkoušky). Nedílnou součástí tohoto procesu jsou i preklinické studie, kdy se pro hodnocení nových aktivních složek léčiv (API, active pharmaceutical ingredients) uplatňují i živé organismy. Díky tomu je možné získat cenná data o toxicitě API či o efektivitě API v rámci živého systému, tedy v systému *in vivo*. [1]

V současné době jsou v Evropské unii testy *in vivo* nových API stále obligátní. Nicméně nejen z etických důvodů se v současnosti klade značný důraz na hledání alternativních postupů, které redukuje využívání živočichů jako pokusných modelů. Navíc i ve vědě hrají velkou roli finance. Je všeobecně známo, že s využitím pokusných zvířat se pojí značné finanční náklady. Mimoto je práce zatížena rovněž administrativně. Uplatnění zvířat pro výzkumné účely se neobejde bez schválení příslušnou etickou komisí.

Proto řada výzkumníků vyvíjí nejen metody plně nahrazující živé tvory, ale někteří bádají i po alternativách ze světa živočichů, na nichž by byly pokusy eticky přijatelnější. Jsou hledány druhy nižších vývojových stupňů, které mají řadu podobností k savcím modelům, díky kterým poskytují adekvátně hodnotná data, a to s minimem finančních nákladů a bez nutnosti schvalování studií etickou komisí.

Jednou z potencionálních variant jsou právě larvy hmyzu *Galleria mellonella* (*G. mellonella*).

1. Studium toxicity léčiv na zvířecích modelech

Není pochyb o tom, že použití zvířat za účelem predikce toxicity pro člověka přispělo k nesčetnému množství významných pokroků v medicíně. I přes často diskutovanou etickou problematiku, aplikace zvířecích modelů k posouzení míry nebezpečí a rizika pro člověka jsou i nadále standardem ochrany lidského zdraví. [2]

Preklinické testování toxicity odhaluje u hodnocené nové účinné látky její druhově, orgánově či dávkově specifické toxické účinky. Toxicitu látek lze pozorovat mimo

jiné právě i expozicí *in vivo* na pokusných zvířatech. Preklinické testování toxicity pomáhá vypočítat nejvyšší koncentraci nebo množství látky, při kterém se u exponované populace neprojeví žádné zjizitelné nepříznivé účinky. Tyto studie jsou potřebné k zahájení klinického hodnocení hodnocených produktů. [3]

Toxicitou rozumíme schopnost látky poškozovat živý organismus. Závisí tedy nejen na fyzikálně–chemických vlastnostech látky, ale i způsobu vstupu látky do organismu, metabolismu látky, četnosti podání, dávce apod. V preklinických studiích se právě hodnotí míra rizikovosti testované látky. V rámci testů na toxicitu je zásadní kvantifikovat hranici, kdy už je daná látka pro vybraný organismus toxická. Na zvířecích modelech je mimo jiné běžné stanovovat hodnoty LD₅₀ (median lethal dose, střední smrtelná dávka). [4]

Podle délky podávání léku se preklinické studie toxicity dělí zpravidla na akutní toxicitu, subakutní toxicitu, subchronickou toxicitu a chronickou toxicitu. Ne všechny testy jsou zaměřeny jen na stanovení LD₅₀, řada toxikologických studií je zaměřena na specifitější otázky, jako je například cytotoxicita (schopnost poškozovat buňky), mutagenita (schopnost způsobit změny v genetickém materiálu), karcinogenita (schopnost způsobit rakovinu) a teratogenita (schopnost způsobovat vrozené vady u plodu). Prověřují se nejen efekty bezprostředně po jednorázové dávce, ale i po opakované administraci. [5]

Za posledních několik desetiletí vědci vyvinuli a zavedli standardizované protokoly pro testování k zajištění spolehlivých vědeckých metod k získávání vysoce kvalitních dat. Testy toxicity jsou navrženy tak, aby minimalizovaly rozptyl, zkreslení a potenciál pro falešně pozitivní a falešně negativní výsledky. [5]

2. Směrnice a zásady OECD

Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development) je mezinárodní organizace, ve které zástupci z ekonomicky a průmyslově nejvyspělejších zemí světa spolupracují na hledání řešení společných problémů, vyvíjení globálních standardů, sdílení zkušeností a vytváření osvědčených postupů. [6, 7]

V rámci své činnosti související s chemickou bezpečností vydala OECD několik rad, rozhodnutí a doporučení. Nejznámější z těchto publikací je Směrnice OECD pro testování

chemických látek. Jedná se o souhrn mezinárodně uznávaných standardních metod pro průmysl, akademickou sféru, státní správu a pro ty, kteří se podílejí na testování a hodnocení chemických látek. Navíc dochází k jejich průběžnému rozšiřování, revizi a aktualizaci, aby implementovala současné pokroky ve vědě a technice. [6]

Další, neméně důležitou směrnicí, je Směrnice OECD o zásadách správné laboratorní praxe (dále jen SLP). V nich je popisován proces všech činností související s preklinickými studiemi, nejen jejich provádění, ale například i postupy náležité dokumentace. Účelem SLP je podpořit získávání kvalitních údajů. Srovnatelnost dat je základem pro vzájemné uznávání údajů mezi jednotlivými zeměmi. Pokud jednotlivé země mohou spoléhat na údaje zjištěné v jiných zemích, je možno vyhnout se dvojímu zkoušení. [7, 8]

3. Princip „Tří R“

Už v roce 1959 byl publikován etický princip „Tří R“ jakožto součást knihy dvojice britských vědců, Russel a Burch, s názvem „The Principle of Humane Experimental Technique“. Zásady „Tří R“ se brzy staly nedílnou součástí SLP a zahrnují pojmy: Replacement, Reduction a Refinement. [9, 10]

Princip Replacement (česky: nahrazení) vede k preferování organismů nižších vývojových úrovní, u kterých se předpokládá nižší míra vnímání bolesti. Jedná se však pouze o relativní pojetí. Absolutní alternativou pokusných zvířat mohou být například jednotlivé orgány, frakcionované buňky, ale i čím dál populárnější matematické či 3D modely. Myšlenkou Reduction (česky: snížení počtu) je minimalizovat počet pokusných zvířat a snažit se maximalizovat množství získaných dat z experimentů. Nakonec, princip Refinement (česky: zjemnění) spočívá v hledání a aplikaci metod, během kterých budou pokusné subjekty co nejméně trpět, vnímat bolest apod. Navíc by se po celou dobu experimentů mělo zamezit vzniku nadměrného stresu u pokusných zvířat. [9, 10]

4. Zavíječ voskový

Zavíječ voskový (lat. *Galleria mellonella* L., řád Lepidoptera, čeleď Pyralidae) je drobný, nevhledný motýl, jenž je rozšířen téměř po celém světě. Jeho výskyt je vázaný specificky na místa, kde jsou včelí úly. Jedná se totiž o parazita včelstev. Larvy *G. mellonella* (*Galleria mellonella*) se totiž živí včelím voskem, základní stavební složkou

pláství úlů. Nicméně, zdravá silná včelstva jsou schopna se s případným napadením vypořádat. Avšak včelstva jsou často oslabována chorobami, chemickými postřiky plodin a řadou dalších vlivů [11, 12]. Běžně se vyskytují v opuštěných nebo prázdných úlech, dále v místech, kde se skladují včelí plástve či samotný vosk. Mimoto je lze nalézt i v hnízdech čmeláků či vos [13].

Navzdory špatné pověsti, bylo pro larvy *G. mellonella* nalezeno pozoruhodné uplatnění, a to nejen jako krmivo pro jiné druhy živočichů. Nesčetně výzkumných skupin si zvolilo právě larvy *G. mellonella* za jejich *in vivo* modelový organismus pro svou vědeckou činnost. Přineslo jim to totiž celou řadu výhod.

Pro začátek, leckoho osloví nízké pořizovací náklady či malé a skladné rozměry larev. Relativně snadno se s nimi manipuluje. Jsou v nesčetně ohledech velmi nenáročné, proto je lze chovat celoročně na umělé stravě. K odchovu není potřeba, tedy až na inkubátor, žádné speciální vybavení. Navíc se na jejich použití obecně nevztahují etická hlediska a není nutné žádat o schválení etické komise.



Obrázek 1: Dospělý jedinec (imago) na včelí plástvi. Zdroj: BioChemTech.eu [14].

4.1. Životní cyklus *Galleria mellonella* se zaměřením na larvální stádium

Životní cyklus zavíječe voskového se příliš neodlišuje od jiných druhů motýlů. Začíná vajíčkem, pokračuje larvou, která se následně zakuklí (Obrázek 2). Po reorganizaci tělních struktur se z kukly líhne imago (dospělý jedinec). U *G. mellonella* se jedná o přeměnu dokonalou, kdy se larva zcela nepodobá vylíhlému dospělému jedinci. [15-17]

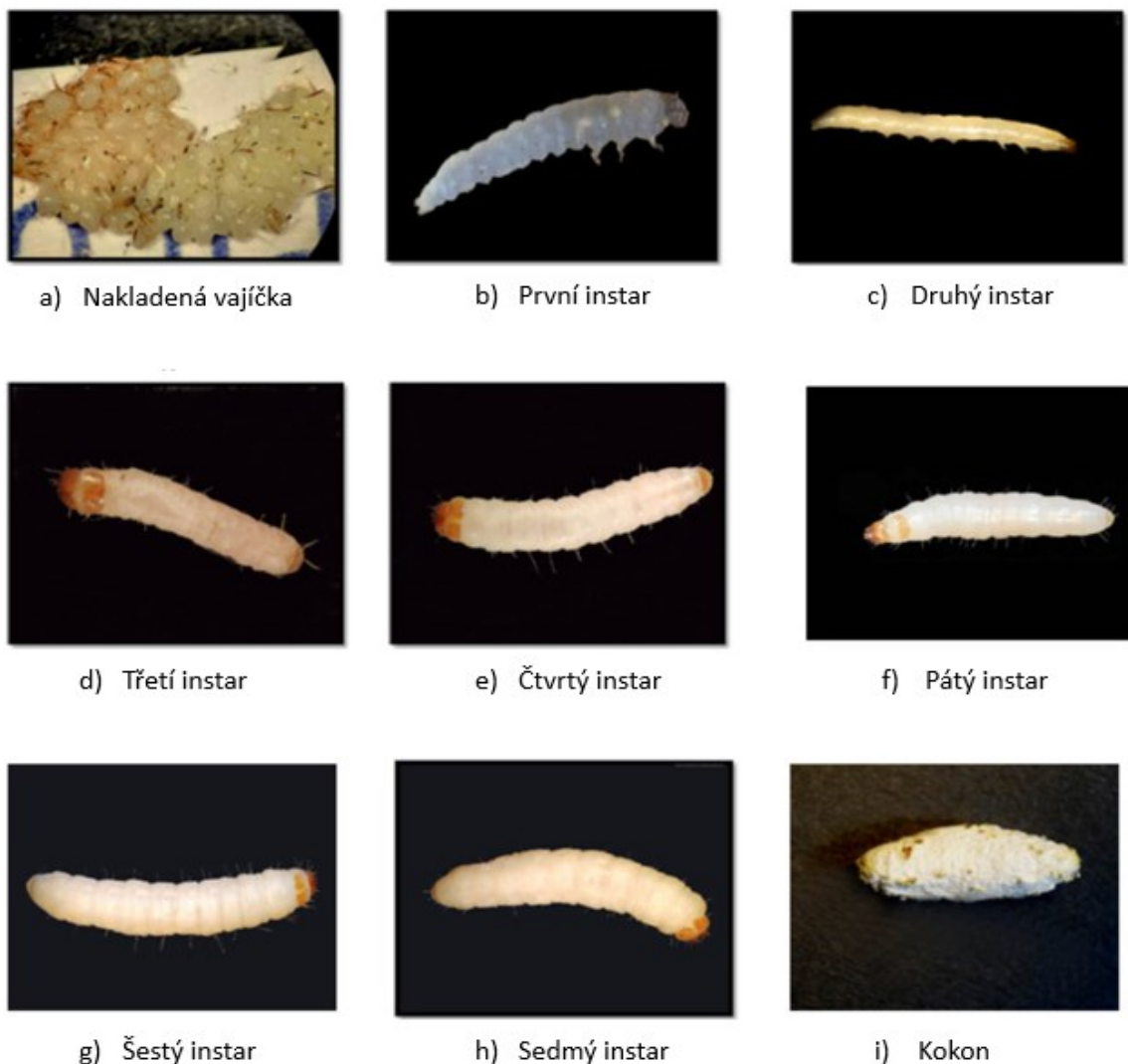


Obrázek 2: Vývojová stádia *G. mellonella*: vajíčka (1), přibližně deset dní stará larva (2), přibližně dvacet dní stará larva (3), dvacet pět až třicet pět dní stará larva (4 a 5), přibližně čtyřicet dní stará larva (poslední stádium larvy) (6), kokon a kukla (7 a 8), imago (9). Pro názornost použita ilustrace od Jorjão *et al.*, 2018 [16].

Délka celého životního cyklu je variabilní a odvíjí se zejména od podmínek vnějšího prostředí (zejména teploty a humidity). Pokud jsou ideální, *G. mellonella* může za příznivých projít kompletním životním cyklem za 8 až 12 týdnů [18].

Co se týče samotného larválního stadia *G. mellonella*, běžně se v odborné literatuře uvádí sedm instarů (Obrázek 3). Stejně jako u doby životního cyklu, tak i doba larválního stadia závisí na zajištěných podmínkách chovu. Mimoto se jedná o jedinou fázi života zavíječe voskového, kdy je schopen přijímat potravu. Larvy rostou velmi rychle. Za příznivých vnějších podmínek prostředí a při snadné dostupnosti potravy jsou larvy schopny po dobu prvních deseti dní od vylíhnutí denně zdvojnásobit svou velikost. [19–21]

Zavíječi jsou schopni překonat i méně příznivé podmínky, jako je nedostatek potravy. Larvy mají posléze sklony ke kanibalismu, kdy se slabší jedinci stanou potravou pro silnější jedince. Tato situace může nastat i v průběhu experimentů. Na konci sedmého instaru larva přestává přijímat potravu. Zároveň u těchto jedinců dochází k řadě metabolických změn. Pomocí snovacích žláz kolem sebe začne tvořit kokon, v němž se následně zakuklí, aby u ní proběhl proces metamorfózy. [16, 22]



Obrázek 3: Vybraná vývojová stadia *G. mellonella*: a) vajíčka krátce po naklazení, b) larva v prvním instaru, c) druhý instar, d) třetí instar, e) čtvrtý instar, f) pátý instar, g) šestý instar, h) sedmý instar, g) kokon. Převzato a upraveno z publikace od Desai *et al.*, 2019 [20].

4.2. *Galleria mellonella* jako alternativa k běžným zvířecím modelům ve výzkumu léčiv

Používání larev *G. mellonella* jako modelový organismus má řadu výhod. Výhoda tohoto druhu netkví jen v jeho univerzálním použití, ale i v jeho nízkých pořizovacích nákladech. Ve srovnání s cenou například potkanů či myší jde o zanedbatelné výdaje. [23]

Kromě nízké počáteční investice může nemálo výzkumníků oslovit i podobnost k nespecifické složce imunity savců [24]. Avšak vůči těmto obratlovcům se *G. mellonella* nachází na nižší vývojové úrovni, díky čemuž není dosud potřebné schválení experimentů a výzkumu s využitím hmyzích modelů etickou komisí.

Mezi další nezanedbatelné výhody lze zařadit i jednoduchý odchov, dostatečně velké rozměry pro intraperitoneální administraci, krátký reprodukční cyklus, možnost zařadit velký počet jedinců v rámci jednoho experimentu, aniž by to vyžadovalo větší nároky na prostor [23]. Do výčtu lze uvést i nižší spotřebu krmiva či použitých chemikálií.

Tabulka 1: Vybrané příklady výhod a limitací aplikací larev *G. mellonella* jako živočišného modelu ve studiích.

Výhody	Limitace
Živočich nižšího zoologického řádu. Analogie imunitního systému larev k vrozené imunitě savců	Živočichové vyšších řádu mohou vykazovat jiné výsledky
Malé rozměry, skladnost, nenáročný chov, krátký reprodukční cyklus, velký počet odchovaných jedinců	Vnitrodruhová predace
Nízké pořizovací a jiné finanční náklady	Larvy od komerčních dodavatelů nejsou zpravidla standardizované
Není potřeba administrativních kroků – schválení experimentů etickou komisí	V budoucnu může být nutné schvalování experimentů etickou komisí
Relativně velké larvy umožňují snadnou manipulaci; velký objem hemolymfy, velké tukové těleso	Vysoká tolerance larev k fenolickým sloučeninám (například: theaflaviny, epikatechiny) [25]
Možnost celoročního chovu, prospívání na umělé stravě, za konstantních podmínek. Dobře snáší teplotu i okolo 37 °C.	Parazit včelích úlů, nutná opatrnost při manipulaci, aby nedošlo k jejich úniku

Právě díky krátkému reprodukčnímu cyklu a snadnému odchovu lze v každém experimentu použít velký počet larev, což usnadňuje získání dostatečně relevantních farmakokinetických a farmakodynamických údajů. Navíc ve studii Thomas *et al.*, 2013 [26] tvrdí, že tato data mohou přímo korelovat s farmakokinetickými a farmakodynamickými údaji, které byly zjištěny u lidí. Nicméně Hill *et al.*, 2014 [27] uvádí, že farmakokinetické a farmakodynamické údaje získané od zvířecích modelů mají velkou variabilitu. Proto podle Hill *et al.*, 2014 [27] tato data nemají příliš přínosnou hodnotu.

I přesto je nutné dodat, že uplatnění velkého počtu jedinců v rámci experimentu je v rozporu s principy „Tří R“. Princip redukce totiž spočívá v používání co nejmenšího počtu zvířat pro výzkumné účely. [10]

Klasickými nesavčími modelovými organismy používanými pro biologický výzkum jsou například hlístice *Caenorhabditis elegans* [28] a ovocná muška *Drosophila melanogaster* [29]. Oproti nim mají larvy *G. mellonella* nesmírnou výhodu. I přesto, že jejich teplotní optimum je 28-30°C, jsou larvy *G. mellonella* schopné přežít i při teplotách lidského těla, tedy i při teplotě 37°C [30] (*Caenorhabditis elegans*: 15-25°C [28], *Drosophila melanogaster*: 11-32°C [29]). Četné studie potvrzují, že mikrobiální agens využívá obdobných mechanismů v rámci patogeneze a virulenčních faktorů jako u lidí či jiných obratlovců, například myši [31, 32]. Což je jeden z důvodů, proč jsou larvy *G. mellonella* vhodné pro studie patogeneze různých mikroorganismů.

Navíc imunitní systém larev *G. mellonella* je funkčně a strukturně značně podobný vrozenému imunitnímu systému savců. Tohoto poznatku lze pak rovněž využít například v rámci studií role složek nespecifické imunity při různých infekčních procesech. [17]

Tak jako jiné druhy hmyzu, ani larvy *G. mellonella* nedisponují klasickou adaptivní složkou imunity [17]. Nicméně, právě absence adaptivní složky imunitního systému se ve skutečnosti řadí mezi jednu z mnoha výhod, kterou *G. mellonella* výzkumníkům přináší. Tudíž je možné používat larvy *G. mellonella* jako modelový organismus ve studiích, kdy se zkoumají interakce mezi hostitelem a patogenem, schopnost patogenu vyvolat onemocnění, a to bez rušivé složky adaptivní imunity [33]. Vhodných modelových organismů pro tyto studie není mnoho.

V posledním vývojovém stádiu jsou larvy *G. mellonella* schopny běžně dosáhnout rozměrů délky okolo tří centimetrů. Díky této velikosti lze na nich relativně snadno provádět intraperitoneální administrace testovaných sloučenin. Z našich zkušeností víme, že složením diety lze dosáhnout i větších rozměrů. S takovými larvami se snáze manipuluje, což může zvýšit bezpečnost práce při injekční aplikaci testovaných substancí.

Tabulka 2: Porovnání *G. mellonella* s jinými experimentálními (nesavčími) modely na základě vybraných parametrů. Přeloženo a upraveno z Champion et al., 2018 [34]. *) upraveno ze zdroje Simões et al., 2021 [35].

Model	Celý organismus	Experimenty při 37 °C	Přesné dávkování	Imunitní systém	Požizovací cena
2D buněčné kultury (jednovrstevné)	ne	ano	ano	ne	střední
3D buněčné kultury	ne	ano	ano	ne	vysoká
<i>Caenorhabditis elegans</i> (hádátka obecné)	ano	ne	ne	ano	nízká
<i>Panagrellus redivivus</i> (hádátka živorodé)	ano	ano	ne	ano	nízká
<i>Danio rerio</i> (danio pruhované)	ano	ne	ano	ano	vysoká
<i>Drosophila melanogaster</i> (octomilka obecná)	ano	ne*	ne	ano	nízká
<i>Galleria mellonella</i> (zavíječ voskový)	ano	ano	ano	ano	nízká
<i>Manduca sexta</i> (lišaj tabákový)	ano	ano	ano	ano	nízká

4.3. Potrava larev *Galleria mellonella*

Jak bylo uvedeno výše, larvální stádium je jediná fáze života zavíječe voskového, kdy je schopen přijímat potravu.

Ve svém přirozeném prostředí se larvy po vylíhnutí začnou krmit přítomným voskem a postupně dochází k destrukci struktury pláství, resp. úlu. Larvy se dále živí medem, pylem, kokony či jinými částicemi, které ulpěly na povrchu pláství. Larvy *G. mellonella* mají navíc sklon ke kanibalismu, k jevu však u nich dochází zvláště v případě nedostatku potravy. [22, 36]

Od výše uvedených poznatků se odvíjí i složení krmiva chovaných zvířat.

Nejjednodušší variantou diety pro larvy *G. mellonella* je samotný včelí vosk. Sice je jim tak poskytována nejpřirozenější potrava, avšak samotný včelí vosk není zrovna nejlevnější surovinou na trhu. Larvy mohou být dlouhodobě udržovány na umělé stravě skládající se z medu, vosku a obilných produktů. Mimoto, vznikla i řada umělých diet, z nichž některé dokonce ani neobsahují včelí vosk, jako často uváděná dieta od Bronskill, 1961 [37] či od Jones *et al.*, 2002 [38]. Ani v umělé dietě od výzkumné skupiny Graham *et al.*, 2013 [39] nebyl použit včelí vosk. Pozoruhodná je však tím, že v jejím složení figuruje krmivo, granule, pro psy.

Složení umělé výživy v souhrnu může zásadně ovlivnit nejen růst, hmotnost či rychlost životního cyklu, ale i odolnost vůči cizorodým noxám [20]. Jorjão *et al.*, 2018 [16] prokázali, že složení stravy má významný vliv na imunitní systém larev *G. mellonella*. Podobným tématem se ve své práci zabývali Siva-Jothy & Thompson, 2002 [40]. Došli k závěru, že nedostatek potravy může snížit aktivitu imunitní odpovědi. Nicméně ve studii Krams *et al.*, 2015 [41] tvrdí, že naopak velmi vysokoenergetická strava sice může podpořit rychlý rozvoj tělesné hmotnosti, zato však může negativně ovlivnit imunitní systém larev.

4.4. Imunitní systém *Galleria mellonella*

Je všeobecně známo, že bezobratlí živočichové, *G. mellonella* nevyjímaje, postrádají imunitu získanou (adaptivní) a jsou tak zcela odkázaní na přirozenou (vrozenou) imunitu. I přesto je imunitní systém hmyzu schopen hrát klíčovou roli při udržování homeostázy a prevenci nemocí a infekcí. [42, 43]

Imunitní systém *G. mellonella* se skládá z tělních bariér, buněčných a humorálních mechanismů. Vrozené imunitní reakce jsou nespecifické, avšak jsou široce distribuovány po celém těle. Některé z projevů vrozené obrany schopnosti hmyzu, resp. *G. mellonella*, a savců jsou po funkční stránce až překvapivě analogické. [17]

4.4.1. Tělní bariéry

První překážku pro cizorodou noxu představuje vlastní povrch těla zavíječů voskových. Jejich exoskelet působí doslova jako bariéra bránící vstupu patogenů. Kutikula je zpevněná chitinem. Tento polysacharid se vyznačuje značnou pevností a nízkou hmotností, navíc je odolný vůči vodě i řadě chemických látek. Mimo chitinu se jejich kutikula skládá i z mnoha proteinů s antimikrobiálními vlastnostmi. [18]

Ani vnitřní struktury larev *G. mellonella* neposkytují příznivé podmínky pro patogeny. Uvnitř trachey je nízká vlhkost a celkově nedostatek živin pro případnou kolonizaci mikroorganismy. Kutikula není jediným místem, kde se chitin u larev vyskytuje. Přední i zadní část střeva je také vyztužená chitinem. Mimoto, biochemické podmínky ve střevě, jako je pH a trávicí enzymy, opět komplikují osídlení patogenními mikroorganismy. Zároveň vlastní mikrobiom larev se významně podílí na jejich obranyschopnosti. [17]

I přesto může dojít k překonání výše popisovaných anatomických bariér, kdy se následně aktivují sofistikovanější součásti imunity larev, buněčné a humorální imunitní odpovědi.

4.4.2. Buněčná imunitní odpověď

I přesto, že se složky buněčné a humorální imunity hmyzu popisují jako každá zvlášť, v organismus dochází k jejich vzájemnému překrývání. Mnoho humorálních působků ovlivňuje buněčnou imunitní odpověď, naopak řada součástí buněčné imunitní odpovědi je zdrojem některých humorálních molekul. [44]

Buněčná imunitní odpověď je u *G. mellonella* zprostředkována specializovanými buňkami hemolymfy, tedy plasmacyty, granulocyty a oenocytoidy. Nacházejí se volně v hemolymfě nebo jsou připojeny k vnitřním orgánům. Mezi mechanismy, které se uplatňují v rámci buněčné imunitní odpovědi patří: fagocytóza, enkapsulace a nodulace. [17, 44]

Fagocytóza je právě jedním z názorných příkladů analogie vrozené imunity hmyzu a savců. Dochází při ní k rozpoznání patogenního mikroorganismu haemocytem přímo interakcí jeho povrchových receptorů s molekulami patogenu nebo nepřímo, po opsonizaci patogenu působky (opsoniny) humorální složky imunity, čímž dojde ke zvýšení efektivity fagocytózy [45, 46]. Po pohlcení patogenu se pro jeho zničení uvnitř fagocytující buňky uplatňuje tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), ale i jiných vysoce reaktivní metabolitů, například oxidu dusnatého (NO) [47].

Pokud dojde k rozsáhlejšímu napadení patogeny, přestává fagocytóza dostačovat a je potřeba, aby určité haemocyty spolu začaly kooperovat [48]. U druhu *G. mellonella* byly popsány dva takové mechanismy, a to nodulace a enkapsulace [17].

Při nodulaci dochází v hemolymfě k agregaci volně cirkulujících hemocytů. Okolo patogenních mikroorganismů se začnou shlukovat hemocyty, čímž se kolem něho vytvoří kulovité těleso tvořené vrstvou buněk, kde jsou patogeny uzavřeny. Patogeny se následně nemohou šířit dál v organismu. Nemusí se vždy jednat jen o mikroorganismy, nodulaci podléhá i jiný cizorodý materiál podobné velikosti. [17, 48]

Enkapsulace je relativně obdobný proces jako nodulace. I zde je cizorodý materiál oddělen od vnitřního prostředí agregovanými haemocyty a poté vystaven cytotoxickým působkům haemocytů. Enkapsulace se nicméně uplatňuje na větších cílech, jako jsou prvoci, hlístice a vajíčka či larvy parazitického hmyzu v hemolymfě, ale i nebiogenní látky (sklo, umělá hmota, latex). [50, 51]

Posléze u obou mechanismů, jak při nodulaci, tak enkapsulaci, dochází v okolí ke zvýšení množství haemocytů s enzymatickou aktivitou [51]. Nejčastěji dochází k melanizaci vytvořených mnohobuněčných shluků působením fenoloxidázy. Tudíž se zde uplatňuje humorální složka imunitní odpovědi. [44, 48]

4.4.3. Humorální imunitní odpověď

Jak již bylo zmíněno výše, buněčná a humorální imunitní odpověď často bývají na sebe navazující procesy.

Nicméně, humorální odpověď zajišťují zejména speciální buňky hemolymfy, které jsou schopné vytvářet a uvolňovat do hemolymfy humorální působky imunity, například opsoniny, antimikrobiální peptidy (AMP), melanin, extracelulární nukleové kyseliny či

produkty proteolytických kaskád (koagulační, fenoloxidázová), které imobilizují nebo zabíjejí patogenní mikroorganismus. [31, 52, 53]

Pro účely této práce bude blíže popsána pouze jedna proteolytická kaskáda, a to fenoloxidázová.

4.4.4. Fenoloxidázová kaskáda

Aktivace hmyzí fenoloxidázové kaskády je svými principy analogická ke komplementovému systému savců. Fenoloxidáza (PO), nazývaná též tyrosináza, je enzym, jenž oxiduje fenolické látky na chinony, které následně polymerizují až na melanin. PO je v hemolymfě přítomna nepřetržitě, a to ve své neaktivní formě jako proenzym (zymogen) zvaný profenoloxidáza (proPO). Proto je možné se setkat i s označením profenoloxidázová kaskáda. U larev *G. mellonella* je proPO syntetizována v buňkách hemolymfy zvaných granulocyty a oenocytoidy. Pomocí proteolytických enzymů dochází k přeměně neaktivní profenoloxidázy (proPO) na její aktivní formu. [53, 54]

Tuto imunitní reakci, zvanou melanizace, tedy doprovází tvorba hnědého až černého pigmentu, který se hromadí uvnitř larvy. Ze začátku se povrch larvální kutikuly pokryje několika černými skvrnami, avšak spolu s progredující infekcí přibývá počet tmavých skvrn. Pokud se imunitní systém larvy s infekcí nevypořádá, dojde k celkovému zčernání larvy a k jejímu úmrtí. [54]

Pozoruhodné je, že k výraznější melanizaci dochází v dorzální oblasti larvy, kde se nachází její „srdce“. Jde o místo, kde se zároveň vyskytuje nejvíce haemocytů, které se podílejí na imunitní odpovědi, tudíž je zde často pozorována i nejvyšší míra melanizace larvy. [55]

Podle míry zbarvení larvy, resp. podle množství uloženého melaninu uvnitř larvy, lze hodnotit její zdravotní kondici (viz 9.4) [56]. Nicméně i samotné měření aktivity PO může sloužit jako parametr k hodnocení toxicity chemických substancí na larvách *G. mellonella* [57].

4.5. Hemolymfa a její buněčné komponenty

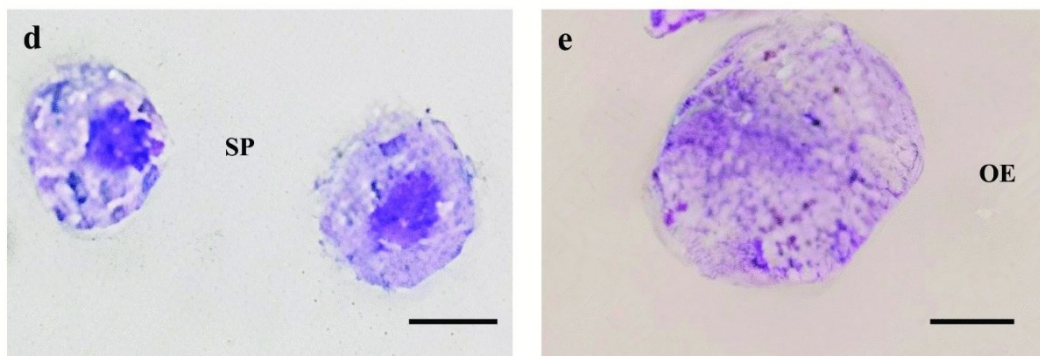
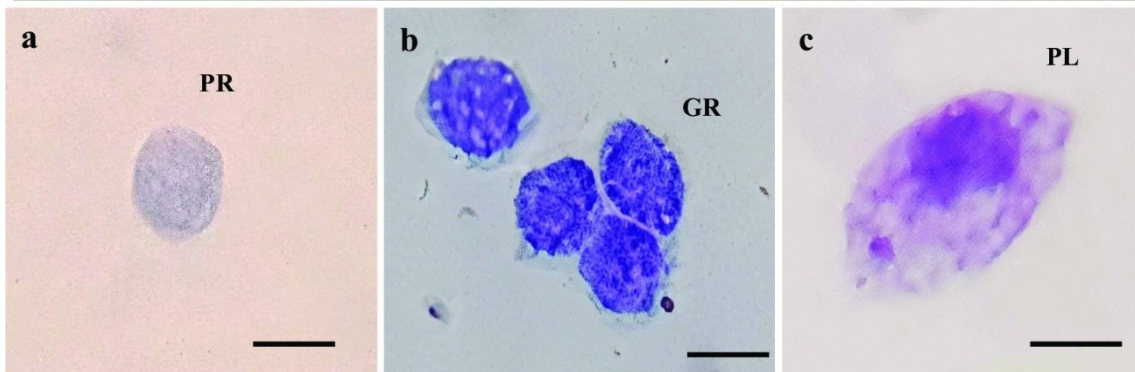
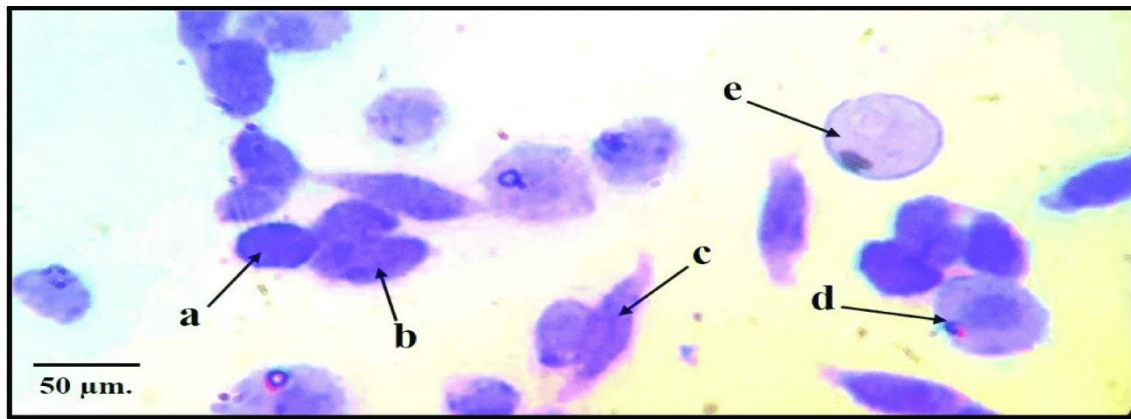
Hemolymfa (synonymum krvomíza) je extracelulární tekutina podobná krvi obratlovců, která cirkuluje uvnitř těla bezobratlých, přičemž omývá orgány otevřené

cévní soustavy hmyzu. Jedná se nejen o médium pro hromadnou translokaci živin, hormonů a jiných životně důležitých látek, ale je zároveň místem působnosti složek imunitního systému [58]. Hemolymfa je citlivým markerem změn v organismu hmyzu, tudíž může být ve výzkumu cenným zdrojem informací [59]. Nicméně oproti krvi živočichů hemolymfa není určena k transportu kyslíku, jelikož dýchací soustava hmyzu je zprostředkována vzdušnicemi (trachejemi) [58].

Dle Boman & Hultmark, 1987 [60] by mělo v hemolymfě hmyzu, tedy i larev *G. mellonella*, cirkulovat šest typů haemocytů: plazmatocyty, granulocyty, sférulocyty a oenocytoidy, prohaemocyty a koagulocyty. Měření hustoty haemocytů (počet haemocytů na ml hemolymfy) a přežití larev *G. mellonella* mohou sloužit jako indikátory patogenity studovaných infekčních činitelů [61, 62].

Plazmatocyty a granulocyty jsou nejčastějšími a nejpočetnějšími buňkami hemolymfy u larev *G. mellonella*. Plazmatocyty a granulocyty zajišťují hlavní imunologickou buněčnou obranu. Ve studii Wu *et al.*, 2016 [63] představovaly granulocyty přibližně 20 % všech haemocytů v larválním stadiu *G. mellonella*, přičemž plazmatocyty dokonce 60 %. Pocentuélní rozložení haemocytů se v průběhu vývojových stádií mění. [63]

Následujícím typem haemocytů jsou prohaemocyty, které jsou prekurzory jiných typů buněk, plazmatocytů. Další, koagulocyty, jak již jejich pojmenování napovídá, se podílejí na koagulaci hemolymfy. Granulocyty, oenocytoidy a spherulocyty zajišťují sekreční a zásobní funkce. Přičemž právě oenocytoidy se účastní fenoloxidázové kaskády, podílejí se na zneškodnění patogenů a spolu s koagulocyty i na aktivaci koagulační kaskády. [64]



Obrázek 4: Pět typů haemocytů v hemolymfě larev *G. mellonella*: a) prohaemocyty (PR), b) granulocyty (GR), c) plazmatocyty (PL), d) spherulocyty (SP), e) oenocytoidy (OE). Barvení dle Giemsy. Zdroj: Mohamed *et al.*, 2022 [65].

4.6. Tukové těleso

Tukové těleso hraje velmi důležitou roli v detoxikaci, dále v hormonální regulaci, reprodukci a metabolismu hmyzu. Jedná se spíše o obecný název pro tkáň, která vyplňuje prostory mezi orgány hmyzu. U larev *G. mellonella* je tukové těleso nažloutlé barvy. Skládá se z buněk, trofocytů a oenocytů, jejichž podíl je proměnlivý v průběhu vývoje jedince. Dále byl prokázán v tukovém tělesu hmyzu i vlastní mikrobiom. Podařilo se identifikovat bakteriální kmeny rodů *Bacillus*, *Arsenophonus*, *Lactococcus*, *Asaia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Carnobacterium*. [66]

Nadto, tukové těleso plní také významnou roli v imunitním systému hmyzu [67]. Většina proteinů, které se hrají úlohu v imunitním systému tohoto hmyzu, je syntetizována právě v tukovém těle, zejména v larválních stádiích [68].

5. Dimethylsulfoxid

Při testování toxicity léčiv bývá mnohdy značnou komplikací jejich nízká rozpustnost ve vodě. Jednou z možností, jak zvýšit solubilitu (rozpustnost) dané léčivé látky, je přidání vhodného kosolventu. Ve farmaceutickém průmyslu je DMSO jedním z nejběžnějších rozpouštědel, ale i kosolventů pro rozpouštění léků, které vykazují nízkou solubilitu ve vodě či fyziologickém médiu pro studie *in vitro* či *in vivo*. [69]

Dimethylsulfoxid (DMSO) je velmi jednoduchá organická sloučenina síry. Čistý DMSO je za pokojové teploty čirá, bezbarvá až žlutá kapalina. Toto skupenství si zachovává v širokém rozmezí teplot. Bod varu DMSO je při 189°C, avšak tuhne už při 18,5 °C. Díky svým dalším fyzikálně-chemickým vlastnostem, se řadí mezi polární aprotická rozpouštědla. Nezřídka se u něho můžeme setkat i s příviskem "univerzální rozpouštědlo". Díky němu je možné rozpustit mnoho organických sloučenin, i z řad polymerů. [70]

DMSO sám o sobě vykazuje jistou farmakologickou aktivitu, jako jsou antiflogistické, analgetické, diuretické a sedativní účinky. DMSO je schopen vychytávat volné hydroxylové radikály, čímž lze vysvětlovat jeho protizánětlivé, kryoprotektivní, kryopreservační, radioprotekční či antiischemické vlastnosti. [71]

DMSO se vyznačuje i schopností snadno pronikat kůží. S výhodou se tak ve farmaceutickém průmyslu používá pro zvýšení prostupu léčiv skrz kůži neboli jako akcelerant transdermální permeace. [72, 73]

Dostupné údaje naznačují, že DMSO má nízkou jak akutní, tak i chronickou toxicitu [74, 75, 76, 77]. Dle Suay-García *et al.*, 2019 [75] lze DMSO použít jako kosolvent až do 30 % (v/v), aniž by se projevil jeho toxický vliv na larvy *G. mellonella*.

Co se týče projevů toxicity u lidí, expozice velkým množstvím DMSO může vyvolat zčervenání, svědění až pálení kůže, bolesti hlavy, nevolnost či závratě [74].

Experimentální část

6. Seznam pomůcek a materiálů

6.1. Pomůcky

Petriho misky (Gamedia, Česká republika)

Pipety (Fisher Scientific, s.r.o., Česká republika)

Laboratorní špičky (Eppendorf, Německo)

Zkumavky (Gamedia, Česká republika)

Hamiltonova mikrostříkačka (Hamilton microsyringe, Německo)

Sterilní injekční filtr 0,2 μ l (VWR, USA)

Injekční stříkačka 20 ml (Becton a Dickinson, USA)

6.2. Materiál

Fosfátový pufovací fyziologický roztok (PBS, Merck, Německo)

Ethanol (Penta, Česká republika)

DMSO (Merck, Německo)

6.3. Přístrojové vybavení

Laminární box (ESCO, Singapur)

Termostat (Binder, Německo)

7. Pracovní hypotéza:

Larvy *G. mellonella* jsou považovány za alternativní, ekonomicky výhodnější a morálně lépe akceptovatelný živočišný model pro *in vivo* toxikologické studie, oproti například savcům. Nicméně, mezi metodikami různých výzkumných skupin bývají i nemalé rozdíly v metodických přístupech.

Pro studium vlivu hmotnosti (vývojové fáze) larev *G. mellonella* na získané výsledky týkající se toxicity byl zvolen DMSO. Jedná se o jedno z nejběžnějších rozpouštědel ve farmaceutickém sektoru. Díky němu lze rozpustit řadu organických sloučenin včetně sacharidů, polymerů, peptidů, stejně tak i mnoho anorganických solí. Navíc je toto rozpouštědlo všeobecně považováno za velmi málo toxickou látku.

Proto DMSO figuruje v řadě vědeckých publikací, toxikologické studie na larvách *G. mellonella* nevyjímaje. Přesto je až překvapující, jak moc se metodiky výzkumných skupin, kde se jak larvy *G. mellonella*, tak i administrované množství DMSO, různí.

Odlišnosti v cílové koncentraci DMSO v administrovaných dávkách jsou relativně opodstatnitelné, jelikož přidání DMSO do roztoku umožňuje zvýšení rozpustnosti jiných zkoumaných, testovaných chemických látek. Vlastní testované substance mají různou solubilitu, proto se v publikacích uvádí i různé finální koncentrace DMSO v roztocích. Četné jsou roztoky 5 % (v/v) DMSO v PBS [24, 79] či 10 % (v/v) DMSO v PBS [23, 76, 80, 81]. Nicméně, občas se lze setkat s mnohonásobně vyššími finálními koncentracemi DMSO [23, 80].

Co se týče intrahaemocoelické administrace, různí se i administrované objemy roztoků. Nejběžnější je objem odpovídající 10 μ l [23, 76, 79, 80, 81], přesto je možné narazit i na dvojnásobné množství (20 μ l) [24] či jen na administrování pouze 1 μ l [82].

Studie se také značně různí ve velikostech a hmotnostech testovacích larev, což ovlivňuje i výsledné množství DMSO na kilogram živé váhy, viz Tabulka 3.

Pro rámec těchto experimentů byla vyselektována zvířata o třech hmotnostních kategoriích: 250 \pm 10 mg, 350 \pm 15 mg, 450 \pm 15 mg. Zvoleny byly čtyři finální dávky DMSO v PBS vztahené na 1 kg živé váhy larvy: 12,751 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 \pm 15 mg jde o 40 % (v/v) DMSO v PBS), dále 15,714 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 \pm 15 mg jde o 50 % (v/v) DMSO v PBS), 18,85 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 \pm 15 mg jde o 60 % (v/v) DMSO v PBS) a 22,0 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 \pm 15 mg jde o 70 % (v/v) DMSO v PBS).

Jedním z hlavních cílů práce bylo vyhodnotit toxicitu čtyř vybraných cílových dávek DMSO na larvách *G. mellonella* o třech váhových kategoriích a stanovit hodnotu střední letální dávky (LD₅₀). Dalším úkolem bylo v experimentu zavést index hodnotící zdraví jedince, tzv. HISS (the Health Index Score System) a následně zhodnotit efektivitu a přínosy zavedení hodnotícího kritéria HISS. Mapování HISS dovoluje detailněji nahlédnout do dopadů na zdravotní stav larev po administraci testovacího roztoku, než je pouhé rozlišení mezi živou a mrtvou larvou v rámci sestavování tzv. Kaplan-Meier „survival“ křivek. Zároveň cílem práce bylo posoudit vliv odlišných hmotností larev na výsledky experimentu.

Tabulka 3: Srovnání vybraných publikací, kde byl prověřován i toxický efekt DMSO na larvách *G. mellonella*. Byly zvoleny parametry: finální koncentrace DMSO v roztoku [%, v/v], hmotnost larev [mg], administrovaný objem [μ l], množství DMSO na kilogram živé váhy larvy [g/kg] a instar.

STUDIE	Koncentrace DMSO v roztoku [%, v/v]	Hmotnost larev [mg]	Administrovaný objem [μ l]	Množství DMSO na kilogram živé váhy [g/kg]	Instar
Coates <i>et al.</i> , 2019 [24]	5 %	310 \pm 4 mg	20 μ l	3,55	Poslední instar
Ignasiak <i>et al.</i> , 2017 [23]	10 %	305 \pm 15 mg	10 μ l	3,6	Pátý instar
	50 %			18,03	
Enrico Allegra <i>et al.</i> , 2018 [80]	10 %	200 mg	10 μ l	5,5	Neuvedeno
	30 %			16,5	
	50 %			27,5	
	80 %			44	
Moya-Andérico <i>et al.</i> , 2021 [81]	10 %	225 \pm 25 mg	10 μ l	4,89	Poslední instar
Suay-García <i>et al.</i> , 2019 [78]	10 %	300 \pm 20 mg	10 μ l	3,67	Poslední instar
	20 %			7,33	
	30 %			11,0	
Zhang <i>et al.</i> , 2014 [82]	20 %	250 \pm 25 mg	1 μ l	0,88	Pátý instar
Emery <i>et al.</i> , 2019 [70]	5 %	250 \pm 10 mg	10 μ l	2,2	Poslední instar
		350 \pm 15 mg		1,57	

8. Podmínky experimentů pro určení vlivu váhy larev *Galleria mellonella* v rámci studia toxicity *in vivo*

8.1. Odchov larev *Galleria mellonella*

Odchov zvířat proběhl v biologické laboratoři Katedry biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Larvy byly krmeny umělou stravou, viz Polová, 2019 [85], a chovány ve tmě v termoboxu při 29°C. Aby bylo dosaženo co nejkvalitnějších a nejrobustnějších larev, byla aplikována dieta dle Haydaka [83] s drobnými změnami, viz Tabulka 4 a postup viz Polová, 2019 [85]. Tato skladba diety se osvědčila i u dalších experimentů [14, 84, 85, 86].

Tabulka 4: Složení diety dle Haydaka [83] pro odchov hmyzu *Galleria mellonella*

Složení:	Množství
Pšeničná mouka	22 g
Pšeničný šrot	22 g
Kukuřičný šrot (polenta)	44 g
Sušené plnotučné mléko	22 g
Glycerin	22 g
Včelí med	22 g
Včelí vosk	35 g
Sušené inaktivované kvasnice	11 g
Voda	40 ml

8.2. Příprava testovacích roztoků DMSO

Vybrané koncentrací DMSO [% (v/v)] byly přepočteny na gramy DMSO na kilogram živé váhy larev pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg. Vznikly tak dávky čtyři finální dávky DMSO v PBS vztažené na 1 kg živé váhy larvy: 12,751 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 ± 15 mg jde o 40 % (v/v) DMSO v PBS), dále 15,714 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 ± 15 mg jde o 50 % (v/v) DMSO v PBS), 18,85 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 ± 15 mg jde o 60 % (v/v) DMSO v PBS) a 22,0 g DMSO/kg váhy larvy (pro larvy váhy 350 ± 15 mg jde o 70 % (v/v) DMSO v PBS).

Za účelem dosažení totožné dávky DMSO [g/kg] i u zbylých váhových kategorií (250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg), byla složení jednotlivých testovacích roztoků přepočítána a připravena pro každou dávkovou skupinu zbylých váhových kategorií zvlášť.

Příprava PBS byla provedena dle instrukcí výrobce, kdy se jedna tableta nechala rozpustit ve 200 ml čištěné vody. Následně byla provedena filtrace přes filtr s porozitou $0,2 \mu\text{m}$.

Všechny testovací roztoky byly připraveny postupem, kdy po rozpuštění požadovaného množství DMSO v PBS byly jednotlivé roztoky přefiltrovány přes filtr s porozitou $0,2 \mu\text{m}$.

8.3. Postup experimentu

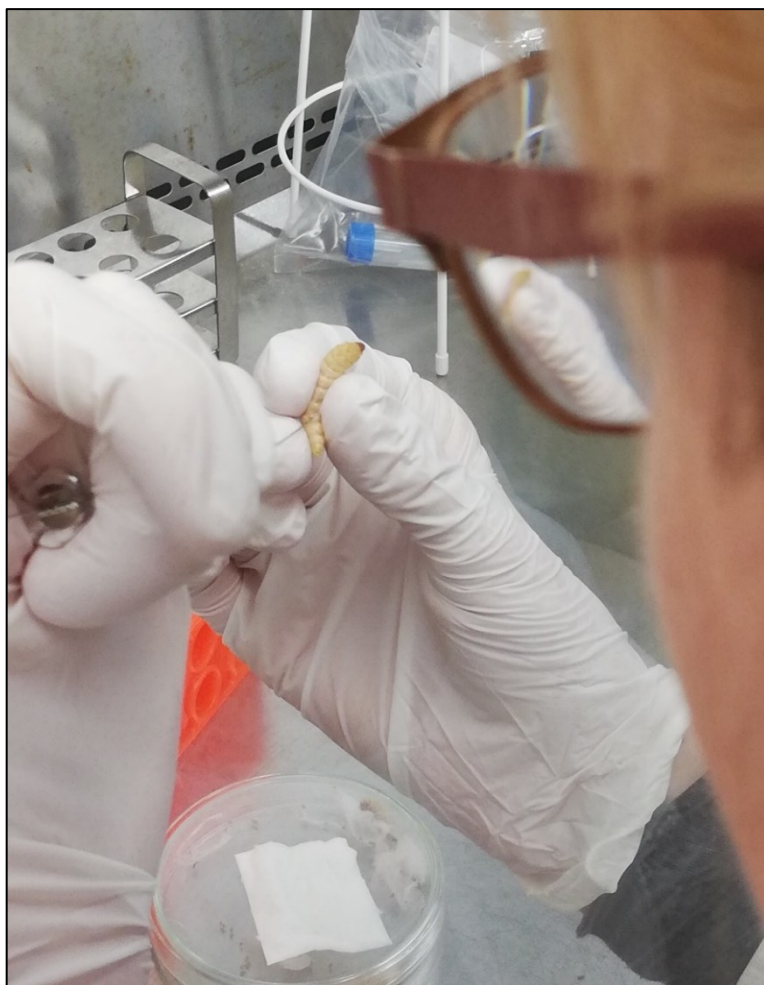
Pro experimenty byli vybráni pouze plně vitální, krémově zbarvení jedinci s požadovanou váhou. V rámci jednotlivých experimentů byly vytvořeny tři testované skupiny, vždy po šesti jedincích, jedna skupina larev s váhou 250 ± 10 mg, druhá skupina s váhou 350 ± 15 mg a třetí skupina o váze 450 ± 15 mg.

Pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky byl do každé larvy administrován objem $10 \mu\text{l}$ testovacího roztoku o příslušném množství DMSO na kg váhy zvířete přímo do haemocoelu přes poslední levou panožku, viz . Administrovány byly dávky: $12,751$ g DMSO/kg váhy larvy), $15,714$ g DMSO/kg váhy larvy, $18,850$ g DMSO/kg váhy larvy), $22,0$ g DMSO/kg váhy larvy.

Do experimentů byly zahrnuty také i dvě kontrolní skupiny. Každou z nich tvořily tři podskupiny dle váhových kategorií (250 ± 10 mg, 350 ± 15 mg a 450 ± 15 mg), také po šesti jedincích (celkem $n_{\Sigma} = 36$ larev). Stejným způsobem, jako testovacím skupinám, bylo první kontrolní skupině aplikováno po $10 \mu\text{l}$ čistého PBS a druhá kontrolní skupina larev byla tvořena zástupci, kteří nebyli podrobeni jakékoliv injekční administraci.

Následně byly všechny skupiny larev vedené v experimentech, včetně obou kontrolních skupin, v celkovém počtu 108 jedinců, inkubovány na Petriho miskách spolu s krmivem v inkubátoru při teplotě 37°C .

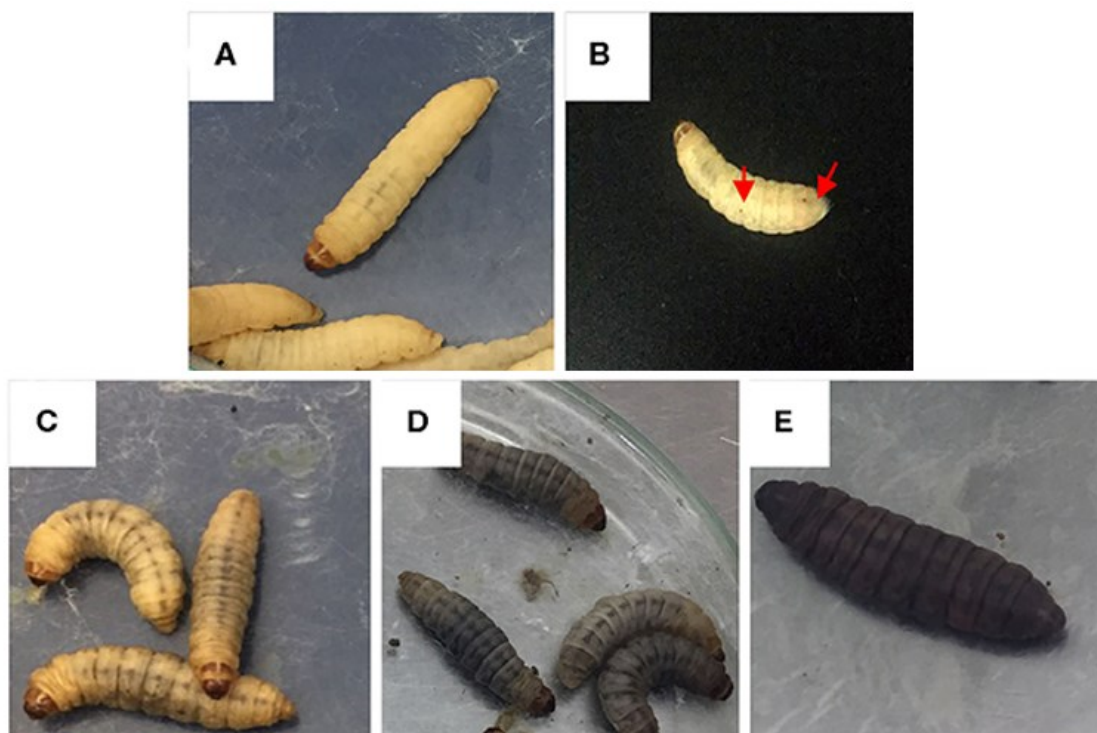
Po dobu 168 hodin (vždy po 24, 48, 96 a 168 hodinách od podání) byla pro jednotlivé larvy hodnocena kritéria, pomocí kterých byl určeno skóre „zdraví“, v rámci hodnocení HISS. Jednotlivá kritéria a jejich bodové ohodnocení viz Tabulka 5.



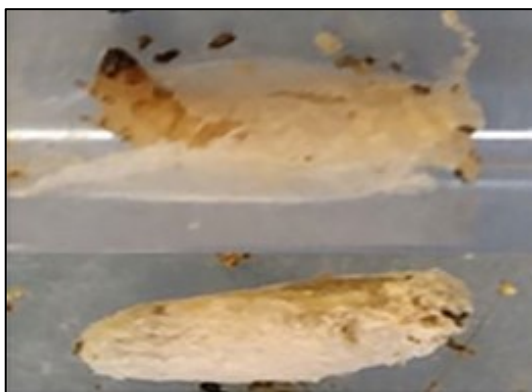
Obrázek 5: Administrace roztoku o objemu 10 μ l pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky přes poslední levou panožku larvy *Galleria mellonella*. Fotografie poskytnula dr. Konečná



Obrázek 6: Bližší pohled na intrahaemocoelovou administraci pomocí běžné injekční stříkačky přes poslední levou panožku. V porovnání s Obrázkem 5 je zjevné, že využití Hamiltonovy mikrostříkačky v této práci je vůči larvám mnohem šetrnější. Zdroj obrázku Mukherjee *et al.*, 2011 [86].



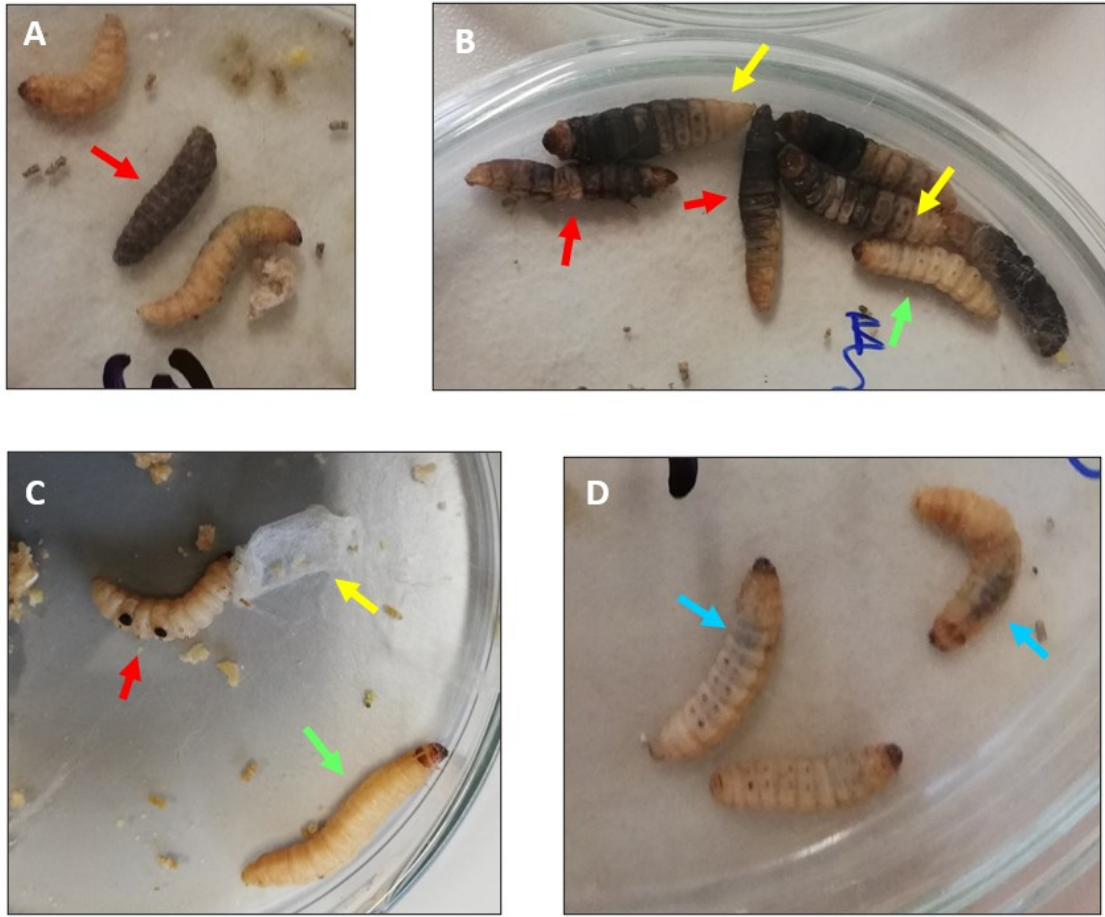
Obrázek 7: Foto-ilustrace pro hodnocení melanizace na základě bodovacího systému indexu zdraví (HISS). (A) bez melanizace; (B) ≤ 3 skvrny na béžovém těle (červené šipky ukazující skvrny); (C) ≥ 3 skvrny na béžovém těle, často tvořící tmavý pruh na hřbetu larvy; (D) Černé skvrny na hnědém těle; (E) kompletní melanizace (černé tělo). Zdroj: Torres, *et al.* (2020) [88].



Obrázek 8: Foto-ilustrace pro hodnocení formování zámotku na základě bodovacího systému indexu zdraví. V horní polovině obrázku larva s částečným zámotkem. V dolní polovině obrázku plný kokon larvy. Zdroj: Ménard *et al.*, 2021 [89].

Tabulka 5: Kritéria pro hodnocení zdravotní kondice larev pomocí zavedení systému HISS (the Health Index Score System), převzato z Loh *et al.*, 2013 [56].

PARAMETR		SKÓRE
Aktivita (pohyb)	Bez aktivity	0
	Minimální aktivita až po stimulaci	1
	Normální aktivita až po stimulaci	2
	Normální aktivita, bez stimulace	3
Formování zámotku	Žádné	0
	Částečný zámotek	0,5
	Plný zámotek	1
Melanizace	Kompletní melanizace (černé tělo)	0
	Černé skvrny na hnědém těle	0
	≥3 skvrny na béžovém těle	2
	<3 skvrny na béžovém těle	3
	Bez známek melanizace	4
Přežití	Smrt	0
	Přežití	2



Obrázek 9: Foto-ilustrace ze čtyř fotografií. A) červenou šipkou vyznačena kompletně melanizovaná larva; B) červené šipky znázorňují larvy s melanotickými skvrnami na hnědém těle, žluté šipky ukazují na larvy s více jak třemi skvrnami na béžovém těle, zelená šipka značí larvu s méně jak třemi skvrnami na béžovém těle; C) červenou šipkou vyznačena larva se dvěma melanotickými ložisky, zelenou šipkou označena larva bez melanizace, žlutá šipka zvýrazňuje částečně vytvořený zámotek; D) charakteristické projevy melanizace na hřbetě, respektive bříšku, larev, tedy v místě výskytu „srdce“ larvy, kde je nejvyšší koncentrace haemocytů. Obrázky poskytl dr. Klára Konečná.



Obrázek 10: Larva v kokonu (červená šipka) v porovnání s larvou, co ještě nevytvořila ani částečný zámotek (zelená šipka), žluté šipky značí krmivo. Foto poskytnula dr. Konečná.



Obrázek 11: Larvy, jenž už formují své zámotky (oranžové šipky). Foto poskytnula dr. Konečná.

9. Výsledky

9.1. Zpracování a hodnocení získaných dat pomocí Kaplan-Meier křivek

Kaplan-Meier křivky poskytují informace o přežití larev po administraci konkrétní dávky DMSO s hodnocením určitého časového období po podání.

V rámci Grafů 1-3 jsou zpracována data pro jednotlivé váhové kategorie larev po administraci různých cílových dávek DMSO. Jak je z Grafů 1-3 patrné, po 24 hodinách od administrace nebylo ani v jedné váhové kategorii dosaženo LD₅₀, a to pro všechny administrované dávky.

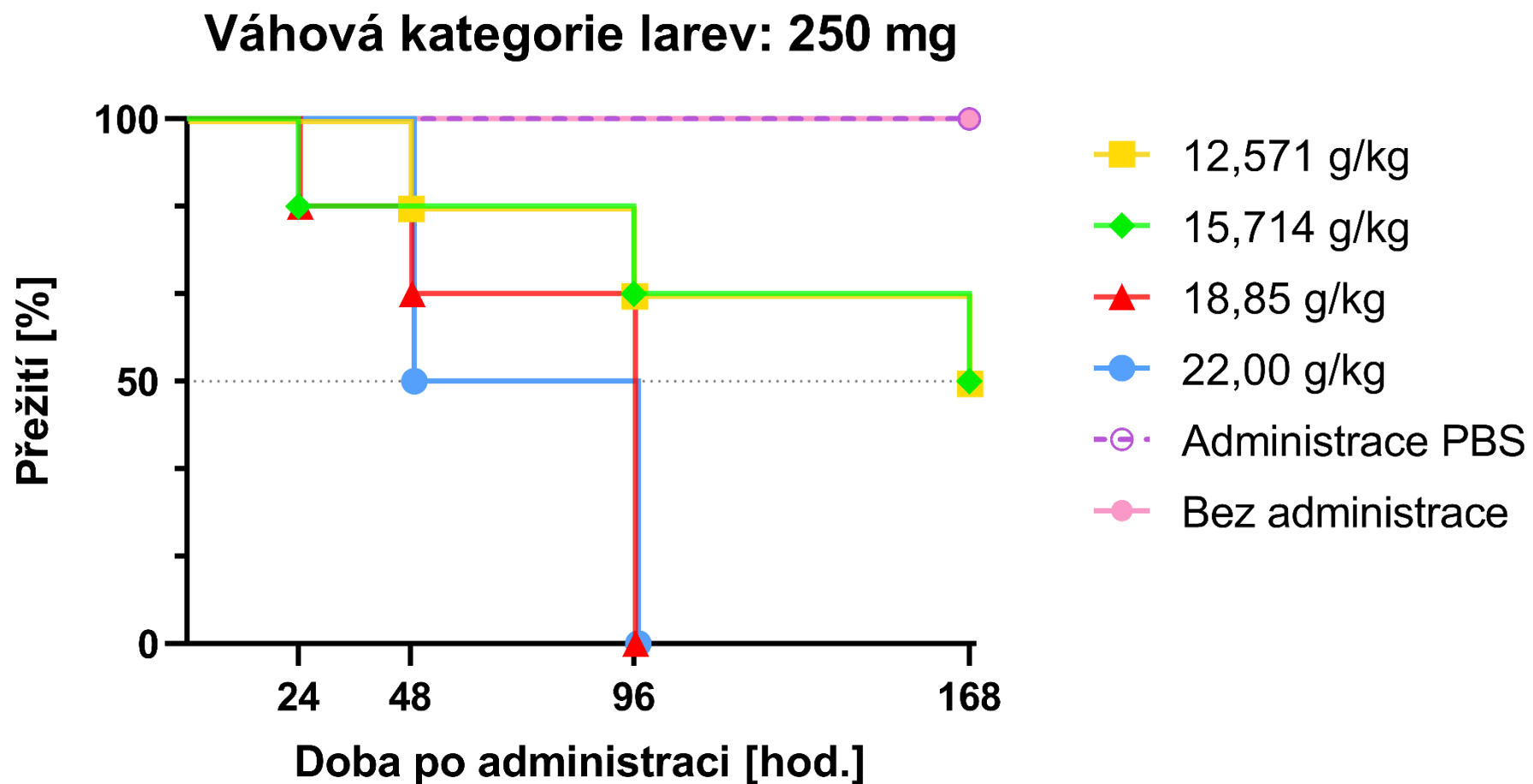
Při druhém odečtu, tedy 48 hodin po administraci, bylo dosaženo LD₅₀ v první váhové kategorii (250 ± 10 mg) a to ve skupině s nejvyšší administrovanou dávkou odpovídající 22,0 g/kg DMSO, což je vidno z Grafu 1. Z Grafu 3 je možné vyčíst, že hodnoty LD₅₀ bylo dále dosaženo také ve třetí váhové skupině (450 ± 15 mg), a to po administraci dávky 18,85 a 22,0 g/kg živé váhy

Jak je dále patrné z Grafu 1, v 96. hodině od administrace bylo dosaženo LD₅₀ v první váhové skupině (250 ± 10 mg) po administraci 18,85 g/kg. Dále také ve skupině váhové kategorie 450 ± 15 mg s cílovou dávkou 15,714 g/kg živé váhy, což dokazuje Graf 3.

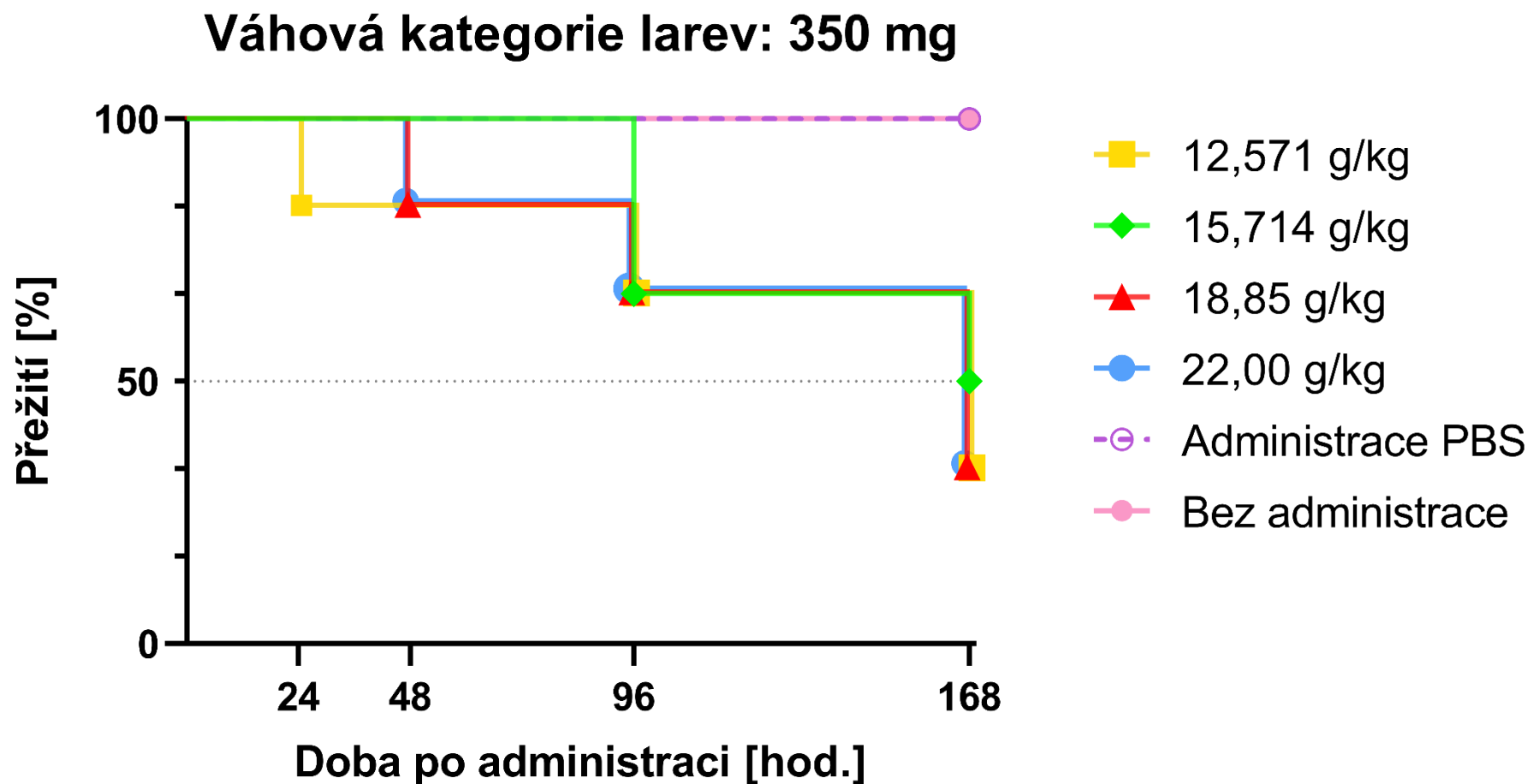
Při posledním odečtu, 168 hodin po administraci, bylo dosaženo LD₅₀ v první skupině také u dvou zbývajících skupin, tedy skupin po administraci cílové dávky 15,714 a 12,571 g/kg (Graf 1).

Ve skupině 350 ± 15 mg pak došlo k dosažení LD₅₀ u všech testovaných podskupin právě až na konci experimentu (168 hodin od administrace), což lze vyčíst z Grafu 2. Nicméně, jak je vidno z Grafu 3, ve skupině váhové kategorie 450 ± 15 mg s administrovanou cílovou dávkou 12,571 g/kg nedošlo k dosažení LD₅₀ ani v tomto čase (168 hodin od administrace).

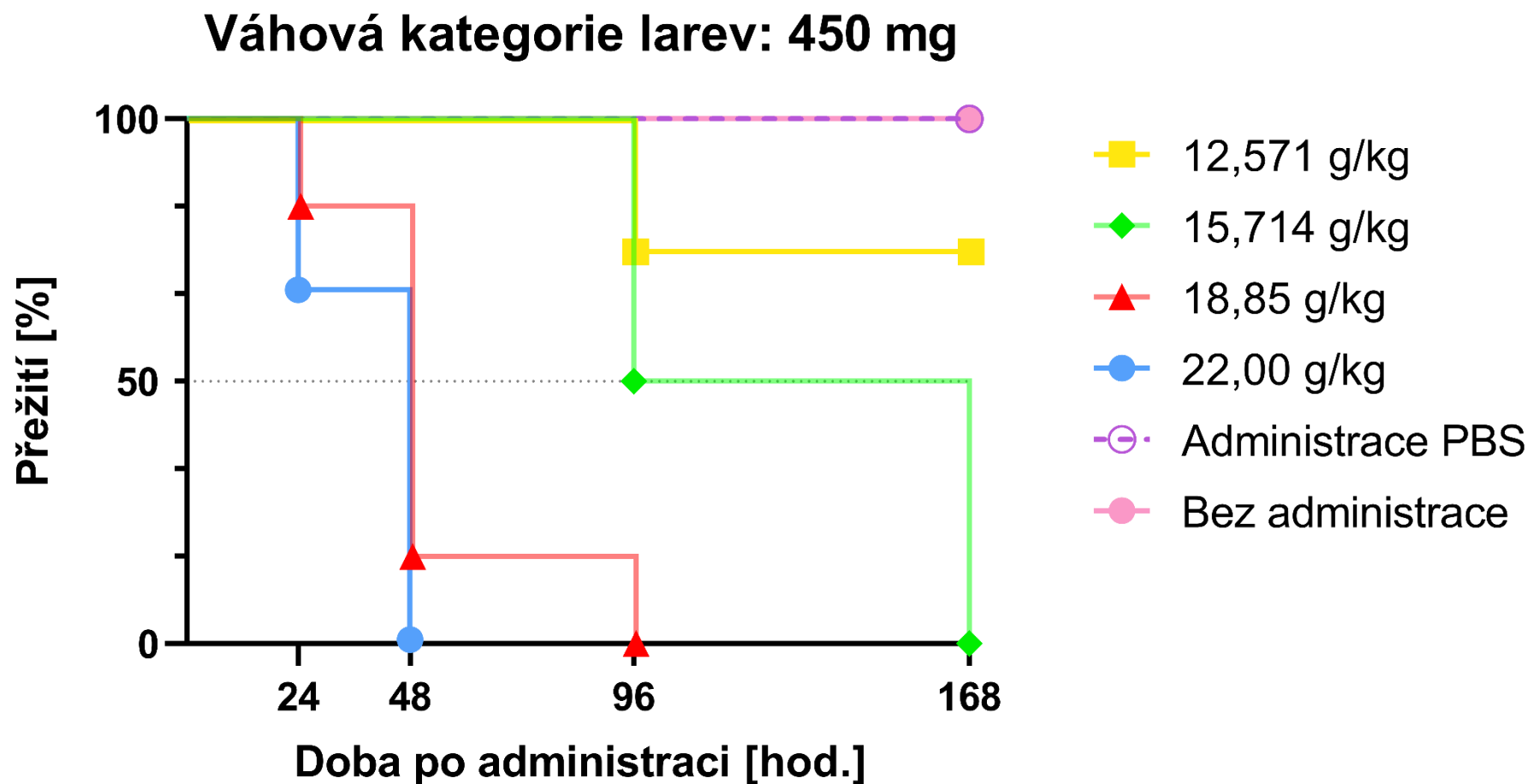
Zjevně, skupina 450 ± 15 mg vykazuje ve srovnání s ostatními skupinami nejmenší míru přežití po expozici látky (DMSO) ve vyšších koncentracích. Naopak nejvyšší míru přežití pak vykazuje skupina 350 ± 15 mg.



Graf 1: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 250 ± 10 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$.



Graf 2: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 350 ± 15 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$.



Graf 3: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 450 ± 15 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$.

9.2. Stanovení LD₅₀ (median lethal dose, střední smrtelná dávka)

Střední smrtelná dávka (LD₅₀) v toxikologii či experimentální farmakologii označuje množství noxy (mg/kg, resp. g/kg), při kterém do určité doby dojde k úmrtí 50 % sledovaných jedinců (zvířat). Čím nižší je LD₅₀, tím má být noxa toxicitější.

Pro účely této práce byly pro stanovení LD₅₀ zvoleny tři doby odečtu: 24, 48 a 168 hodin od jednorázové administrace. Dle našeho ustanovení, hodnota LD₅₀ pro odečet po 24 hodinách reflektuje akutní toxicitu, LD₅₀ po 48 hodinách subakutní toxicitu a LD₅₀ po 168 hodinách naopak chronickou toxicitu. Termíny akutní, subakutní a chronická toxicita pro larvy *G. mellonella* nejsou v literatuře tímto způsobem definovány.

Analýzou získaných dat z experimentů v programu GraphPad Prism 9.5.1 byly obdrženy hodnoty LD₅₀ pro danou dobu odečtu (Tabulka 6, Grafy 4-6).

Tabulka 6: Vyhodnocení LD₅₀ larev *G. mellonella* po intrahaemocoelové administraci DMSO (horní část tabulky). LD₅₀ byla hodnocena po 24, 48, a 168 hodinách. Pro ilustraci jsou ve spodní části tabulky uvedeny také hodnoty LD₅₀ po 24 hodinách pro jiná modelová zvířata (myš, potkan), zdroj: National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) [104]. Legenda: (i.v.) = intravenózní administrace; (p.o.) = perorální administrace; (i.p.) = intraperitoneální administrace.

Váhová kategorie larev <i>G. mellonella</i>	LD ₅₀ [g/kg]		
	po 24 hodinách	po 48 hodinách	po 168 hodinách
250±10 mg	25,93	22,0	11,87
350±15 mg	29,75	19,66	15,71
450±15 mg	22,30	18,15	13,27
Druh živočišného modelu	LD ₅₀ [g/kg] po 24 hodinách		
	(i.v.)	(p.o.)	(i.p.)
<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	5,75	16,5-21,4	2,5
<i>Rattus norvegicus</i> (potkan obecný)	5,36	14,5-28,3	8,2

Jak je patrné z Grafu 4, kde jsou data prezentována pomocí křivky nelineární regrese, též z Tabulky 6, nejvyšší LD₅₀ po 24 hodinách od administrace byla zaznamenána u váhové kategorie 350 ± 15 mg, tedy 29,75 g/kg. Naopak nejnižší LD₅₀ bylo dosaženo u

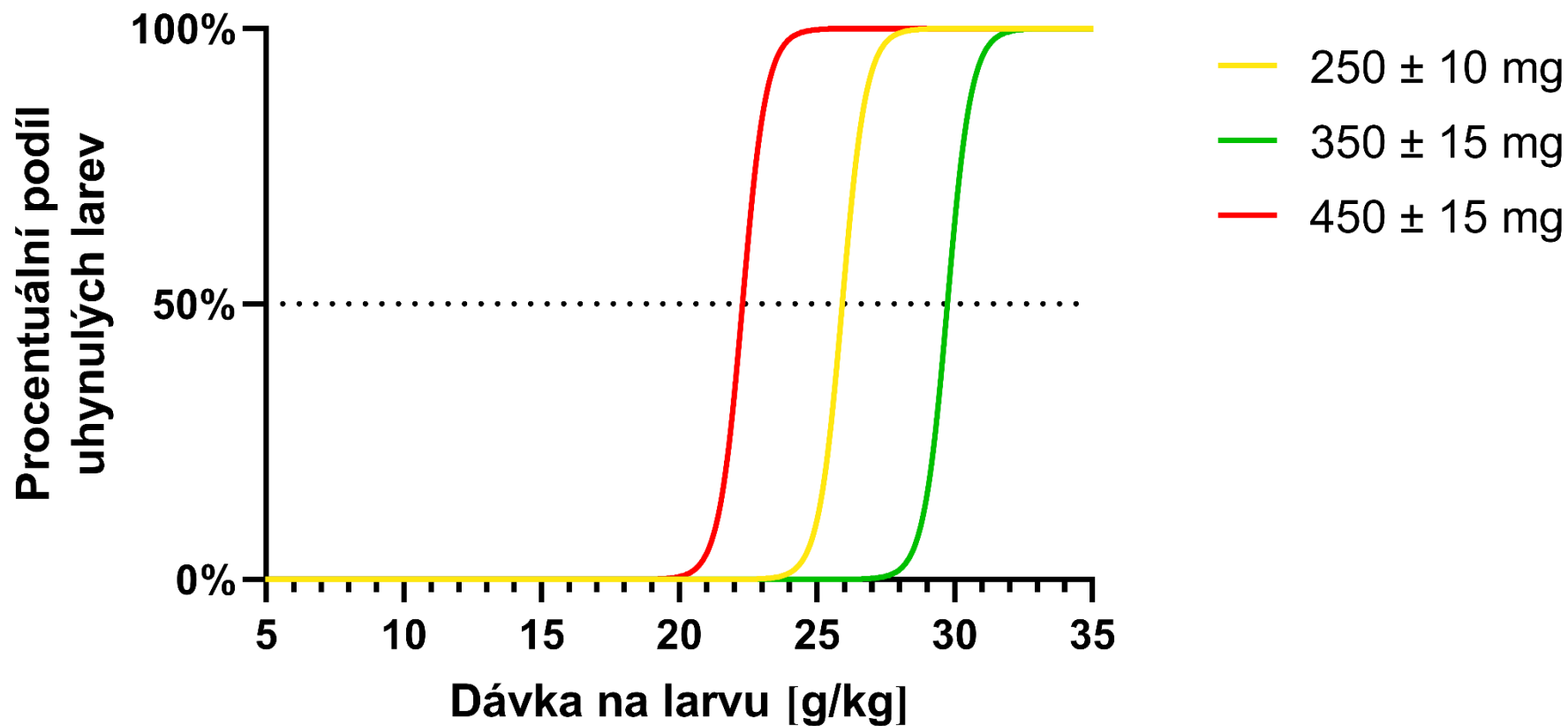
váhové kategorie larev 450 ± 15 mg, a to $22,30$ g/kg, což je o necelých $7,5$ g/kg (přibližně o čtvrtinu) méně než u váhové kategorie 350 ± 15 mg. Za zmínku také stojí, že hodnota LD_{50} pro kategorii 250 ± 10 mg ($25,93$ g/kg), se pohybovala téměř přesně mezi hodnotami LD_{50} pro předešlé dvě váhové kategorie.

Intrahaemocoelové 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 LD_{50} po 24 hodinách pro larvy *G. mellonella* s hodnotami akutní toxicity (vyjádřené jako 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_{50} larev *G. mellonella* po intrahaemocoelové administraci byly spíše bližší hodnotám LD_{50} po perorální administraci DMSO vybraným živočichům.

Při odečtu LD_{50} po 48 hodinách (Graf 5 a Tabulka 6), byla zaznamenána nejvyšší hodnota LD_{50} u larev váhové kategorie 250 ± 10 mg ($22,0$ g/kg). Avšak nejnižší hodnota LD_{50} byla opět dosažena u váhové kategorie 450 ± 15 mg ($18,15$ g/kg). Mezi všemi třemi hodnotami LD_{50} vypočtených pro tento čas, včetně kategorie 350 ± 15 mg ($19,66$ g/kg), nebyly žádné markantní rozdíly. Rozdíl hodnot mezi LD_{50} pro kategorie 450 ± 15 mg a 250 ± 10 mg byl $3,85$ g/kg a rozdíl mezi 350 ± 15 mg a 250 ± 10 mg činil $2,34$ g/kg.

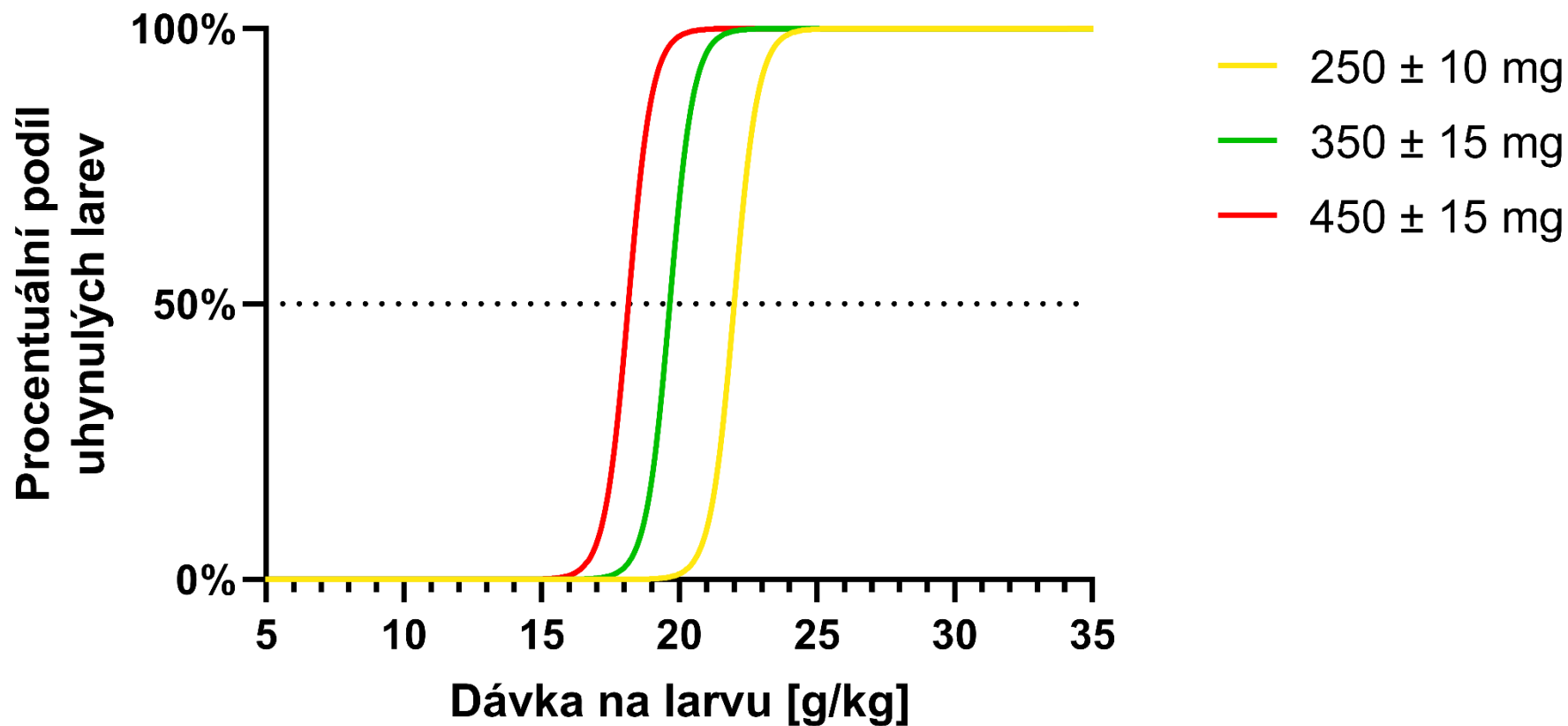
Na konci experimentu bylo opět vyhodnoceno jiné pořadí (Graf 6 a Tabulka 6). Nejnižší LD_{50} po 168 hodinách od administrace byla zaznamenána u váhové kategorie larev 250 ± 10 mg ($11,87$ g/kg). Naopak nejvyšší LD_{50} byla zaznamenána, tak jako z odečtu po 24 hodinách, u váhové kategorie 350 ± 15 mg ($15,71$ g/kg). Rozdíl hodnot mezi LD_{50} pro kategorie 350 ± 15 mg a 450 ± 15 mg byl $2,44$ g/kg ($15,53$ %) a rozdíl mezi 350 ± 15 mg a 250 ± 10 mg činil $3,84$ g/kg, tudíž LD_{50} pro 250 ± 10 mg byl o necelou čtvrtinu ($24,44$ %) menší než hodnota pro kategorii 350 ± 15 mg.

Nelineární regrese po 24 hod.



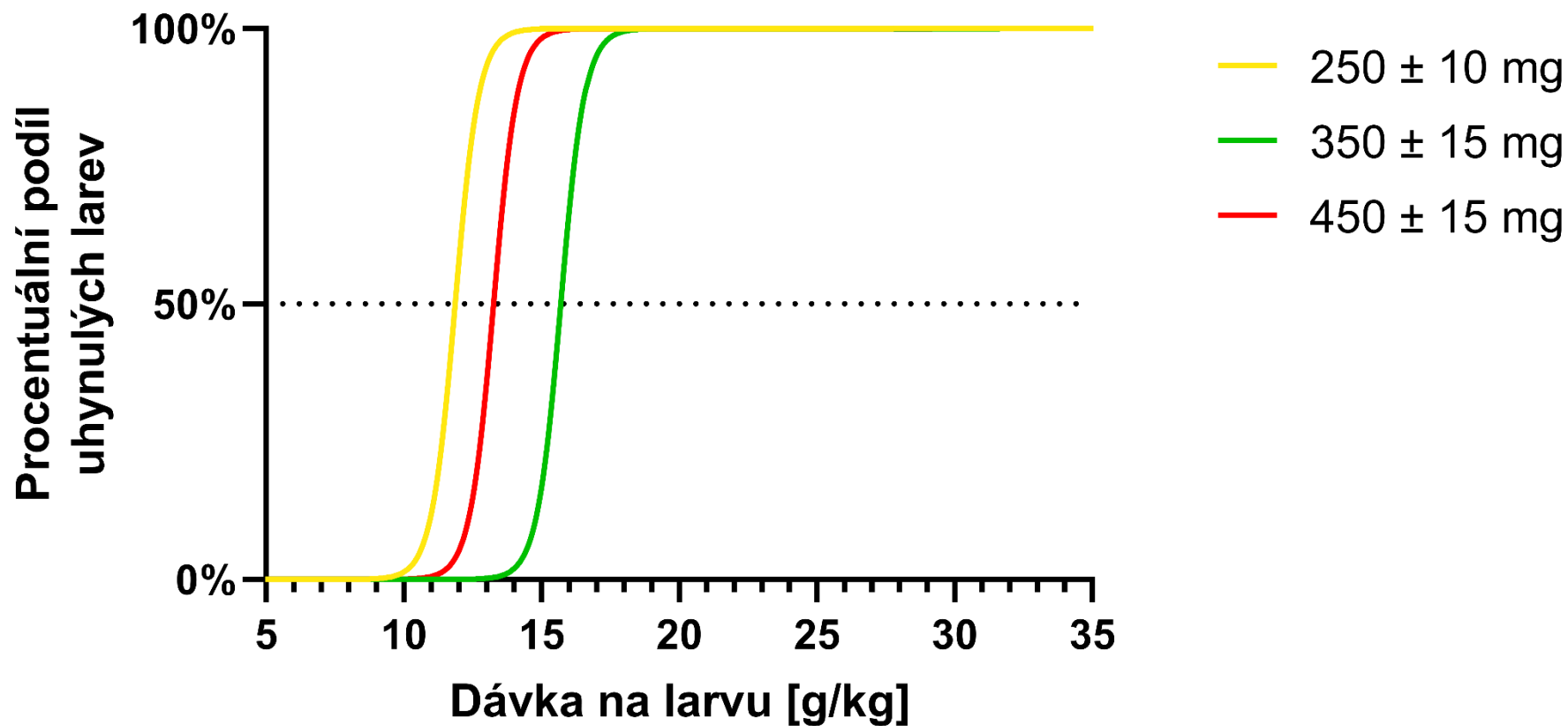
Graf 4: Stanovení LD₅₀ po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám *G. mellonella* tří váhových kategorií. Hodnocení LD₅₀ 24 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.

Nelineární regrese po 48 hod.



Graf 5: Stanovení LD₅₀ po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám *G. mellonella* tří váhových kategorií. Hodnocení LD₅₀ 48 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.

Nelineární regrese po 168 hod.



Graf 6: Stanovení LD₅₀ po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám *G. mellonella* tří váhových kategorií. Hodnocení LD₅₀ 168 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.

9.3. Medián přežití

Medián přežití (median survival time) je kalkulovaná časová veličina, která odpovídá přežití 50% jedinců, a je počítána při sestavování Kaplan-Meier křivek pomocí statistického programu. V našem případě vyjadřuje pravděpodobnou dobu po administraci určité dávky DMSO, kdy se očekává, že polovina testovaných jedinců (larev) ze skupiny bude ještě naživu.

Hodnoty mediánu přežití byly vypočítány přes „simple survival analysis“ (prostá analýza přežití) v programu GraphPad Prism 9.5.1, a to vždy pro každou administrovanou dávku v rámci jednotlivých váhových kategorií. Pro žádnou z kontrolních skupin nebyla hodnota mediánu přežití programem stanovena (nedocházelo k úhynu larev), dokonce ani pro skupinu 450 ± 15 mg s dávkou DMSO 12,571 g/kg. Ani v jednom případě nebyl medián přežití kratší než 48 hodin. Hodnoty všech mediánů přežití larev jsou znázorněn v Tabulce 7.

Tabulka 7: Medián přežití v závislosti na administrované dávce DMSO a na hmotnosti jedince stanovený programem GraphPad Prism 9.5.1.

Medián přežití				
Váhová kategorie	Dávka DMSO [g/kg]			
	12,571	15,471	18,85	22,0
250 ± 10 mg	168 h	168 h	96 h	72 h
350 ± 15 mg	168 h	168 h	168 h	168 h
450 ± 15 mg	Nedefinováno	132 h	48 h	48 h

Jednou z forem interpretace dat z experimentů bylo i jejich zpracování v podobě závislosti přežití larev tří různých váhových kategorií na administrované dávce (Grafy 7-10). Z nich byly stanoveny i příslušné mediány přežití.

Jak je zjevné z Kaplan-Meier křivek z Grafu 7, při administrované dávce odpovídající koncentraci 12,571 g/kg byla jako nejodolnější skupina larev o váze 450 ± 15 mg. V tomto případě došlo k úhynu pouze jedné larvy ze šesti, a to až po 96 hodinách od administrace. Medián přežití nebyl pro tuto skupinu, jak bylo zmíněno výše, definován (Tabulka 7). Pro zbylé dvě skupiny o menších vahách byly mediány přežití již

definovány. V Tabulce 7 je u obou uvedena dokonce stejná hodnota, a to 168 hodin. Nicméně, jak je vidno z Grafu 7, skupina larev střední váhy (350 ± 15 mg) byla vůči nejnižšímu administrovanému množství DMSO ($12,571$ g/kg) citlivější než skupina larev o nejnižší váze (250 ± 10 mg).

Z Grafu 8 je vidět, že do 96 hodin od administrace množství DMSO $15,714$ g/kg probíhaly „survival“ křivky pro larvy druhé a třetí váhové kategorie (350 ± 15 mg a 450 ± 15 mg) stejnou cestou. Avšak od 96. hodiny včetně ležela křivka pro první a druhou váhovou kategorii (250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg) na sobě. Jak je vidno z Tabulky 7, mediány přežití byly stejné jak pro první, tak pro druhou hmotnostní kategorii. Konkrétně 168 hodin. Kratší medián přežití byl definován pro kategorii 450 ± 15 mg jako 132 hodin (viz Tabulka 7).

Po administraci množství DMSO $18,85$ g/kg, jejímuž znázornění je věnován Graf 9, se již výrazněji projevuje vyšší citlivost skupiny larev o váze 450 ± 15 mg. Křivka této skupiny z počátku probíhá souběžně s křivkou pro nejnižší hmotnostní skupinu (250 ± 10 mg). Ve 48. hodině byl však evidován velký propad u křivky larev 450 ± 15 mg, která v 96. hodině končí na nule. Nicméně u křivky nejnižší hmotnostní kategorie je viděn značný propad až v 96. hodině, kdy končí na nule. Pokud jde o křivku pro kategorii 350 ± 15 mg, ta vykazuje relativně obdobný charakter a příslušný medián přežití je v Tabulce 7 opět na hodnotě 168 hodin.

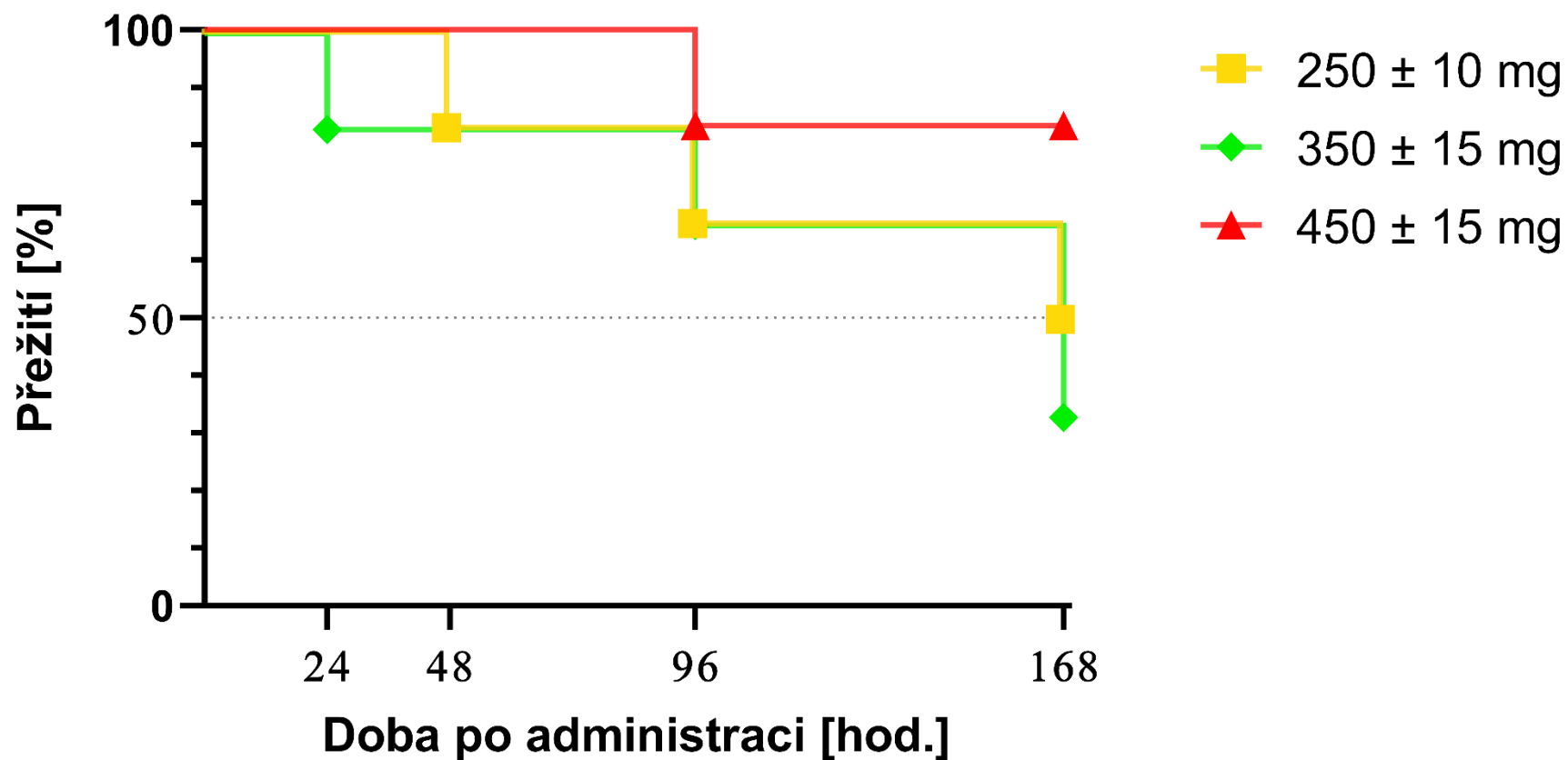
Pro úplnost, mediány přežití při dávce DMSO $18,85$ g/kg jsou v Tabulce 7 uvedeny jako 96 hodin pro kategorii 250 ± 10 mg a jako 48 hodin pro kategorii 450 ± 15 mg. V tomto případě je index mediánu přežití skupiny 350 ± 15 mg 1,75násobný oproti skupině 250 ± 10 mg a vůči skupině 450 ± 15 mg se jedná dokonce o 3,5násobek.

I přes administrování nejvyššího množství DMSO v experimentech ($22,0$ g/kg), jak je vidno z Grafu 10, vykazovala křivka skupiny larev o váze 350 ± 15 mg stabilní trend v porovnání s předešlými křivkami této váhové kategorie na nižších administrovaných vahách. Medián přežití larev této skupiny byl opět definován jako 168 hodin. U zbylých dvou skupin byly programem vypočítány mediány přežití jako 72 hodin pro kategorii 250 ± 10 mg a jako 48 hodin pro kategorii 450 ± 15 mg. Index mediánu přežití skupiny 350 ± 15 mg je zde 2,33násobný oproti skupině 250 ± 10 mg a vůči skupině 450 ± 15 mg se opět jedná o 3,5násobek.

V souhrnu, jak vyplývá z Tabulky 7, po administraci DMSO v jakékoli dávce byl medián přežití pro larvy váhové kategorie 350 ± 15 mg vždy stejný, a to 168 hodin. Odlišovaly se však hodnoty pro ostatní váhové kategorie, 250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg. U nejvyšší váhové kategorie (450 ± 15 mg) dosahovaly mediány přežití nižších hodnot než u larev s nejnižší hmotností (250 ± 10 mg).

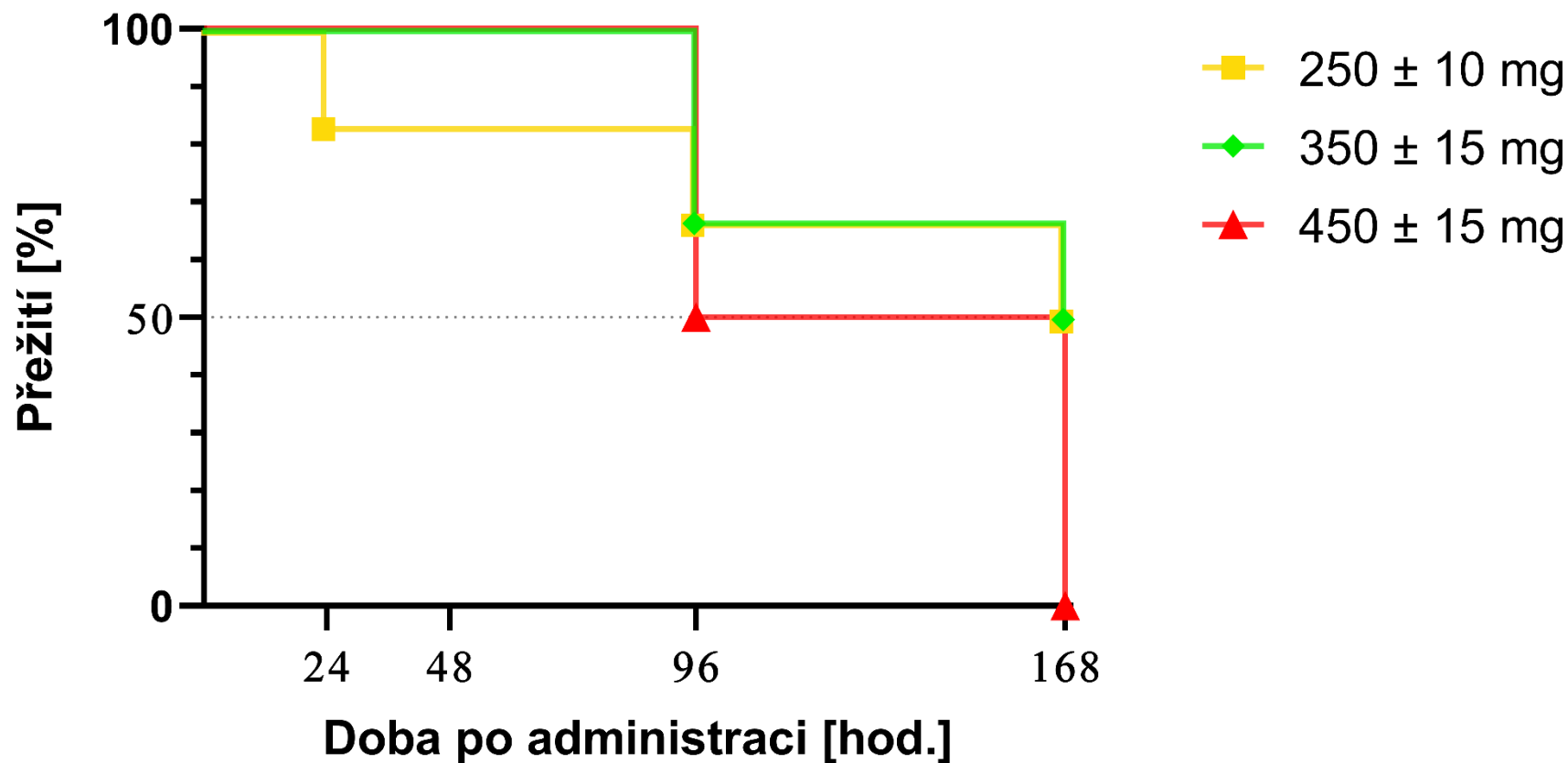
Pokud pomineme výsledky při (v přepočtu) nejnižší administrované dávce DMSO, tedy z Grafu 7, tak je možné z Grafů 8-10 vyvodit následující tvrzení. Larvy váhové kategorie 350 ± 15 mg vykazovaly nejvyšší míru přežití, dokonce i při vyšších administrovaných dávkách. Jedinci kategorie 250 ± 10 mg byli vůči kategorii 350 ± 15 mg méně odolní, avšak odolnější než larvy v kategorii 450 ± 15 mg. Zjevně, skupina o nejvyšší váze (450 ± 15 mg) vykazuje ve srovnání s ostatními skupinami nejvyšší citlivost, pokud jsou administrovány vyšší, zároveň toxičtější, množství DMSO.

Administrovaná dávka: 12,571 g/kg



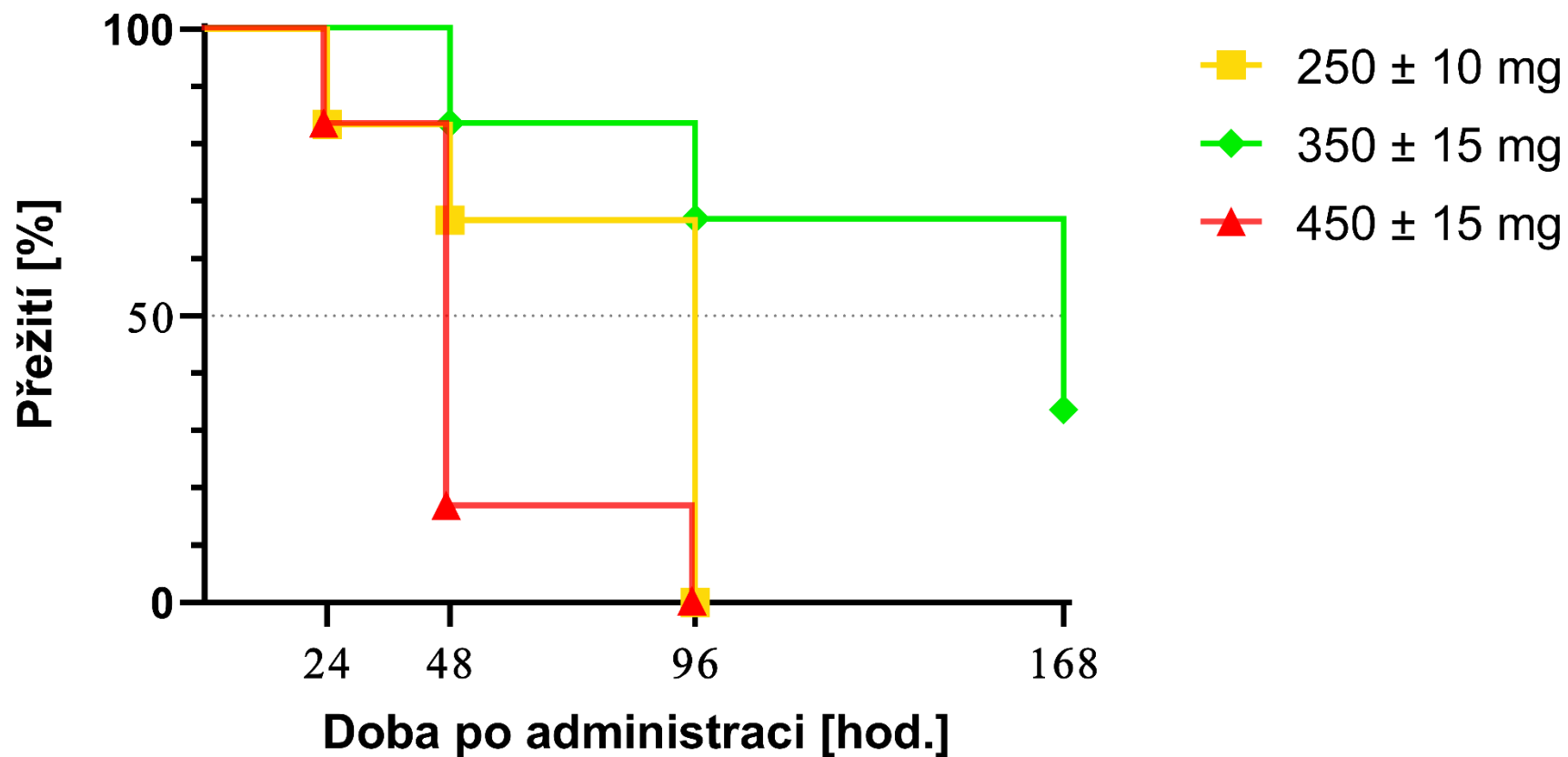
Graf 7: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 12,571 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$ (Celkový počet jedinců na experiment – $n_\Sigma = 30$).

Administrovaná dávka: 15,714 g/kg



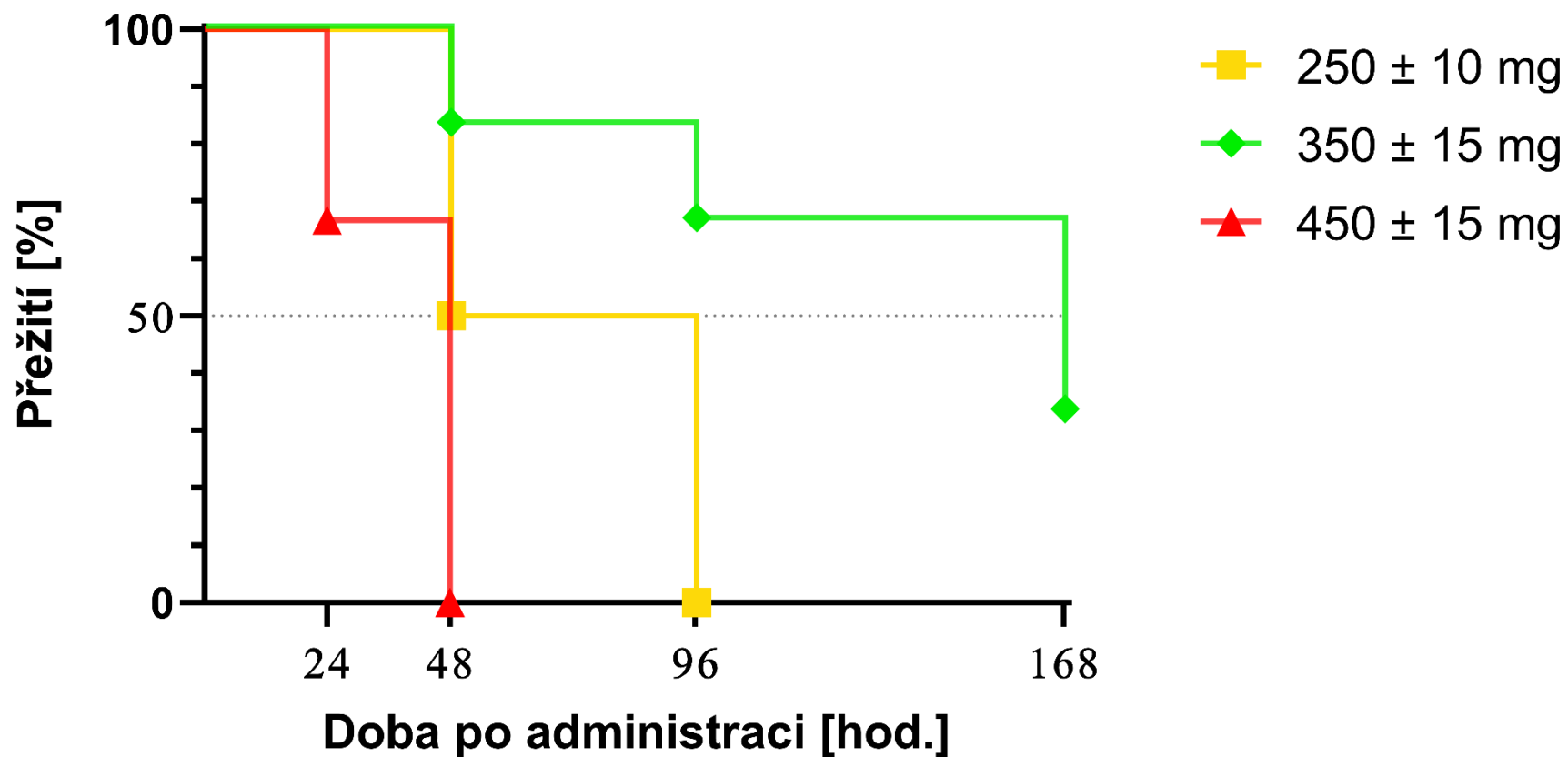
Graf 8: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 15,714 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$ (Celkový počet jedinců na experiment – $n_\Sigma = 30$).

Administrovaná dávka: 18,85 g/kg



Graf 9: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 18,85 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkový počet jedinců na experiment – $n_{\Sigma} = 30$.

Administrovaná dávka: 22,0 g/kg



Graf 10: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 22,0 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkový počet jedinců na experiment – $n_{\Sigma} = 30$.

9.4. Skórovací systém HISS (Health Index Score System)

Datové výstupy z hodnocení při zavedení systému HISS byly vypracovány dvojitým způsobem: horizontálními sloupcovými grafy (Graf 11-28) a spojnicovými grafy (Graf 29-34).

Horizontálními sloupcovými grafy, tedy Graf 11-28 jsou prezentována jednotlivá skóre pro každé testovací zvíře zvlášť, tedy pro všech 108 larev v celém experimentu, včetně dvou kontrolních skupin, a to ve všech čtyřech dobách odečtu.

Jak je vidno z těchto grafických prezentací, největší rozdíly při vyhodnocování experimentu pomocí skórovacího systému HISS byly vyzorovány u parametru formování zámotku. Menší odchylky byly zaznamenány i v aktivitě.

Průměrné skóre vychází ze součtu všech jednotlivých hodnot skóre HISS každého jedince skupiny, včetně uhynulých larev, který byl vydělen počtem sledovaných jedinců, též včetně uhynulých, ve vybrané době odečtu. Larvy, které byly již dříve vyhodnoceny jako mrtvé, nejsou již v navazujících dobách odečtu zahrnuty do výpočtu.

Pro někoho může být překvapivé, že pro tyto experimenty byl použit velmi malý počet jedinců na jednu skupinu ($n_i = 6$). Cílem této práce bylo z výsledků od co nejmenšího počtu použitých zvířat získat maximum dat. I proto zde byl zaveden skórovací systém HISS, díky čemuž bylo obdrženo mnohem více informací o toxickém vlivu noxy na testovací subjekty. Čímž je tato práce v souladu s jedním z principů „Tří R“, zvaným redukce.

9.4.1. Váhová kategorie 250 ± 10 mg

9.4.1.1. Odečet po 24 hodinách

Jak je patrné z Grafu 11, k úhynu larev (vždy po jedné larvě) došlo po 24 hodinách u skupin s administrovanou dávkou DMSO odpovídající 15,714 a 18,85 g/kg larvy.

Může se zdát zarážející, že nedošlo k úhynu u skupiny s největší administrovanou dávkou (22,0 g/kg), na dané věci může mít vliv zařazení nižšího počtu larev do skupin. K zařazení nižšího počtu larev do skupin se v rámci této předběžné studie přistoupilo rovněž z důvodu etických.

Nicméně, dvě úmrtí (administrovaná dávka 15,714 g/kg; 18,85 g/kg) výrazně ovlivnila příslušné průměrné hodnoty skóre HISS (\bar{x}). Ve druhé skupině (15,714 g/kg) činila výsledná průměrná hodnota 6,83 bodů. Avšak pokud se vypočítá průměr pouze skóre HISS u přeživších larev, činila by tato hodnota 8,2 bodů, tedy o 1,37 bodů více. Ve třetí skupině (18,85 g/kg) dosahovala výsledná průměrná hodnota 5,75 bodů. Pokud by se zprůměrovalo pouze skóre HISS u živých larev, činila by tato hodnota 6,9 bodů, tedy o 1,15 bodů více.

Co se týče jejich pohybové aktivity, největší byla zaznamenána u dvou skupin s nejnižšími administrovanými dávkami (12,571 a 15,714 g/kg).

Rovněž je patrné, že u první skupiny došlo k tvorbě zámotku u čtyř ze šesti zařazených jedinců, u druhé skupiny jen u dvou larev ze šesti. U třetí skupiny (18,85 g/kg) pouze jedna larva vytvořila zámotek již po 24 hodinách. Ve skupině s nejvyšší administrovanou dávkou neformovala ani jedna larva kokon. Ani jedna larva z celé váhové kategorie nevykazovala po 24 hodinách žádné známky melanizace. Závěrem lze tedy dedukovat, že s ohledem na velikost administrované noxy (DMSO), nejlépe korespondoval znak jako je pohyb a schopnost tvořit zámotek. Lze rovněž konstatovat, že průměry z HISS skóre s velikostí administrované noxy nekorespondovaly.

9.4.1.2. Odečet po 48 hodinách

Po 48 hodinách od administrace DMSO (Graf 12) došlo k prvnímu úhynu u skupiny s nejmenší dávkou DMSO (12,571 g/kg). Dále pak bylo zaznamenáno druhé

úmrtí ve skupině s dávkou 18,85 g/kg. Ve skupině 22,0 g/kg uhynuli dokonce tři jedinci ze šesti najednou. Skupina 15,714 g/kg se obešla bez úmrtí.

Největší aktivitu vykazovaly dvě larvy z první skupiny (12,571 g/kg) a jedna z druhé skupiny (15,714 g/kg). Minimální aktivitu vykazovala pouze jedna larva, a to ze třetí skupiny. Ostatní živí jedinci se pohybovali pouze po stimulaci larvy pomocí plastové špičky.

Kokon formovala polovina jedinců z první skupiny, tedy tři larvy, poté čtyři jedinci z druhé skupiny a pouze jedna larva, která patřila do třetí skupiny. Ve čtvrté skupině ani jeden jedinec ze zbylých tří larev neformoval zámotek.

Pokud jde o melanizaci, většina z přeživších jedinců nevykazovala známky melanizace. Pouze na jedné larvě ze druhé skupiny byly pozorovány méně jak tři skvrny na béžovém těle. Všichni čtyři přeživší jedinci ze třetí skupiny měli béžové tělo, jeden byl zcela bez melanizace a na třech se vyskytly více než tři skvrny.

Markantní ovlivnění průměrného skóre HISS bylo zjištěno u čtvrté skupiny (22,0 g/kg), kdy všichni tři přeživší dosahovali osm bodů z deseti, avšak mrtví jedinci s nula body snížili průměrnou hodnotu skóre HISS na polovinu, tedy na čtyři body. Podobný jev byl pozorován u první skupiny, kde všechny živé larvy obdržely po devíti bodech, avšak vlivem jednoho úmrtí se celkový průměr skóre HISS této skupiny snížil o jednu šestinu, tedy na 7,5 bodů.

Z těchto výsledků lze vyvodit, že v tomto případě již byla zaznamenána větší korelace mezi průměrem ve skóre HISS a velikostí administrovaných dávek. Rovněž i zde lze pozorovat, že je nejvyšší korelace s velikostí administrované dávky a tvorbou zámotku.

9.4.1.3. Odečet po 96 hodinách

Po uplynutí 96 hodin od administrace (Graf 13) došlo k úhynu všech zbylých jedinců ze třetí (čtyři larvy) a čtvrté skupiny (tři larvy), do kterých byly administrovány v přepočtu nejvyšší dávky DMSO. Což lze vyjádřit i tak, že po 96 hodinách od administrace DMSO došlo ve třetí skupině při druhé nejvyšší dávce (18,85 g/kg) k úmrtí dvou třetin (66,67 %) z celkového počtu jedinců a u čtvrté skupiny při nejvyšší dávce (22,0 g/kg,) se jednalo jen o polovinu (50 %).

Žádná z přeživších larev, tedy z první a ze druhé skupiny, nevykazovala známky melanizace. Jedna larva z první skupiny vykazovala sice minimální aktivitu, zato však formovala kokon. Ostatní z první skupiny se pohybovaly až po stimulaci plastovou špičkou, kromě jedné z nich začaly tvořit zámotek.

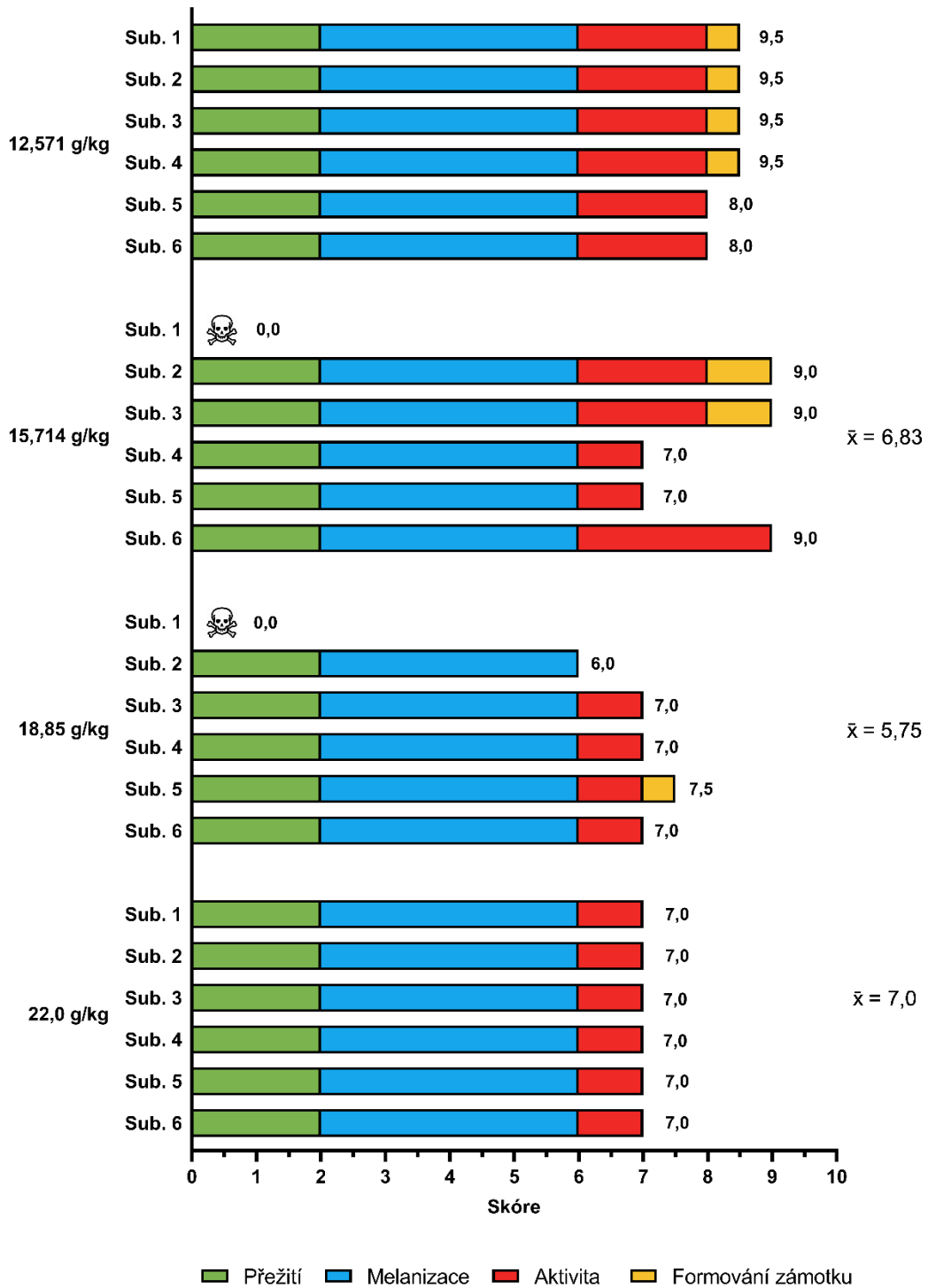
Průměrné skóre HISS v těchto dvou skupinách bylo ve srovnání s hodnotami jejich přeživších larev opět o jednu šestinu nižší, jelikož došlo v každé skupině k úhynu po jedné larvě.

9.4.1.4. Odečet po 168 hodinách

Na konci experimentu (tedy po 168 hodinách od administrace) bylo možné hodnotit pouze první a druhou skupinu (Graf 14). V každé skupině došlo po jednom úhynu, žádná larva nejevila známky melanizace.

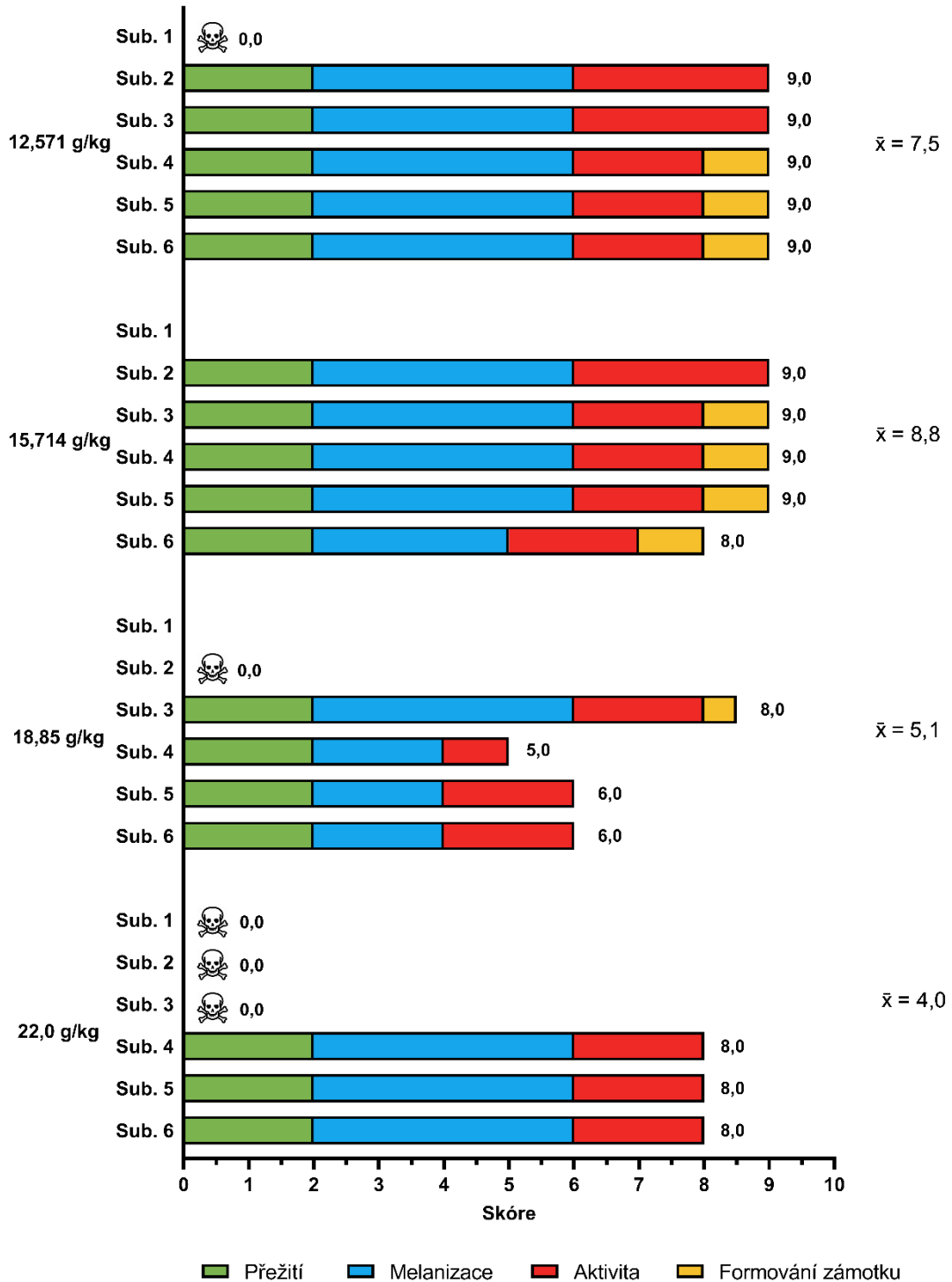
Kromě jedné larvy z první skupiny, nebylo možné hodnotit aktivitu larev, jelikož vytvořily už plný zámotek, přes který se pohyb nedá náležitě ohodnotit. Souhrnné průměry skóre HISS opět neodrážely zdraví přeživších jedinců (u obou skupin byl stejný, a to $\bar{x} = 5,25$, avšak každá živá larva dosáhla sedmi bodů).

Váhová kategorie 250 mg po 24 hodinách



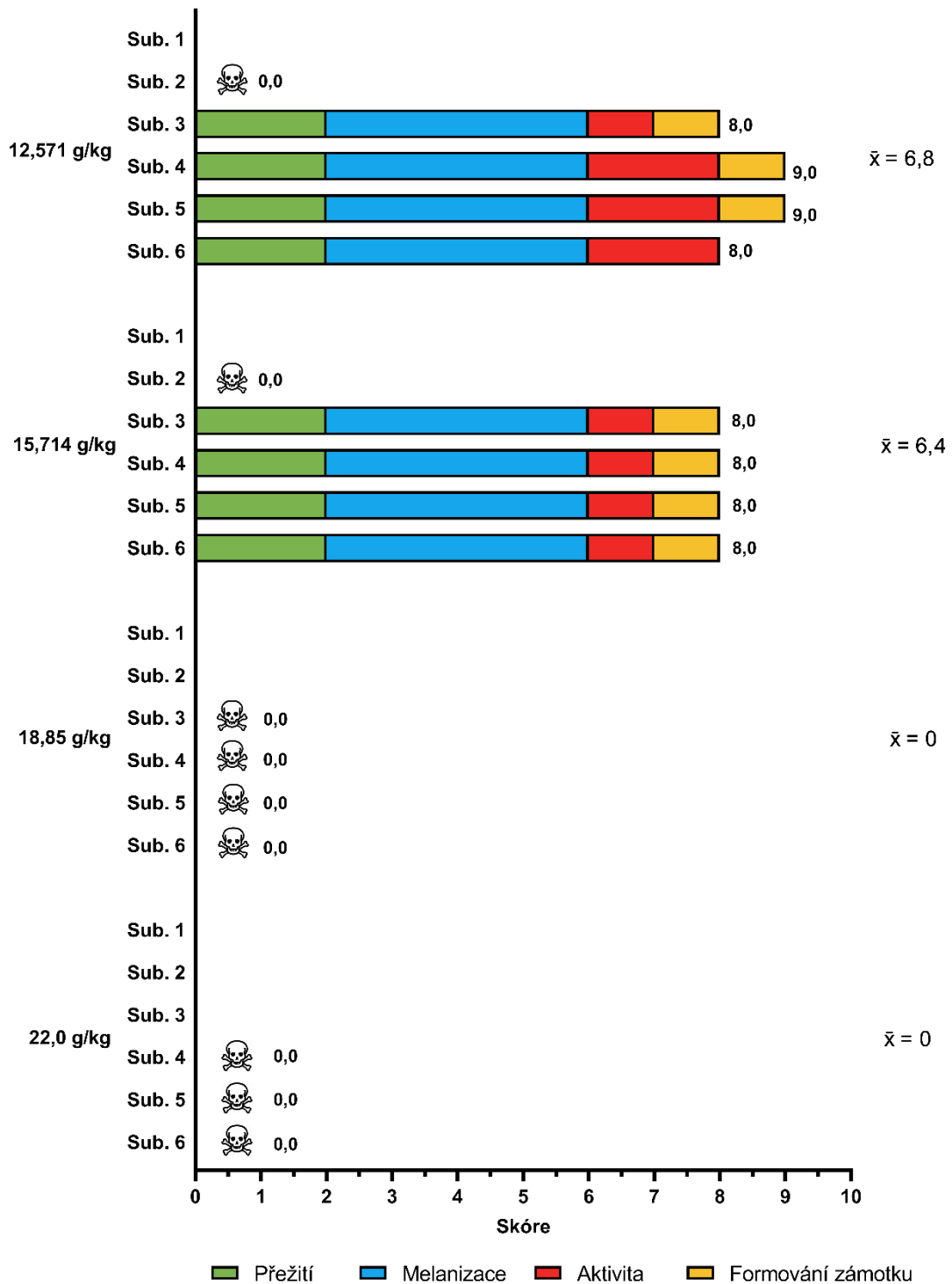
Graf 11: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larev v daném čase.

Váhová kategorie 250 mg po 48 hodinách



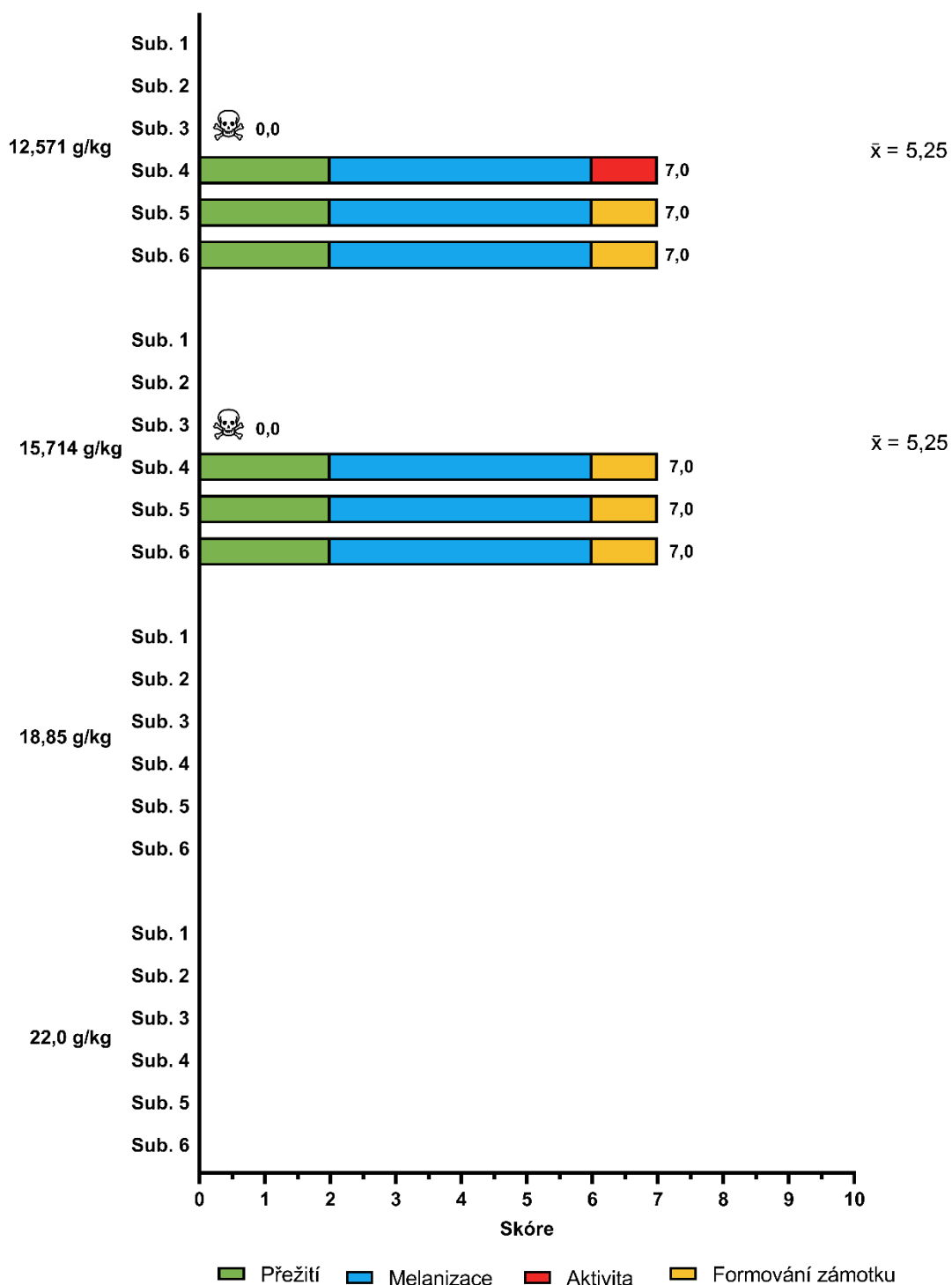
Graf 12: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larev v daném čase.


Váhová kategorie 250 mg po 96 hodinách



Graf 13: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 250 mg po 168 hodinách



Graf 14: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol  vyjadřuje úmrtí subjektu v daném čase

9.4.2. Váhová kategorie 350 ± 15 mg

9.4.2.1. Odečet po 24 hodinách

Z Grafu 15 lze vyčíst, že 24 hodin od začátku experimentu došlo k úhynu pouze jedné larvy, překvapivě však ze skupiny, které byla administrována nejnižší dávka DMSO (12,571 g/kg). Ostatní larvy celé váhové kategorie dosahovaly relativně vysokých skóre HISS, od 7,5 do 9,5 bodů, i proto, že ani na jedné z nich nebyly spatřeny známky počínající melanizace.

Normální pohybovou aktivitu vykazovali všichni živí jedinci z první skupiny, ale i čtyři jedinci z druhé skupiny (dávka 15,714 g/kg). Zbylé dvě larvy ze druhé skupiny potřebovaly stimul k pohybu pomocí plastové špičky, stejně tak jako čtyři jedinci ze třetí skupiny (dávka 18,85 g/kg) a polovina jedinců ze čtvrté skupiny (dávka 22,0 g/kg), tedy tři larvy.

Počínající formování zámotku bylo evidováno u čtyř z pěti živých jedinců v první skupině, u čtyř larev ze druhé, u tří larev ze třetí, dále i u pěti larev ze čtvrté skupiny, které byla podána nejvyšší dávka DMSO (22,0 g/kg). Ve skupině 15,714 g/kg bylo formování zaznamenáno právě u těch dvou larev, které vykazovaly pohybovou aktivitu až po aplikaci stimulu. Skupina 18,85 g/kg vykazovala podobný trend, kdy známky formování zámotku se opět vyskytly právě u všech tří larev, které k vyvolání pohybové aktivity potřebovaly stimul.

9.4.2.2. Odečet po 48 hodinách

Ani po 48 hodinách nedošlo k zásadním změnám, jak je vidět z Grafu 16. Úmrtí byla pouze dvě, ve třetí a čtvrté skupině vždy po jednom jedinci.

Počínající melanizace byla zaznamenána pouze u druhé a čtvrté skupiny, a to po jednom jedinci, na jejichž béžovém těle se vyskytly méně jak tři tmavé skvrny.

Aktivita byla také vesměs v celé váhové kategorii obdobná. Kromě pěti jedinců, a to jednoho z první, dvou ze třetí a dvou ze čtvrté skupiny, všechny larvy potřebovaly k vyvolání pohybové aktivity decentní stimul plastovou špičkou. Právě u výše zmíněných pěti larev se ani pomocí stimulu nepodařilo vyvolat pohyb, i přesto vykazovaly alespoň minimální aktivitu. Avšak u těchto pěti jedinců nebylo zaznamenáno formování zámotku.

Zámotky vytvořilo celkem 15 subjektů, čtyři z první skupiny, pět ze druhé, tři ze třetí a tři larvy ze čtvrté skupiny. Každé z nich, vyjma jedné larvy ze čtvrté skupiny, bylo přiděleno skóre HISS o devíti bodech. Právě ta jedna larva ze čtvrté skupiny dosáhla pouze na osm bodů, jelikož se u ní začaly projevovat mírné známky melanizace (méně jak tři skvrny na béžovém těle).

Zaznamenaná úmrtí, tedy ve třetí i čtvrté skupině, měla opět vliv na průměrné bodové ohodnocení skupiny ($\bar{x}_{18,85} = 6,83$, $\bar{x}_{22,0} = 6,67$). Nicméně, hodnoty přeživších larev z těchto dvou skupin nebyly ucelené. Ve třetí skupině se vyskytly tři larvy s devíti a dvě larvy se sedmi body HISS. Ve čtvrté skupině pouze dvě larvy dosáhly devíti bodů HISS, jedna osmi a dvě sedmi bodů. U první i druhé skupiny byla průměrná skóre HISS ($\bar{x}_{12,571} = 8,6$; $\bar{x}_{15,714} = 8,67$) relativně podobná jednotlivým hodnotám skóre HISS. Čtyři jedinci z první skupiny dosáhli devíti bodů a jedna sedmi. Ta totiž vykazovala minimální pohybovou aktivitu a neformovala zámotek. Ve druhé skupině byl obdobný trend, kdy pět subjektů bylo ohodnoceno devíti body a jedna sedmi, jenž sice vykazovala pohybovou aktivitu po aplikaci stimulu, avšak neformovala zámotek a byly na ní pozorovány méně jak tři skvrny na béžovém těle.

9.4.2.3. Odečet po 96 hodinách

Graf 17 je věnován odečtu po 96 hodinách od administrace DMSO. V této době bylo v každé skupině zaznamenáno alespoň jedno úmrtí. Konkrétně dva úhyny byly zaznamenány ve druhé skupině, v ostatních skupinách se jednalo právě jen o jeden úhyn. V tomto časovém bodě byla u této váhové kategorie vyhodnocena různorodá skóre HISS.

Známky melanizace, konkrétně více jak tři skvrny na béžovém těle, byly zaznamenány u celkem tří subjektů: z první, třetí a čtvrté skupiny, vždy po jednom jedinci. Nadto, u jedné larvy ze čtvrté skupiny byly pozorovány skvrny tentokrát již na hnědém těle, tudíž tato larva obdržela za melanizaci nula bodů. Jelikož vykazovala i minimální aktivitu, předvídal se u ní brzký exitus.

Co se týče parametru aktivity, pohyb vyvolaný stimulací byl zaznamenán u čtyř larev z první skupiny, tří ze druhé a po jednom subjektu ze třetí i čtvrté skupiny. Plný zámotek vytvořily všechny přeživší larvy ve skupině s nejnižší administrovanou dávkou DMSO. Dále byl plný zámotek pozorován i u ostatních skupin, a to po jednom subjektu ze druhé a ze třetí skupiny. Ve skupině s nejvyšší administrovanou dávkou DMSO se plný

zámotek vyskytoval dokonce u dvou subjektů. Zato částečné formování zámotku bylo pozorováno u tří jedinců ze druhé a jednoho ze třetí skupiny. U dvou larev ze třetí a také u dvou ze čtvrté nebylo možné vyhodnotit jejich aktivitu. Téměř všechny larvy z váhové kategorie 350 ± 15 mg vykazovaly určitou formu formování kokonu, avšak pouze u jednoho subjektu ze třetí a dvou ze čtvrté skupiny nebyla pozorována ani částečná tvorba kokonu.

Průměrná skóre HISS byla opět ovlivněna úhynem larev. U první ani u druhé skupiny tyto hodnoty ($\bar{x}_{12,571} = 6,8$; $\bar{x}_{15,714} = 5,58$) neodpovídaly relativně vysokým bodovým ohodnocením jednotlivých přeživších larev. V první skupině dosáhly tři larvy devíti bodů a jedna sedmi, ve druhé skupině obdržely tři larvy osm a půl bodu a jedna larva osm bodů. Ve třetí i ve čtvrté skupině nebyla jednotlivá skóre HISS živých jedinců jednotná, tudíž ten samý pohled není možné v tomto případě aplikovat.

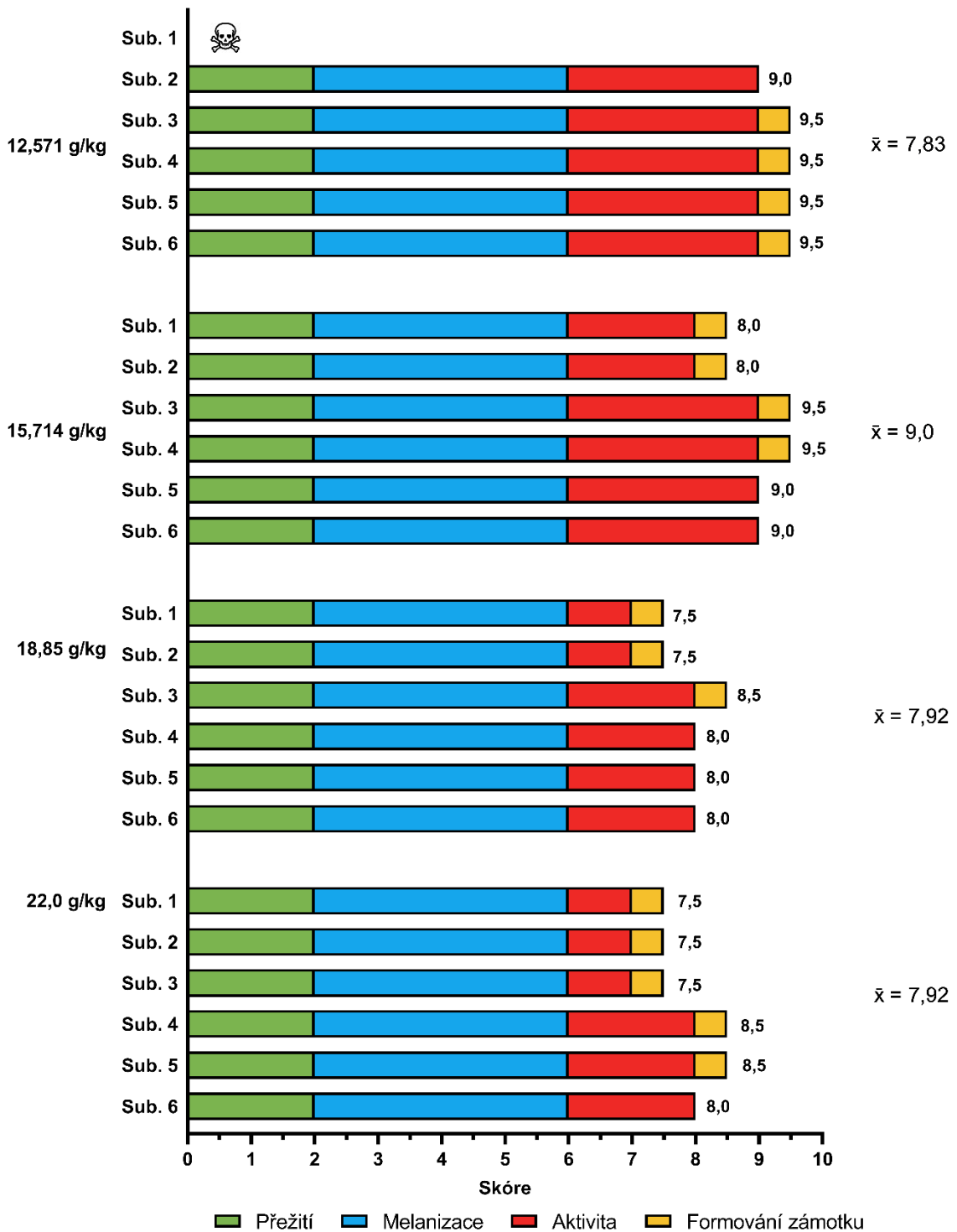
9.4.2.4. Odečet po 168 hodinách

Markantní změny byly zpozorovány na konci experimentu, jak je možné vidět z Grafu 18. V tomto čase bylo odečteno dohromady sedm úmrtí: po dvou v první, třetí i čtvrté skupině, ale ve druhé skupině uhynula pouze jedna larva. Celý experiment tedy přežili pouze dva subjekty z první (33,33 %), tři ze druhé skupiny (50 %) a vždy po dvou subjektech ze třetí a ze čtvrté skupiny (33,33 %).

Všechny z živých larev vytvořily plný zámotek. Melanizaci přes kokon bylo ještě možné vyhodnotit u druhé a třetí skupiny, kdy nebyly zpozorovány známky počínajícího černání. Kokony první a čtvrté skupiny by se musely rozstříhnout, aby se u nich dala melanizace obodovat. Rovněž hodnocení aktivity bylo zkomplikováno vytvořenými zámotky. V tomto případě nebylo možné odečíst pohyb ani u jedné živé larvy z celé váhové kategorie.

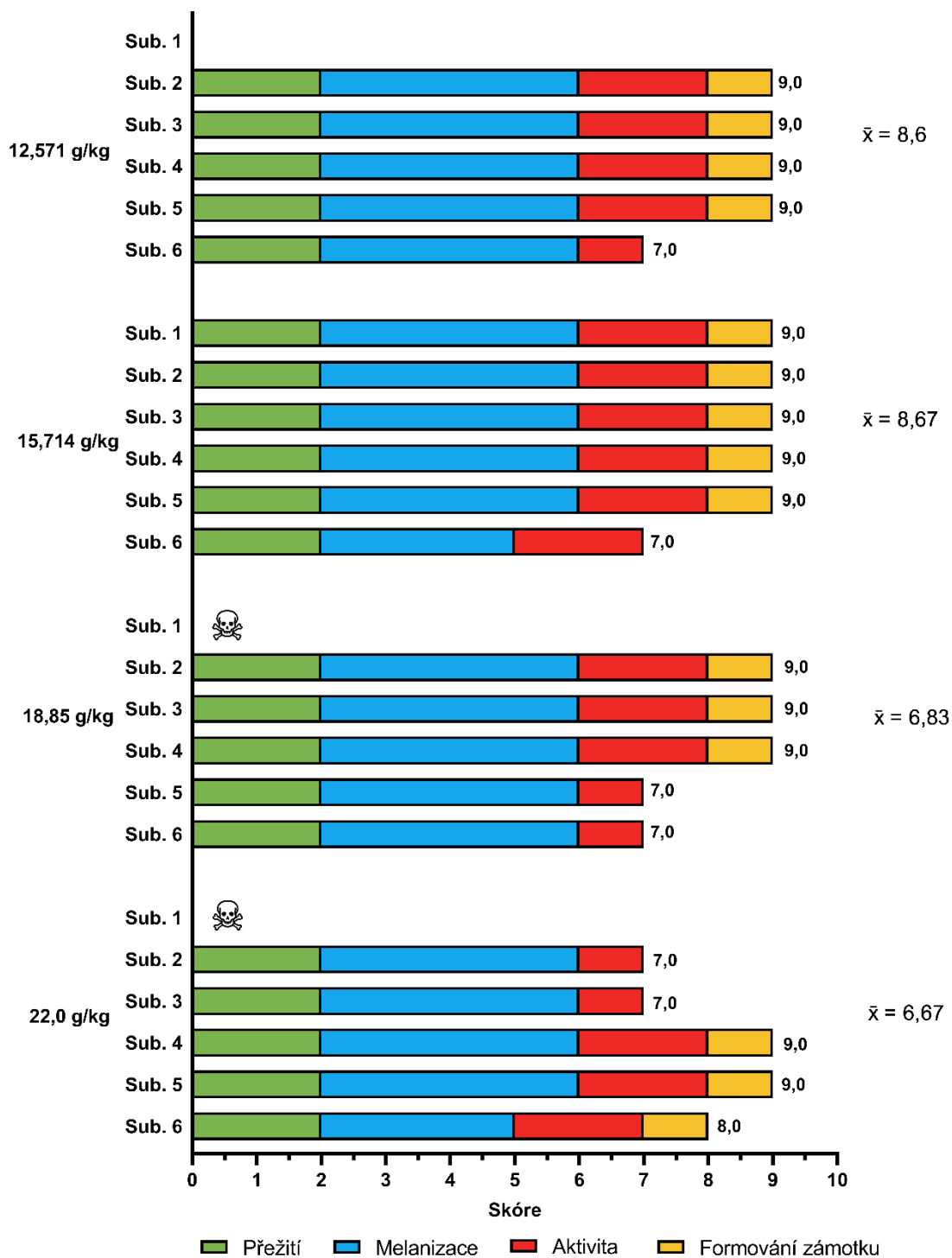
Přesto je nutné připomenout, že larvy se v zámotku během přeměny v kuklu zpravidla nepohybují. Průměrné hodnoty skóre HISS byly významně zkresleny nejen úmrtími, ale i výše nastíněnou problematikou související s nemožností hodnotit určité parametry řádně (pohyb, melanizace) na základě toho, že se vytváří hnědá imobilní kukla.

Váhová kategorie 350 mg po 24 hodinách



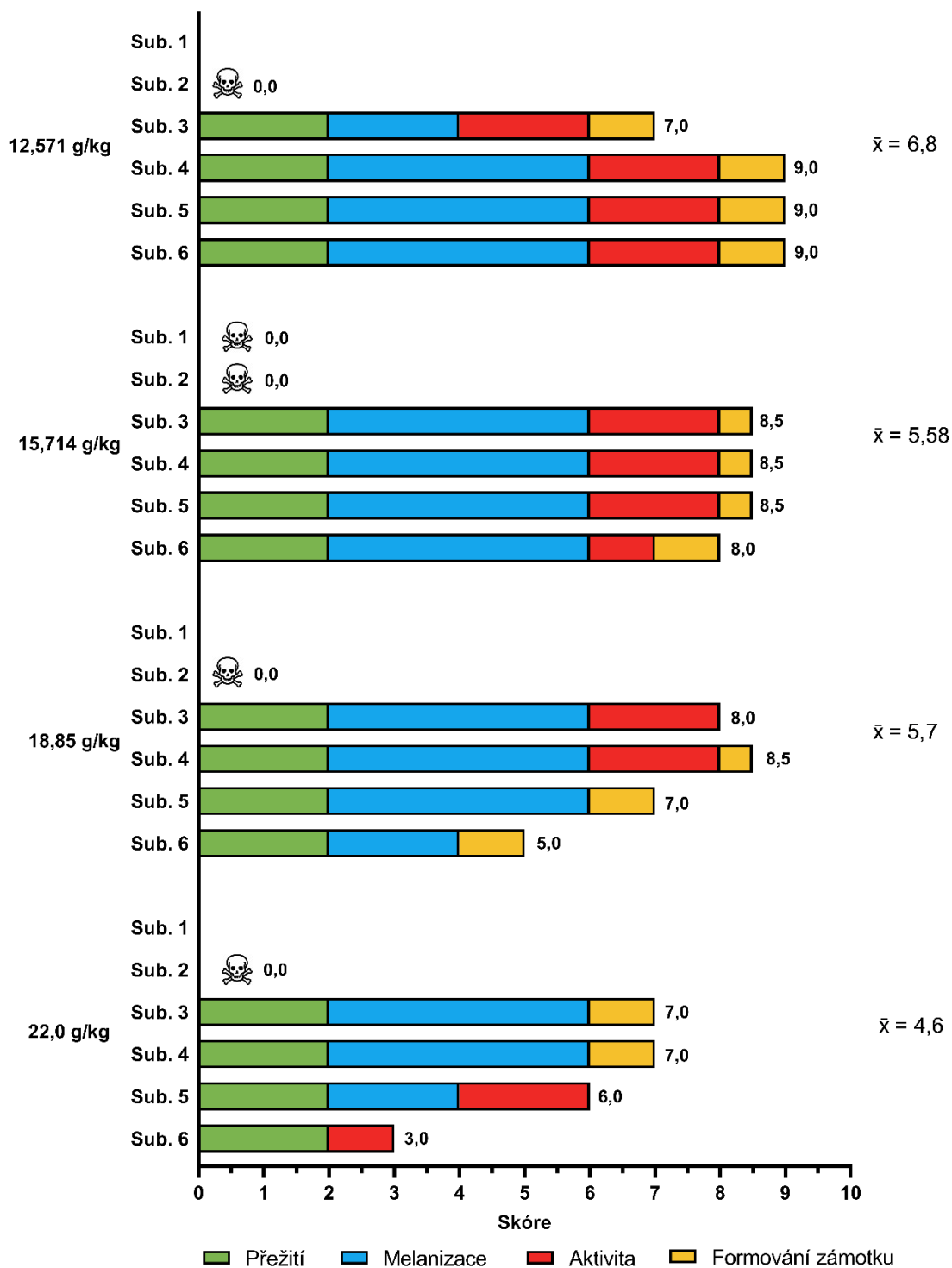
Graf 15: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 350 mg po 48 hodinách



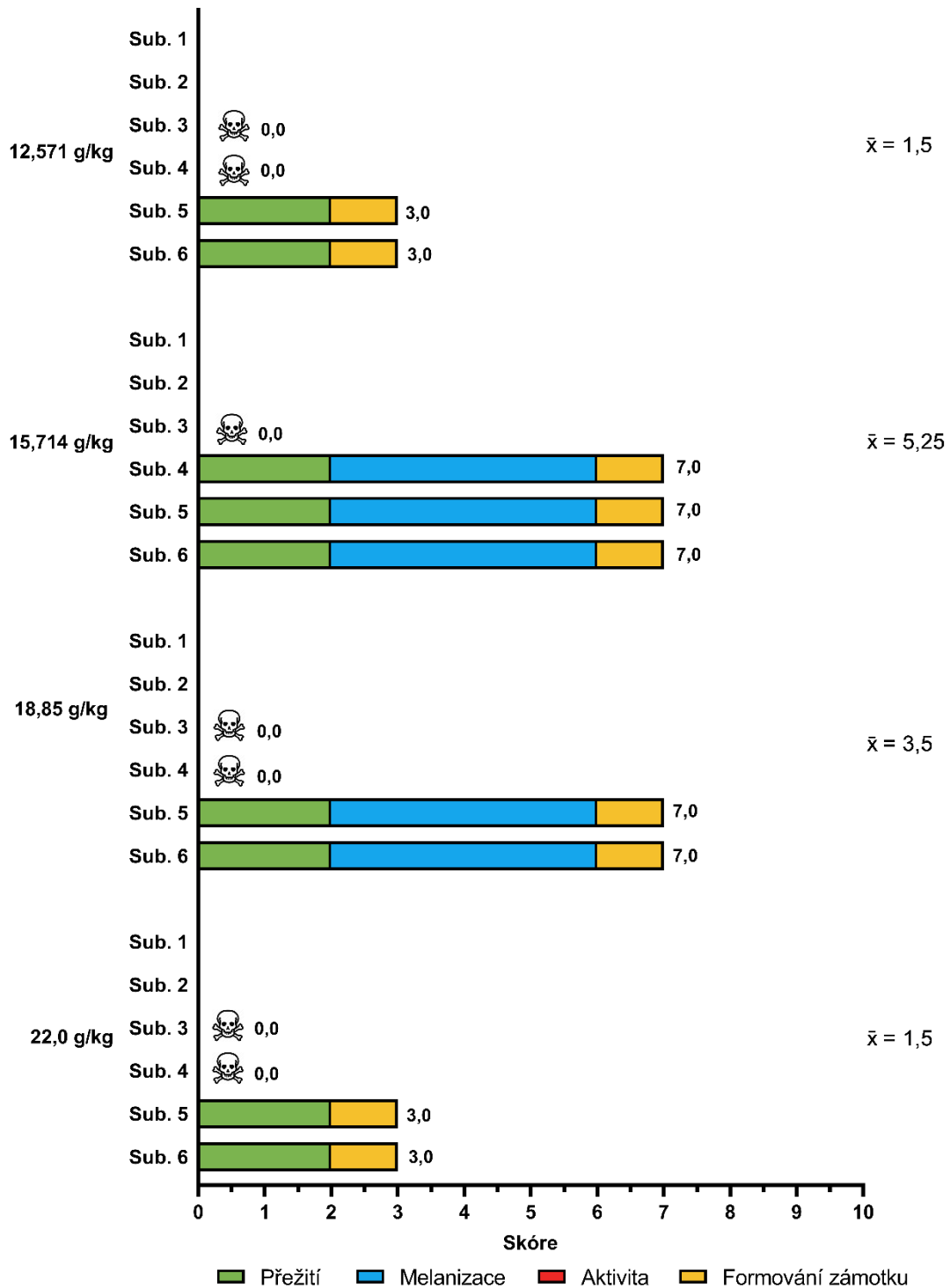
Graf 16: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 350 mg po 96 hodinách



Graf 17: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 350 mg po 168 hodinách



Graf 18: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

9.4.3. Váhová kategorie 450 ± 15 mg

9.4.3.1. Odečet po 24 hodinách

Z Grafu 19 je patrné, že po 24 hodinách od administrace DMSO larvám nejvyšší váhové kategorie došlo k úhynu pouze tří larev, tedy jedné larvy ze skupiny 18,85 g/kg a dvou larev ze skupiny 22,0 g/kg. Nadto, je možné vyzorovat, že zbylí jedinci z těchto dvou skupin nevykazovali žádné známky melanizace a normální pohyb byl vyvolán po decentní stimulaci.

Avšak ani u jedné larvy z těchto dvou skupin nebyly pozorovány známky formování zámotku. Na druhou stranu, nejenže všichni jedinci o administrovaných množstvích DMSO 12,571 g/kg a 15,714 g/kg přežili, dokonce někteří jedinci začali formovat zámotky (ve skupině 12,571 g/kg se jednalo o pět jedinců a u skupiny s dávkou 15,714 g/kg zase o čtyři jedince). Z nich někteří jedinci (dva ze skupiny 12,571 g/kg a tři z 15,714 g/kg) vykazovali pohybovou aktivitu až po jemné stimulaci, avšak aktivita zbylých larev byla v normálu.

9.4.3.2. Odečet po 48 hodinách

Neobvyklá situace byla zaznamenána do Grafu 20, který znázorňuje odečet po 48 hodinách od administrace. Všichni jedinci z dávkových skupin 12,571 g/kg a 15,714 g/kg byli naživu. Mimoto, kromě jedné larvy ze skupiny 15,714 g/kg, všichni jedinci začínali formovat zámotek a dle HISS bylo jejich skóre stanoveno na 9 bodů z deseti. Ta larva, co ještě nejevila známky formování zámotku dosáhla skóre 8 bodů.

Nicméně, jak je dále možné vyčíst z Grafu 20, u druhých dvou skupin, kterým byly administrovány dvě nejvyšší dávky DMSO (18,85 a 22,0 g/kg), došlo k markantnímu úhynu, z nichž zbyla pouze jedna larva, a to ze skupiny s administrovanou dávkou 18,85 g/kg), která dosáhla celkového skóre pěti bodů, jelikož vykazovala alespoň minimální aktivitu a byly na jejím běžovém těle pozorovány ≥ 3 skvrny (melanizace).

9.4.3.3. Odečet po 96 hodinách

Graf 21 ilustruje stav při odečtu v 96. hodině od administrace, kdy byly zaznamenány úhyny i ve skupinách larev o váze 450 ± 15 mg, jimž byla administrována nižší množství DMSO na kilogram živé váhy, tedy 12,571 g/kg a 15,714

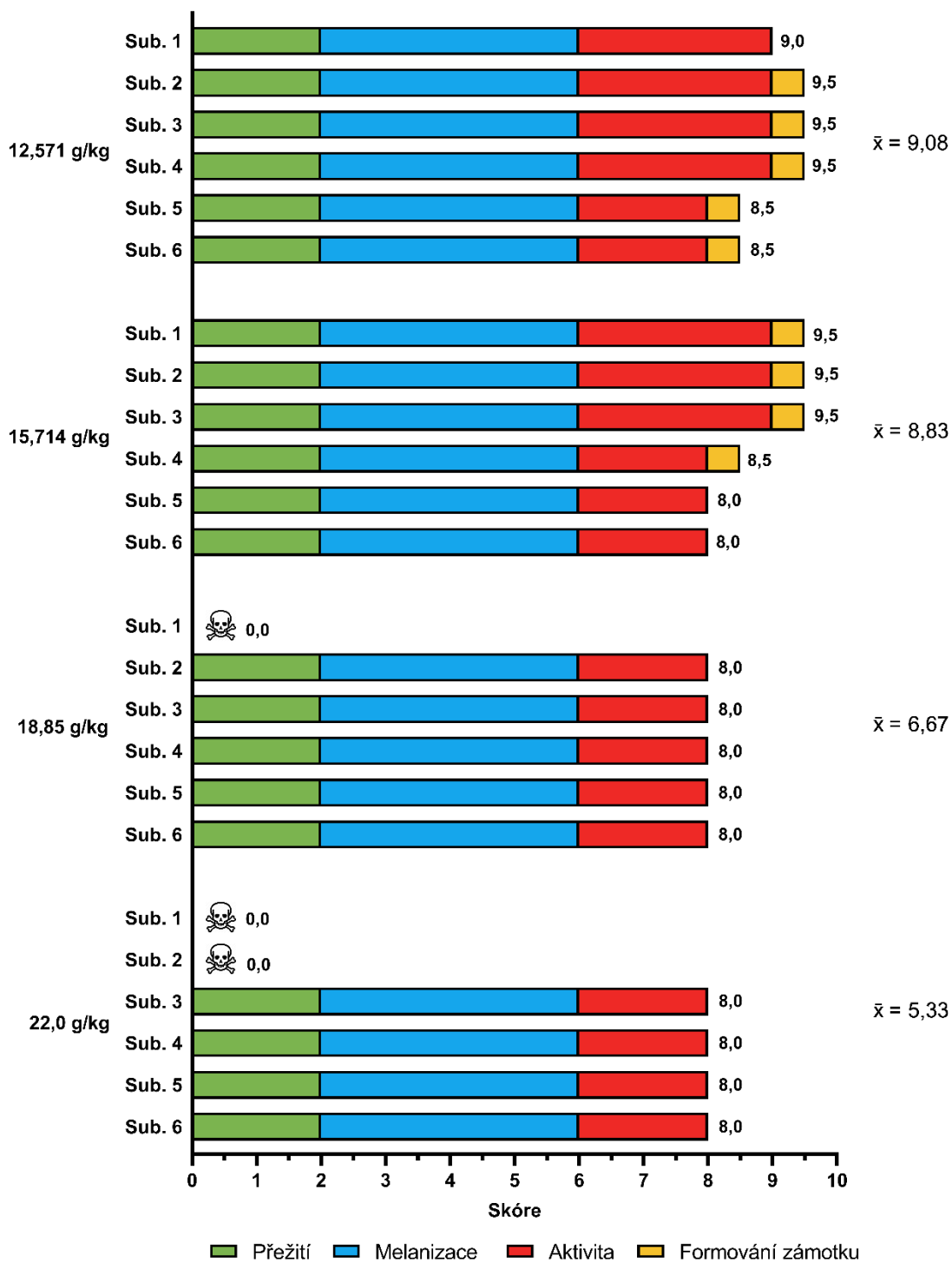
g/kg. Konkrétně, ve skupině s dávkou 12,571 g/kg došlo k úhynu jednoho jedince, a ve skupině s dávkou 15,714 g/kg se jednalo dokonce o úhyn tří jedinců.

Žádná ze zbylých larev, mimo jednoho subjektu ze skupiny o administrované dávce DMSO 12,571 g/kg, nevykazovaly známky melanizace, navíc začaly formovat i kokon. Jedinci s v přepočtu nejmenší dávkou DMSO v experimentu (12,571 g/kg) vykazovali větší pohybovou aktivitu než jedinci s administrovanou dávkou (15,714 g/kg).

9.4.3.4. Odečet po 168 hodinách

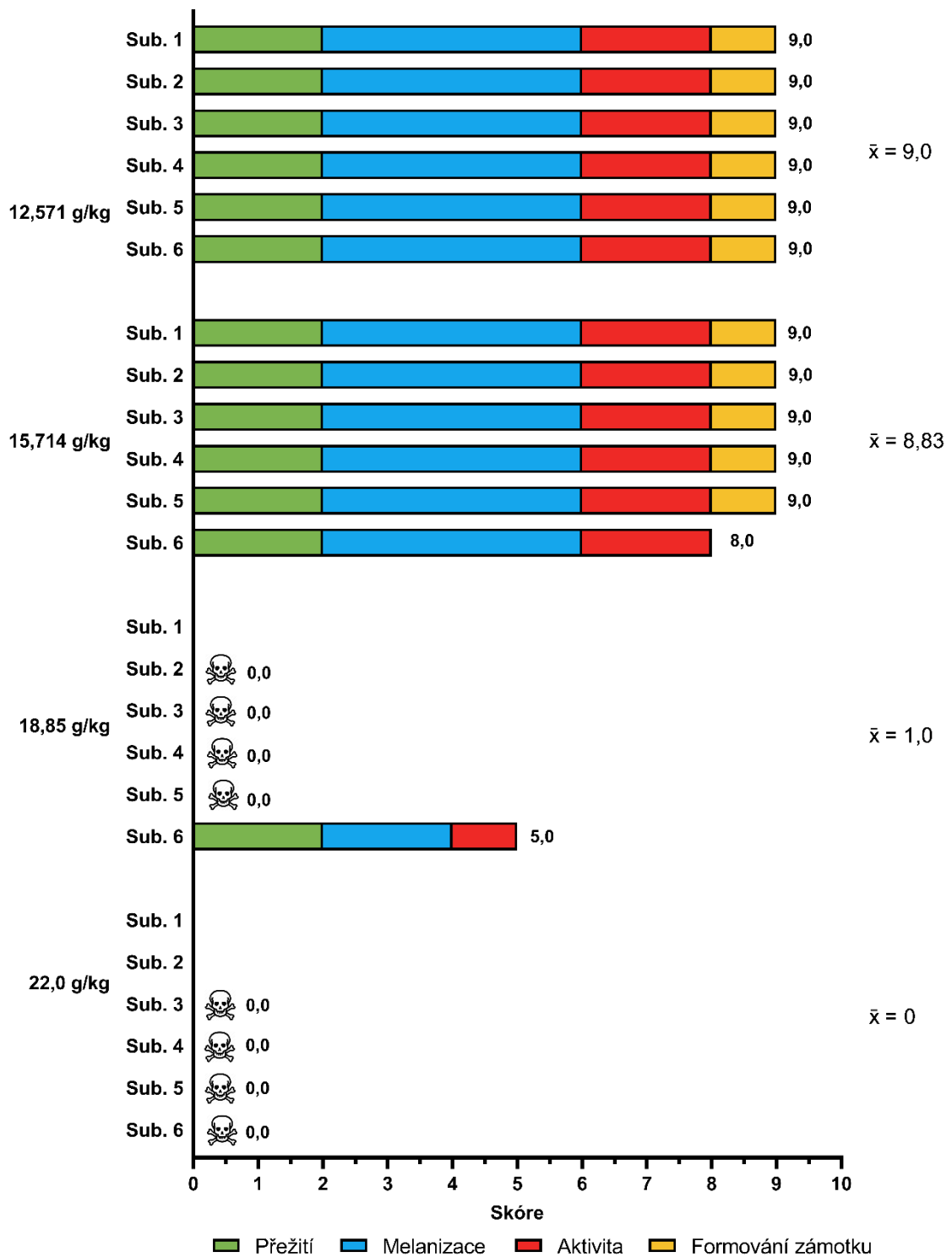
Jak je zachyceno v Grafu 22, po 168 hodinách od administrace uhynuly i poslední tři larvy ze skupiny s dávkou 15,714 g/kg. Všech pět zbylých larev ze skupiny s dávkou 12,571 g/kg přežilo až do konce experimentu. Avšak přeživší larvy se již začaly kuklit, tudíž nebylo opět možné náležitě vyhodnotit dva parametry HISS, a to melanizaci a aktivitu larev.

Váhová kategorie 450 mg po 24 hodinách



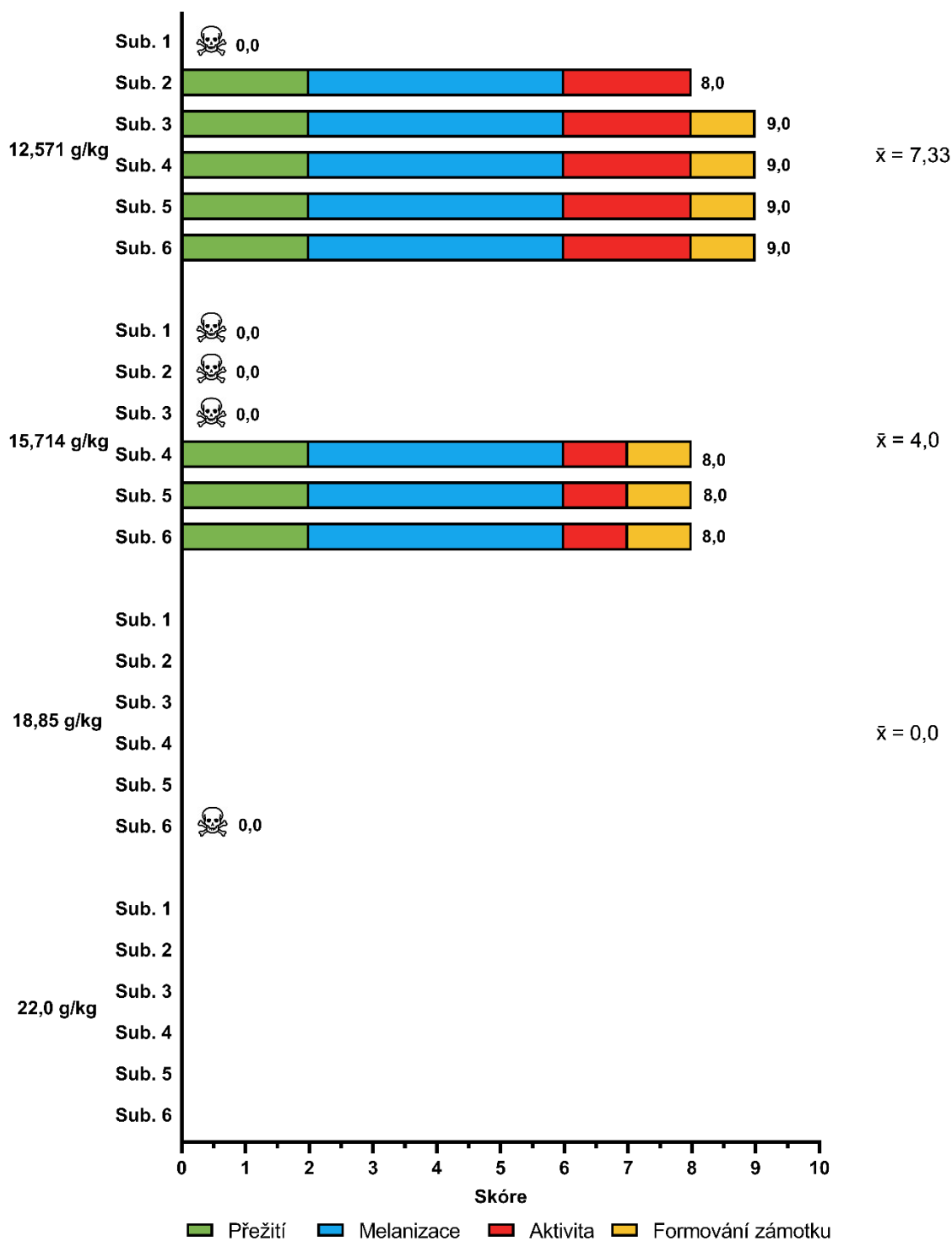
Graf 19: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 450 mg po 48 hodinách



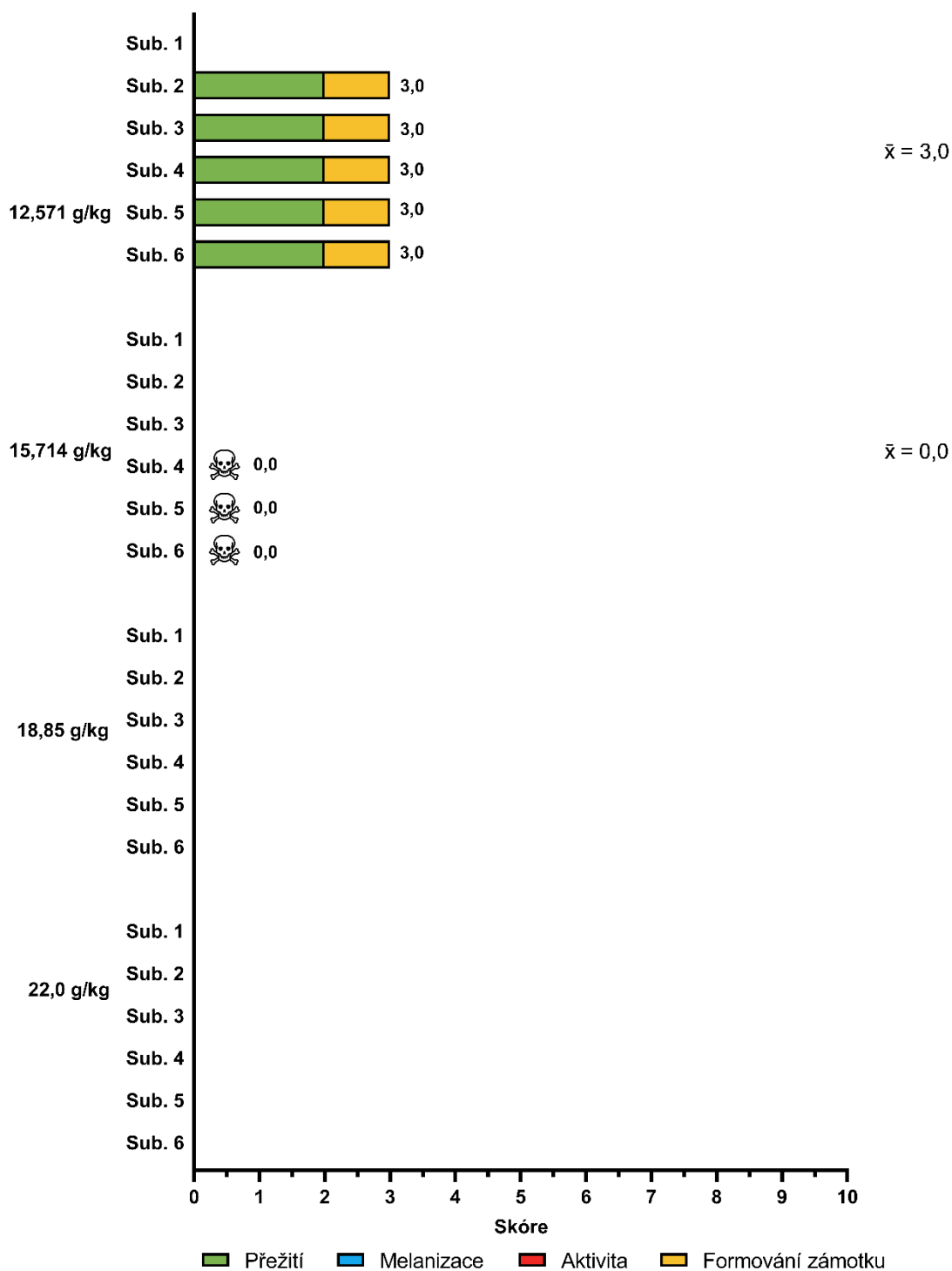
Graf 20: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 450 mg po 96 hodinách



Graf 21: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

Váhová kategorie 450 mg po 168 hodinách



Graf 22: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

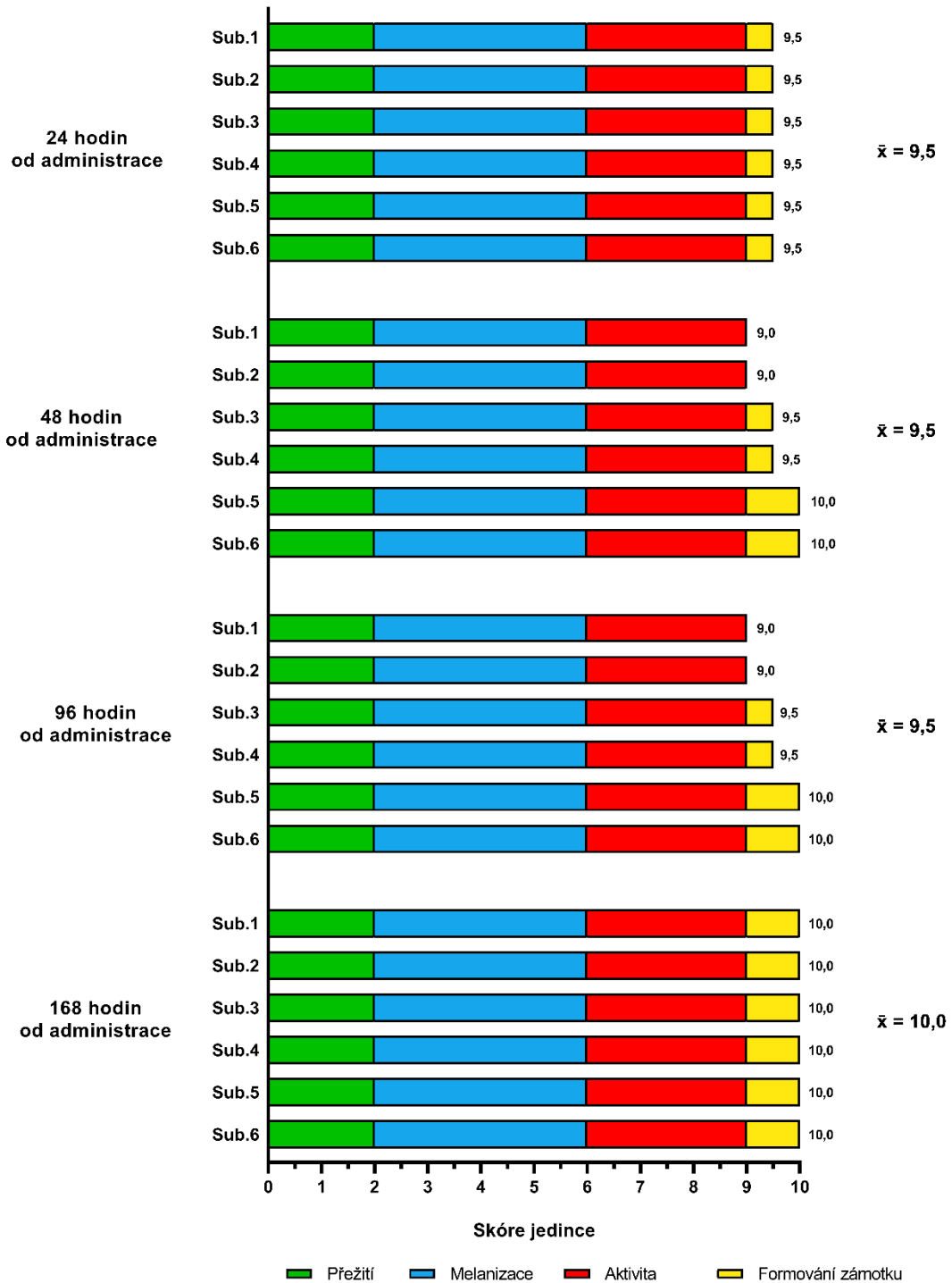
9.4.4. Vyhodnocení obou kontrolních skupin a stanovení skóre HISS

Ze získaných dat (Graf 23-25) vyplývá, že samotná intrahaemocoelická administrace PBS neměla na jedince z kontrolní skupiny o váze 250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg žádný výrazný negativní dopad. Ve skupině o váze 350 ± 15 mg došlo po 168 hodinách od administrace k jednomu úmrtí. Všechny ostatní larvy dosahovaly velmi vysokých skóre HISS, které v žádném čase odečtu nekleslo pod devět bodů. Jak je zjevné z Grafů 26-28, úhyn nebyl zaznamenán ani u larev všech tří váhových kategorií kontrolních skupin, které nebyly podrobeny administraci.

Po porovnání výsledků obou kontrolních skupin, tedy Grafy 23-25 s Grafy 26-28) je evidentní, že ani jednotlivá ohodnocení parametrů HISS kontrolních skupin bez administrace se nijak zvlášť nelišily od kontrolních skupin, které byly podrobeny intrahaemocoelické administraci PBS. U všech kontrolních subjektů (administrace PBS, bez administrace) všech váhových kategorií, vyjma jedné larvy, u které došlo k úhynu, bylo dosaženo HISS skóre 9 bodů a více. Parametry aktivita a melanizace byly u obou kontrolních skupin (živí jedinci) totožné. Nuance byly pozorovány pouze v rámci parametru formování zámotku. V souhrnu, je tak podpořeno tvrzení, že aplikovaný způsob administrace nezkresloval obdržaná data.

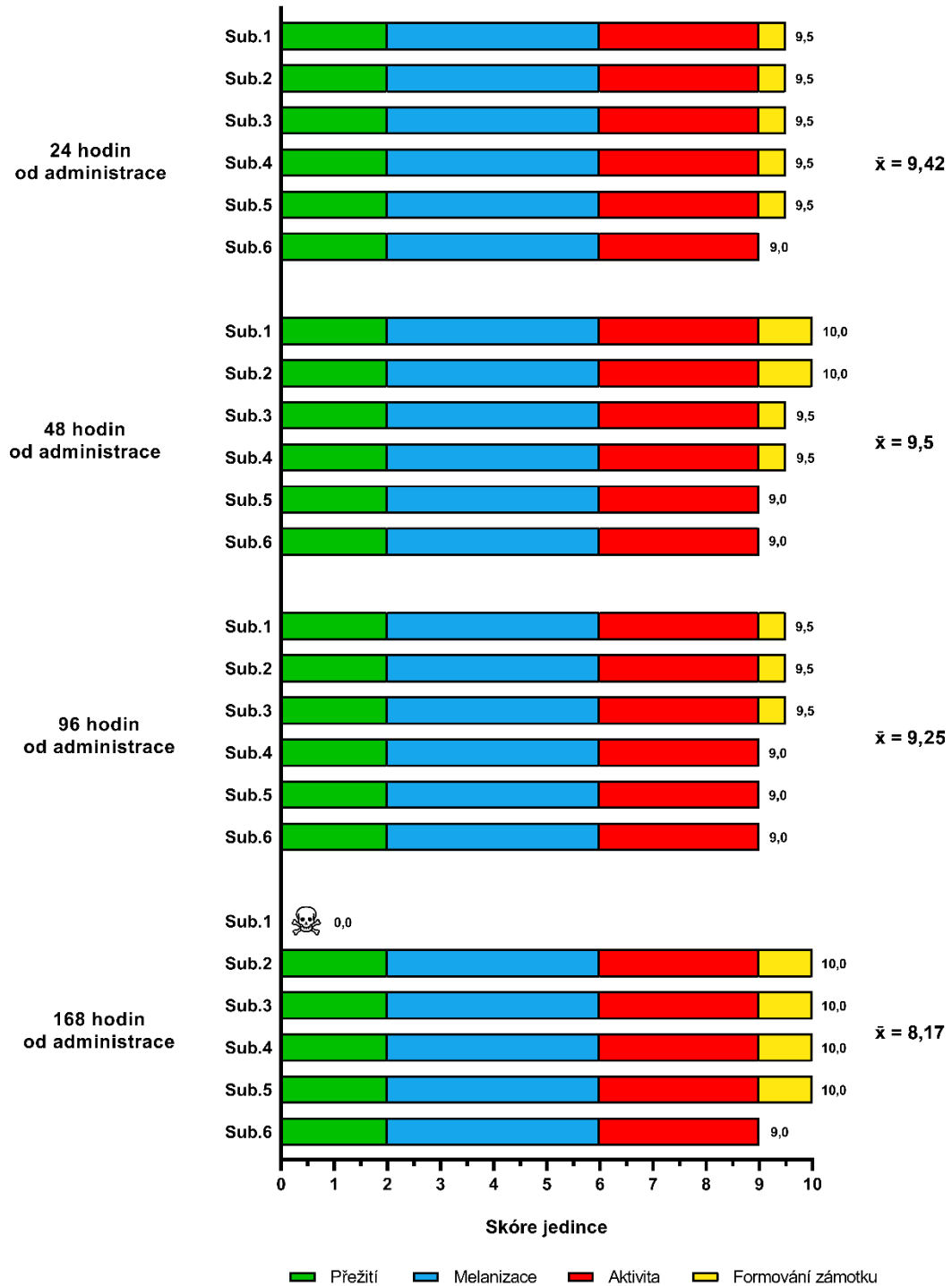
Poněkud zářející je, že častěji formovali zámotky jedinci, kteří podstoupili intrahaemocoelickou administraci než larvy, které nebyly podrobeny žádné administraci. U všech kontrolních váhových skupin s administrovaným PBS došlo při posledním odečtu (po 168 hodinách od administrace) k tvorbě plného zámotku u 15 ze 17 jedinců, tj. u 88,24 % přeživších jedinců. U kontrolních váhových skupin, které nebyly vystavených žádné administraci, vytvořilo plný kokon 11 z 18 jedinců (tj. 61,11 % jedinců). Na zbylých sedmi larvách nebyly pozorovány známky formování zámotku.

**HISS kontrolní skupina:
administrace pouze PBS, 250 ± 10 mg**



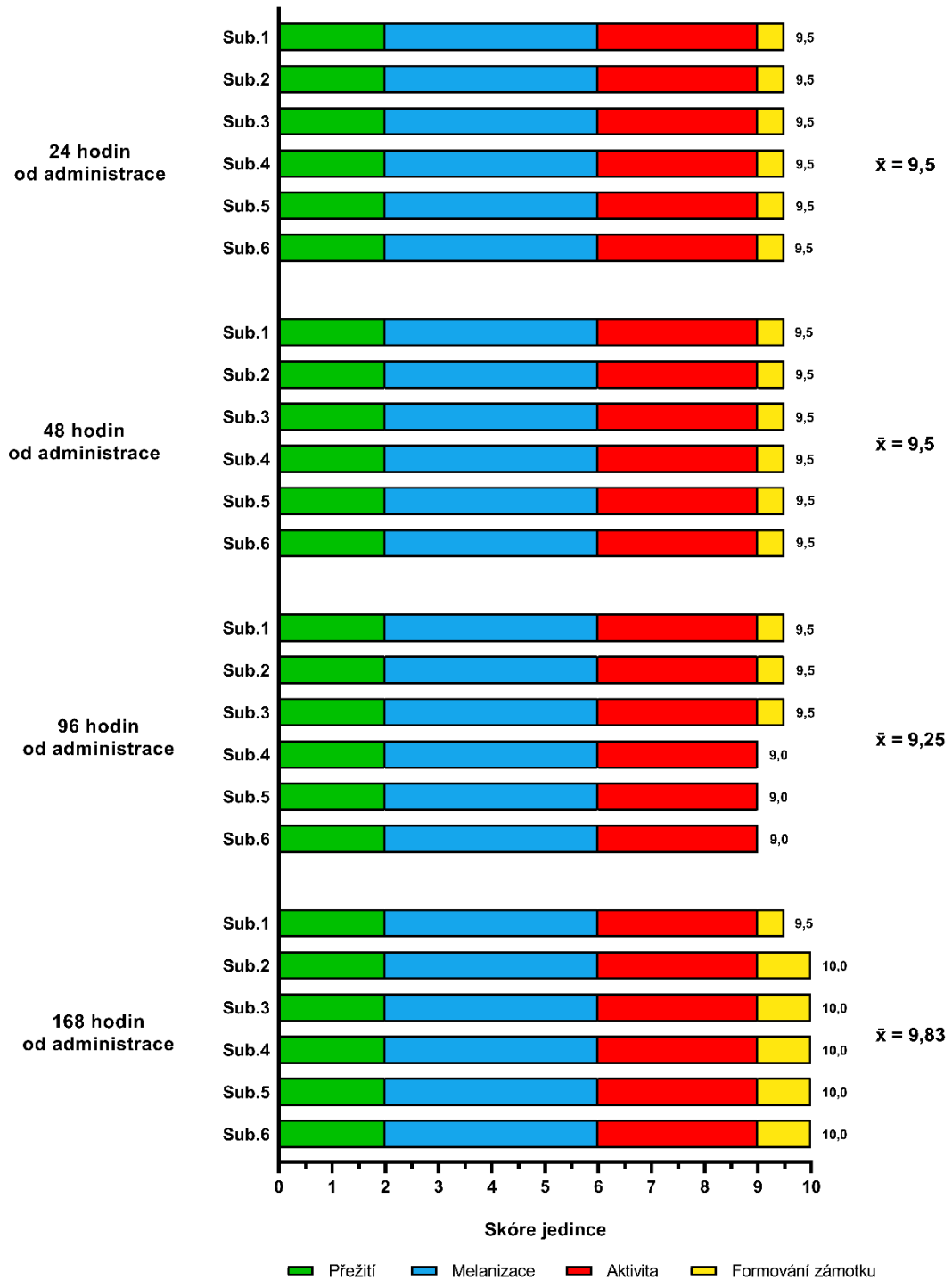
Graf 23: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 250 ± 10 mg.

HISS kontrolní skupina:
administrace pouze PBS, 350 ± 15 mg



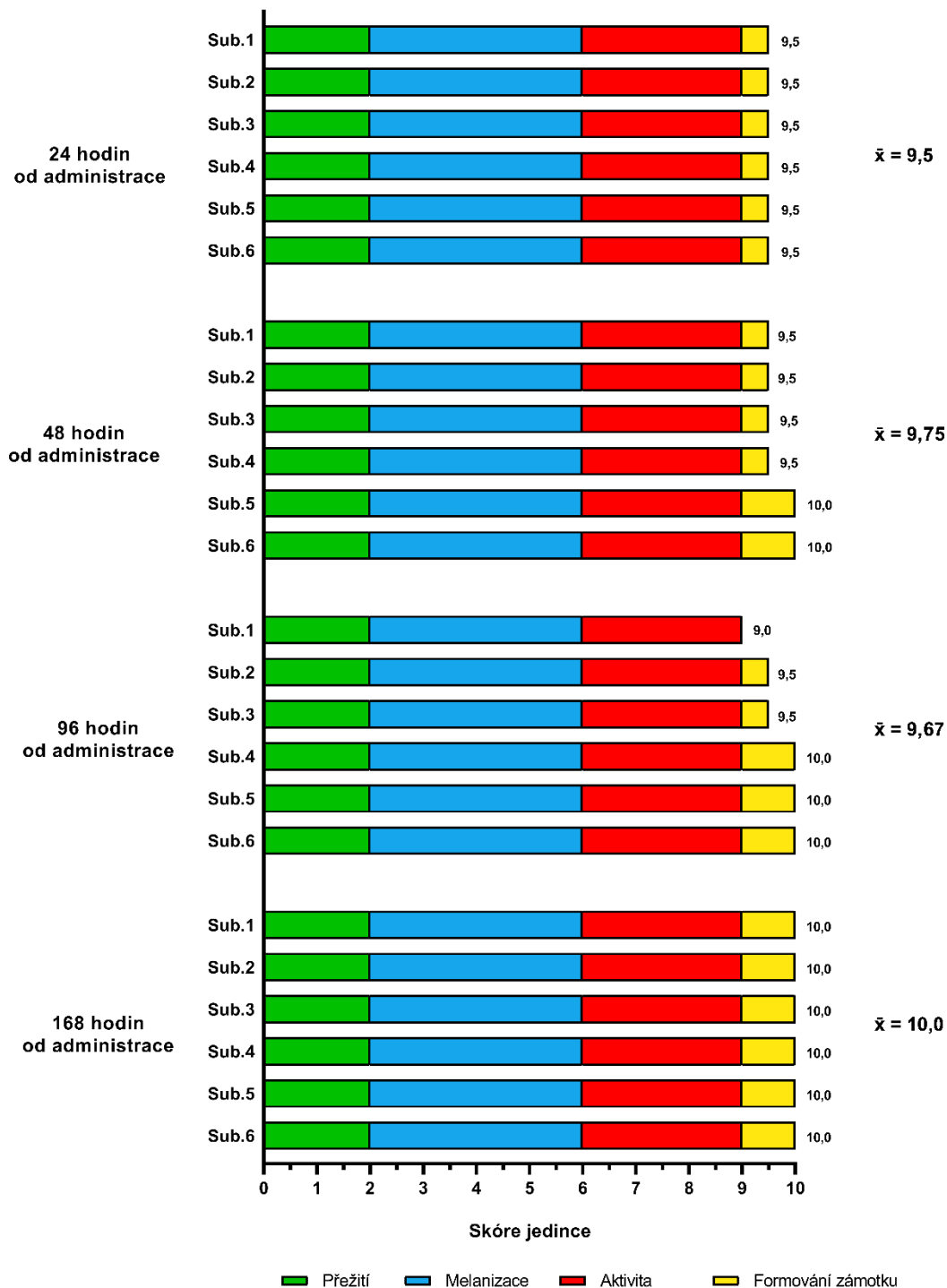
Graf 24: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 350 ± 15 mg. Symbol ☠ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.

HISS kontrolní skupina:
administrace pouze PBS, 450 ± 15 mg



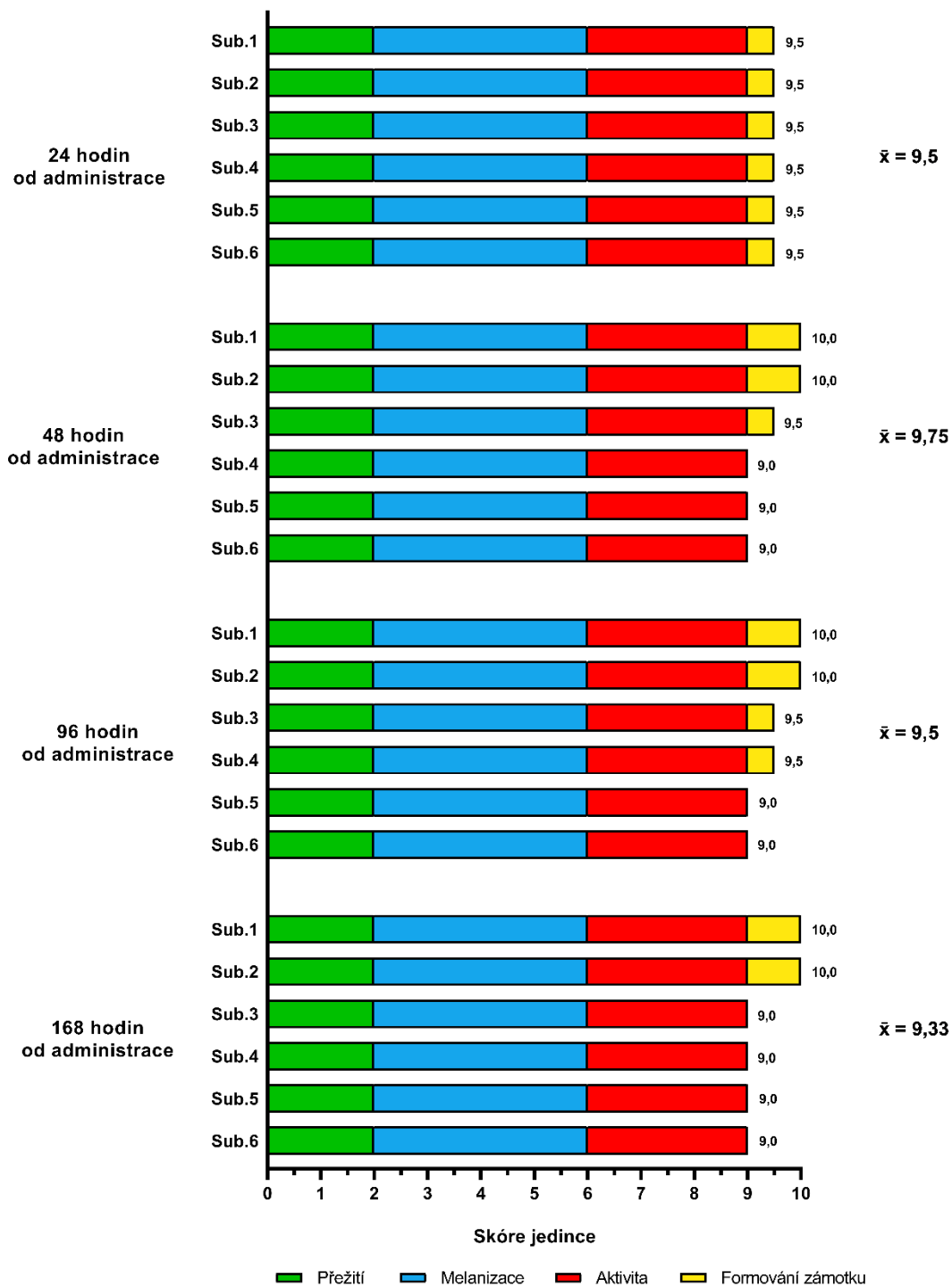
Graf 25: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 450 ± 15 mg.

HISS kontrolní skupina:
bez administrace, 250 ± 10 mg



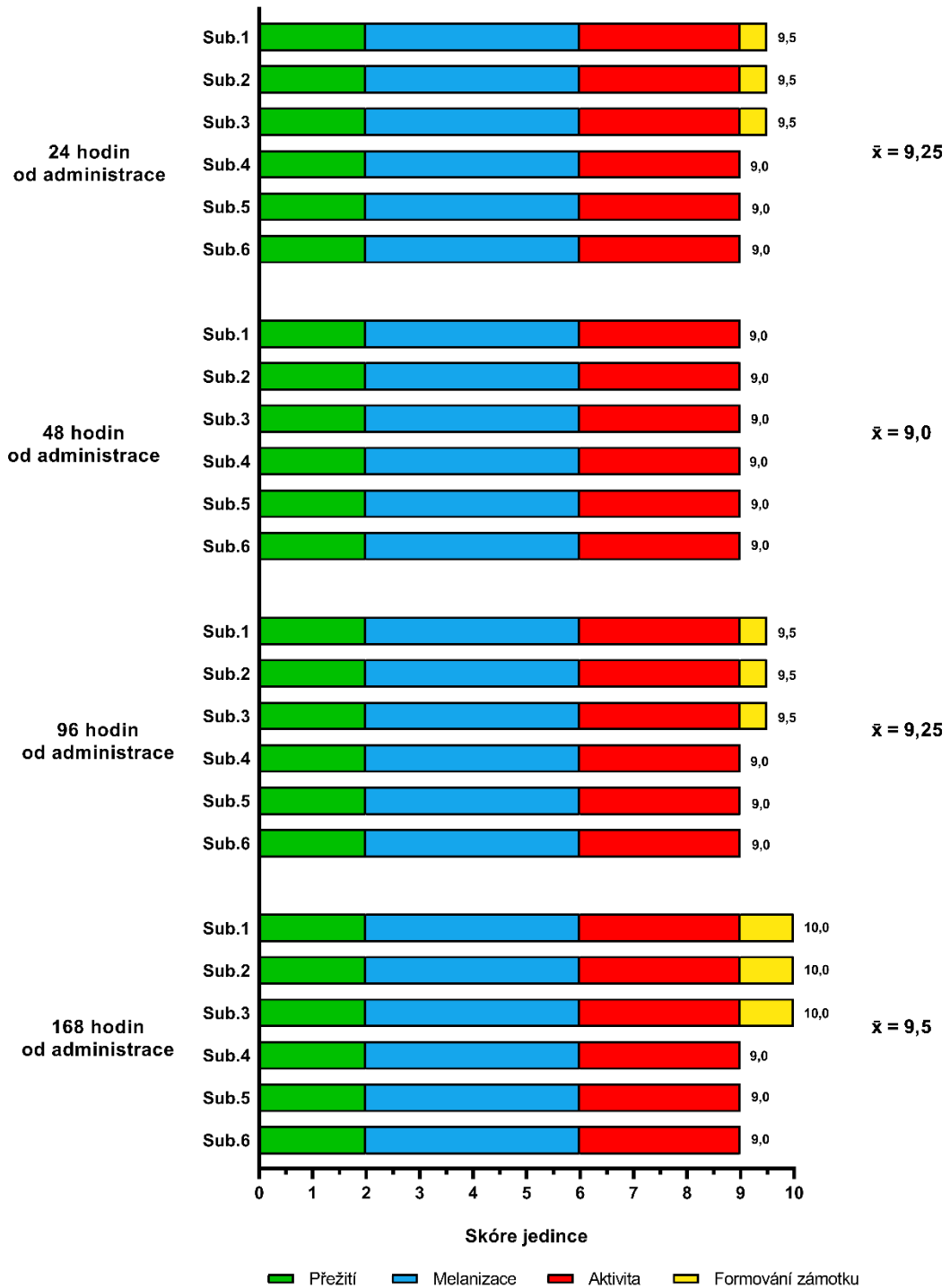
Graf 26: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 250 ± 10 mg.

HISS kontrolní skupina:
bez administrace, 350 ± 15 mg



Graf 27: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 350 ± 15 mg.

HISS kontrolní skupina:
bez administrace, 450 ± 15 mg



Graf 28: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 450 ± 15 mg.

9.4.5. Průměrné hodnoty skóre HISS každé testovací skupiny

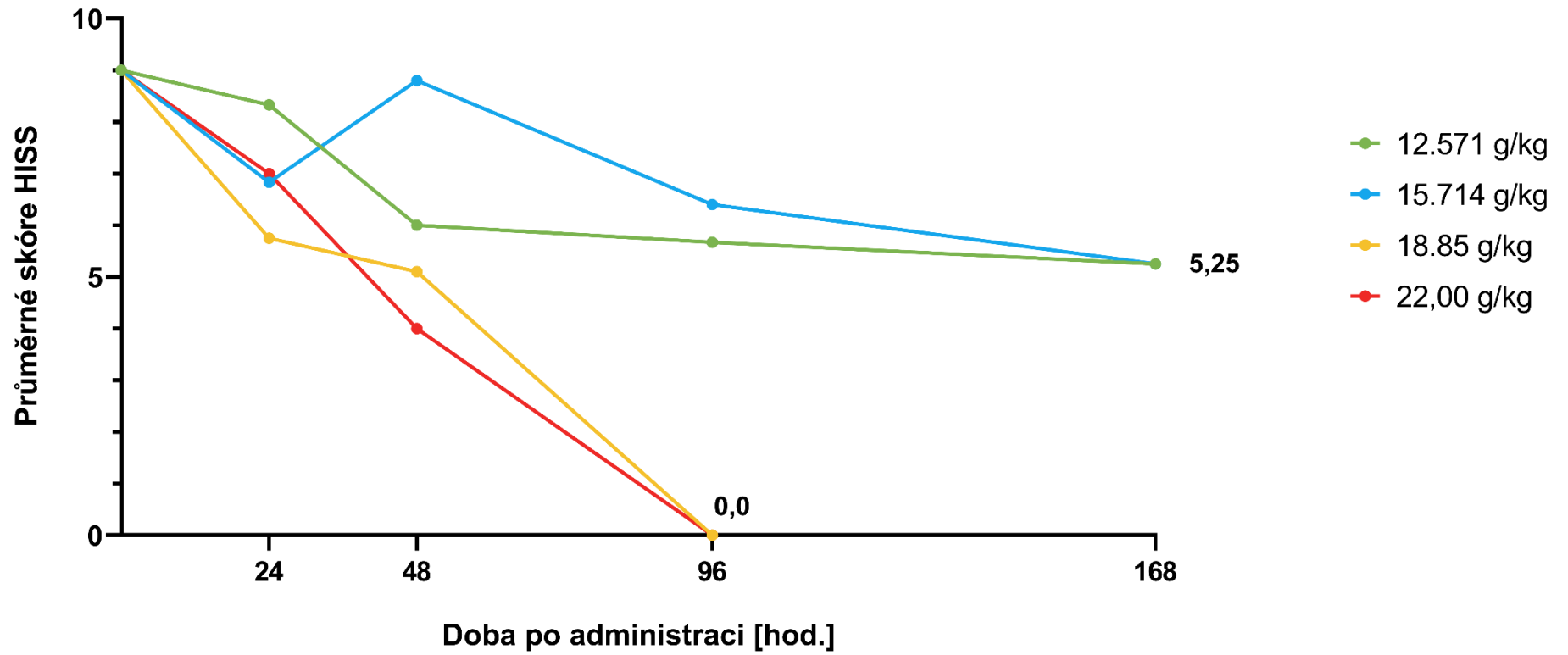
Výsledky průměrů jednotlivých testovacích skupin, tedy mimo kontrolních, byly navíc zpracovány v programu GraphPad Prism 9.5.1. pomocí spojnicových grafů (Grafy 29-31), jenž znázorňují změny průměrné hodnoty HISS v čase.

Graf 29 byl věnován váhové kategorii 250 ± 10 mg. Na první pohled je z něj vidět, že křivky pro dávky 18,85 a 22,0 g/kg vykazovaly analogický trend a končily obě ve stejném bodě. Podobný trend byl zaznamenán i u dvojice 12,571 a 15,714 g/kg. Tyto křivky už nebyly tak strmé, avšak na konci experimentu, tedy 168 hodin od administrace, skončily obě ve stejném bodě (průměrné bodové ohodnocení HISS, 5,25 bodů). Překvapivě byl v této hmotnostní kategorii zaznamenán výrazný skok do vyšších hodnot HISS právě po administraci množství DMSO 15,714 g/kg. Z 24. na 48. hodinu odečtu se průměrné skóre HISS zvedlo o téměř dva body (z 6,83 na 8,8 bodů).

Pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg je určen Graf 30. Ve 168. hodině od administrace končila každá křivka u jiné hodnoty HISS skóre. Pro administrovanou dávku DMSO 12,571 a 22,0 g/kg činila průměrná hodnota HISS na konci experimentu 1,5 bodu. Pro množství DMSO 18,85 g/kg o dva body více (3,5 bodu). Pro 15,714 g/kg zase o 3,75 bodů více (5,25 bodů), tudíž 3,5krát vyšší než u 12,571 g/kg, což bylo nejnižší administrované množství DMSO v experimentech. Všechny čtyři křivky vykazovaly relativně analogický trend. Nadto křivka pro 22,0 g/kg měla téměř tvar přímky.

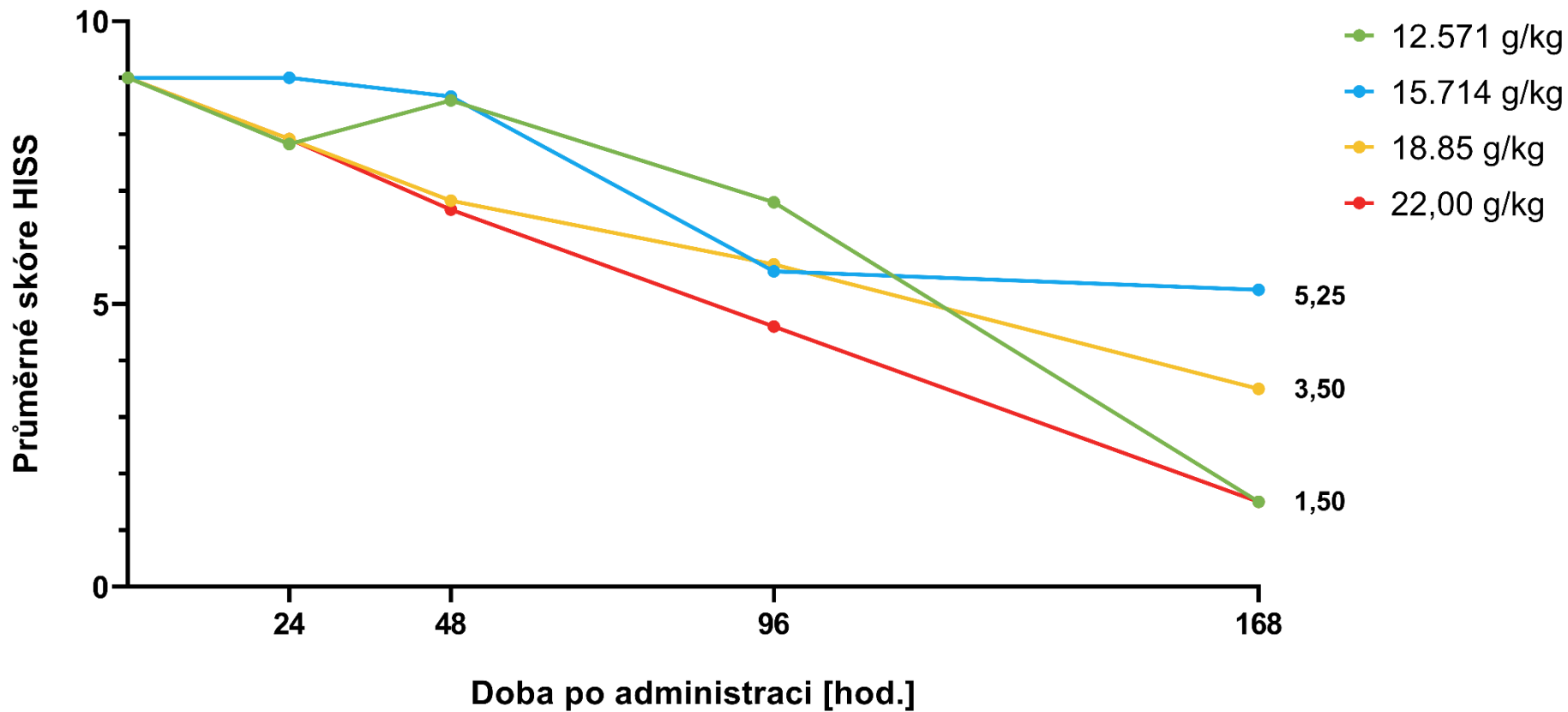
Co se týče váhové kategorie 450 ± 15 mg (Graf 31), je možné opět pozorovat podobný trend jako u kategorie 250 ± 10 mg (Graf 29). Opět se křivky rozdělily na dvě podobně směřující skupiny ve stejném rozložení. Křivka pro 12,571 g/kg končila ve 168. hodině na třech bodech z deseti v rámci HISS skórovacího systému. Navíc se jednalo o jedinou skupinu, kdy se alespoň nějaký subjekt dožil konce experimentu. Křivka pro administrované množství DMSO 15,714 g/kg směřovala pod podobným úhlem. Nicméně, tato křivka skončila ve 168. hodině na hodnotě nula bodů. Křivky pro zbylé dvě administrované množství DMSO, 18,85 g/kg a 22,0 g/kg, směřovaly do 48. hodiny od administrace téměř pod stejným úhlem. Avšak křivka pro 22,0 g/kg dosáhla nuly právě ve 48. hodině. V tuto dobu odečtu dosahovala křivka pro 18,85 g/kg na hodnotu jednoho bodu. Nula bodů bylo v tomto případě dosaženo až v 96. hodině od administrace.

Váhová kategorie 250 ± 10 mg



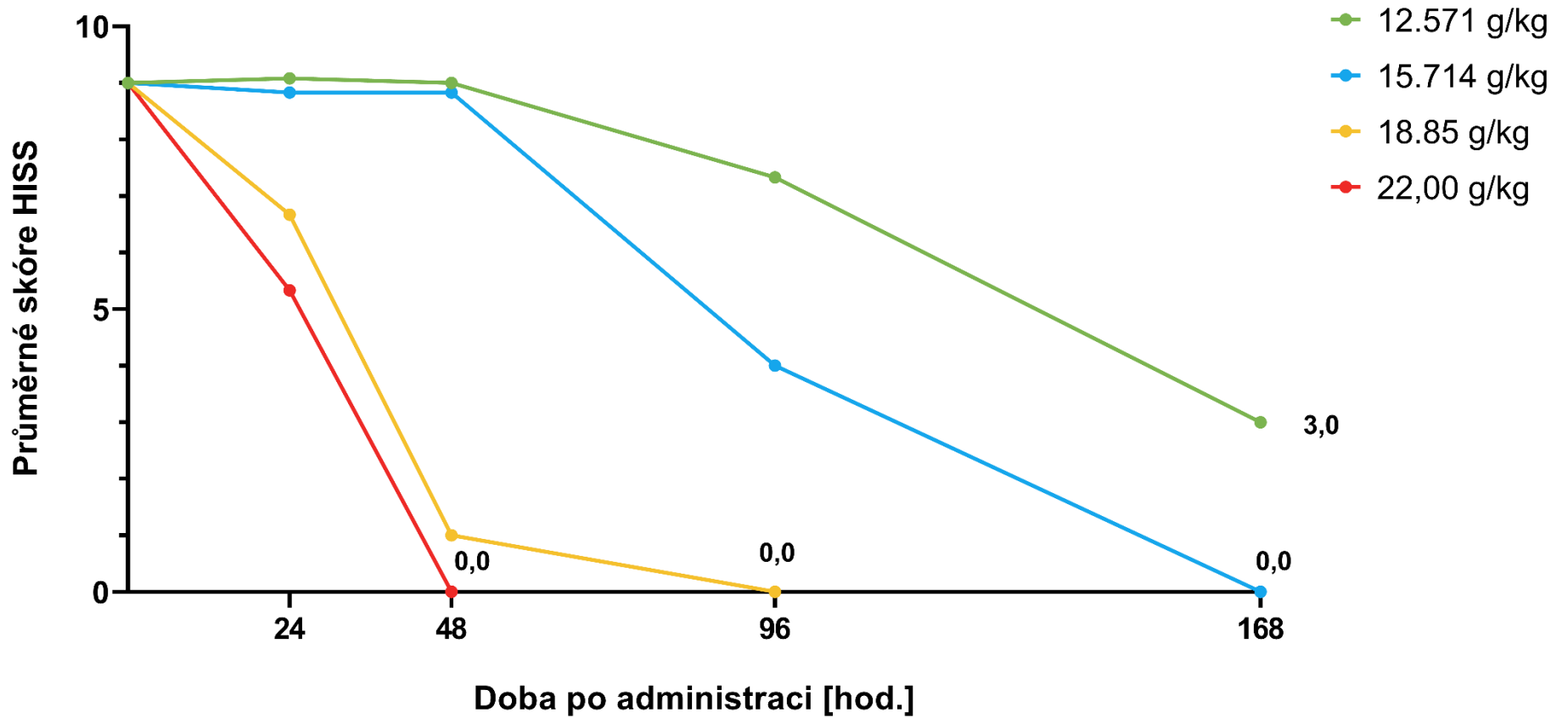
Graf 29: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 250 ± 10 mg po administraci různých dávek DMSO.

Váhová kategorie 350 ± 15 mg



Graf 30: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 350 ± 15 mg po administraci různých dávek DMSO.

Váhová kategorie 450 ± 15 mg



Graf 31: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 450 ± 15 mg po administraci různých dávek DMSO.

9.4.6. Samostatné hodnocení parametru HISS „formování zámotku“

Jako jeden z nejzajímavějších poznatků se v rámci předchozích šetření parametrů HISS ukázalo zaznamenávání parametru „formování zámotku“. Proto tomuto parametru jsou věnovány následující tři spojnicové grafy, opět zpracované v programu GraphPad Prism 9.5.1.

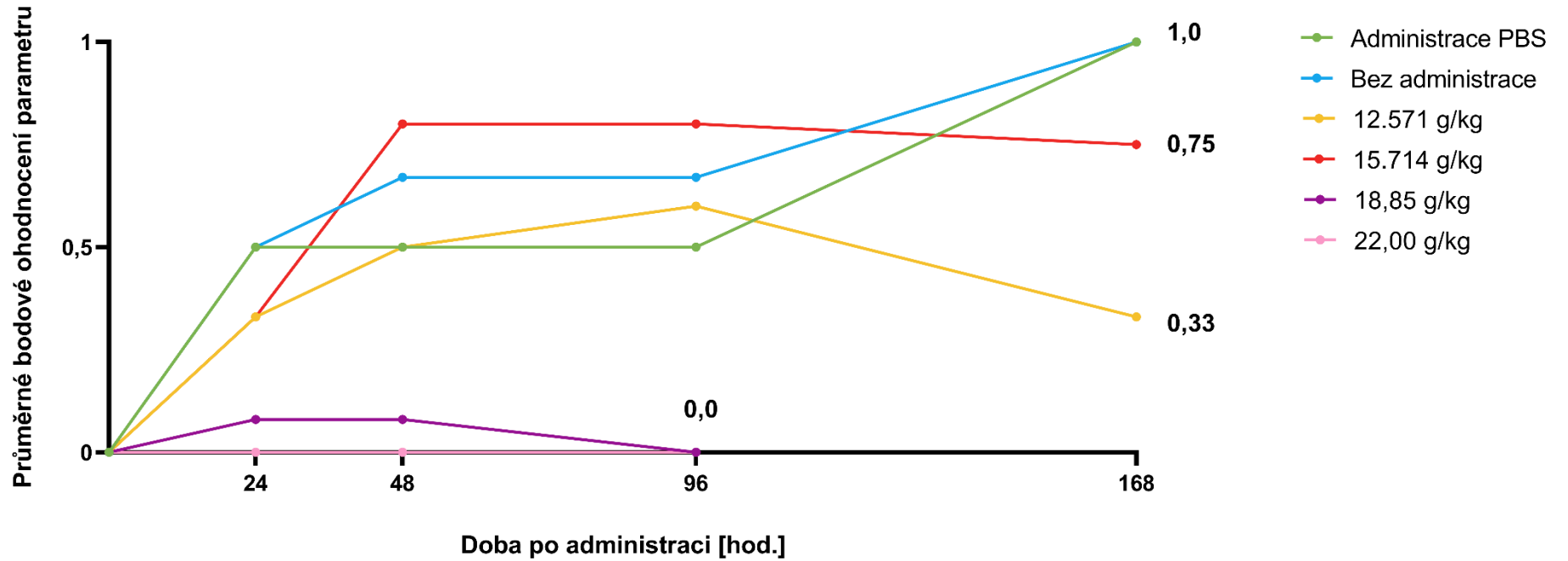
Jak lze z Grafu 32 vyčíst, tak obě kontrolní skupiny váhové kategorie 250 ± 10 mg dosáhly na konci experimentu (ve 168. hodině) maximálního ohodnocení, tedy průměrného bodového ohodnocení pro parametr „formování zámotku“ bylo jeden bod. Larvy skupiny s nejnižší administrovanou dávkou DMSO (12,571 g/kg) dosáhly na konci experimentu nižší průměrné hodnoty, a to 0,33 bodu, než larvy skupiny s druhým nejnižším administrovaným množstvím DMSO (15,714 g/kg), které získaly v průměru 0,75 bodu pro tento parametr. Larvy z obou skupin o nevyšších administrovaných dávkách (18,85 a 22,0 g/kg) v 96. hodině uhynuly, tudíž skončily na nule. Přičemž ve čtvrté skupině (22,0 g/kg) ani jedna larva do své smrti nezačala formovat zámotek.

Graf 33 je určen váhové kategorii 350 ± 15 mg. Všechny larvy kontrolních skupin s administrací PBS obdržely na konci experimentu po jednom bodu. Druhé nejvyšší bodové ohodnocení, tedy 0,75 bodu, bylo zaznamenáno u skupiny, které bylo administrováno 15,714 g/kg. Obě skupiny o nejvyšších administrovaných množstvích DMSO (18,85 a 22,0 g/kg) se dožily posledního odečtu a u obou byla zjištěna průměrná hodnota 0,5 bodu. Pozoruhodné je, že nejnižší průměrné bodové ohodnocení (0,33 bodu) pro parametr „formování zámotku“ této váhové kategorie bylo získáno od druhé kontrolní skupiny (bez administrace) a u skupiny s nejnižším administrovaným množstvím DMSO (12,571 g/kg).

Jak je vidno z Grafu 34, u první kontrolní skupiny (po administraci čistého PBS, 450 ± 15 mg), tak i skupiny s administrovaným množstvím DMSO 12,571 g/kg z váhové kategorie 450 ± 15 mg, bylo dosaženo na konci experimentu (168 hodin po administraci) u parametru „formování zámotku“ v průměru maximální ohodnocení, tedy jednoho bodu. Druhá kontrolní skupina (bez administrace) maxima nedosáhla a ve 168. hodině její průměrná hodnota činila 0,5 bodu. U jedinců ze skupiny, které bylo administrováno 15,714 g/kg, byl zaznamenán velký skok nahoru (na 0,83 bodu) ve 48. hodině. Avšak od

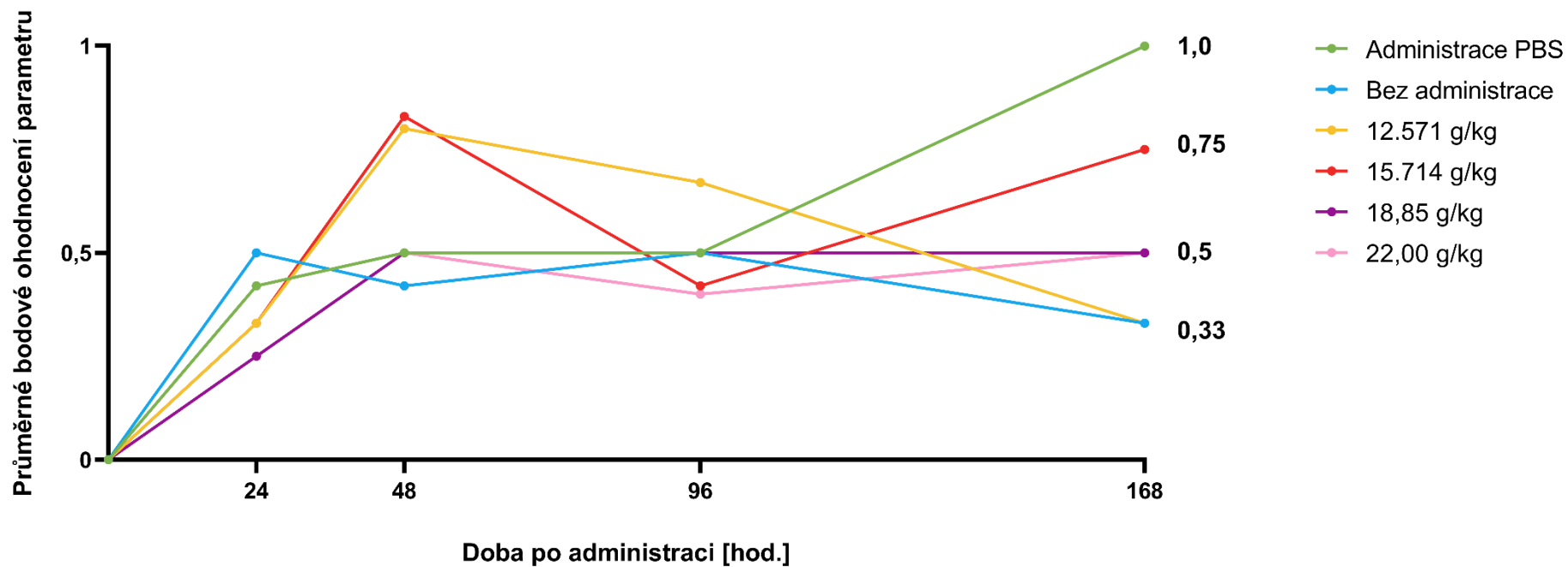
této doby pak nastal velký propad až na nula bodů ve 168. hodině. Skupina 18,85 g/kg ani skupina 22,0 g/kg nedosáhla ani v jednom časovém okamžiku, kdy byly jedinci živí, průměrné hodnoty nad nula bodů.

Formování záotku
Váková kategorie 250 ± 10 mg



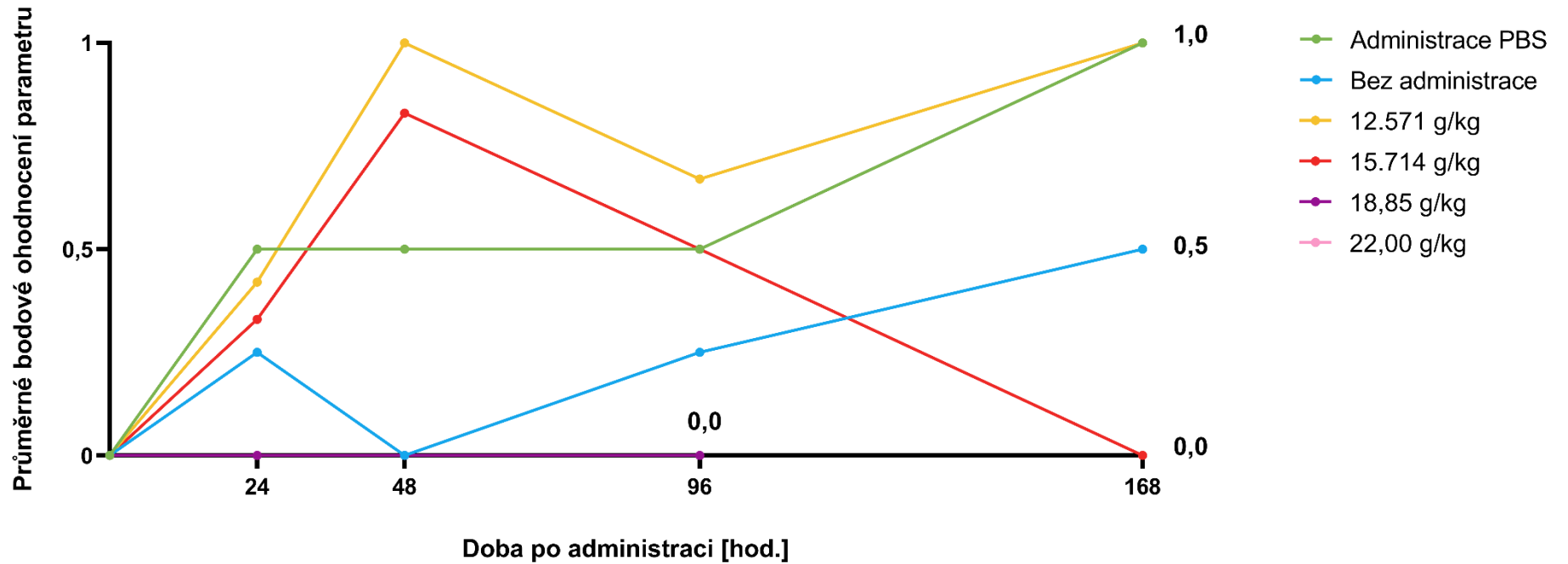
Graf 32: Průměrné hodnoty pro parametr „formování záotku“ v daném čase po administraci DMSO vákové kategorii 250 ± 10 mg.

Formování záotku
Váhová kategorie 350 ± 15 mg



Graf 33: Průměrné hodnoty pro parametr „formování záotku“ v daném čase po administraci DMSO váhové kategorii 350 ± 15 mg.

Formování záotku
Váhová kategorie 450 ± 15 mg



Graf 34: Průměrné hodnoty pro parametr formování záotku v daném čase po administraci DMSO váhové kategorii 450 ± 15 mg.

10. Diskuse

Již v nemalém počtu publikací se larvy *G. mellonella* osvědčily jako efektivní modelový organismus pro různé výzkumné aktivity, například pro studium patogeneze infekčních procesů vyvolaných mikroorganismy, či studiu účinnosti antimikrobiálních látek [29, 30]. Mimoto se lze setkat i s publikacemi, ve kterých autoři využívají larvy *G. mellonella* i pro ověření účinnosti biologických léčiv [91] či pro toxikologické studie [23, 24, 79, 80, 93].

Co se týče využití larev *G. mellonella* pro stanovení toxicity *in vivo*, napříč dostupnými odbornými publikacemi panuje značná diskrepance v podmínkách experimentů. Co autor, to jiný původ larev i přístup, jak se s larvami zachází před nebo v průběhu experimentu.

Přes všechny výhody, které *G. mellonella* jako zvířecí model pro výzkum nabízí, nedostatek standardizace v metodice ztěžuje porovnání výsledků ze studií mezi sebou. V současné době nejsou k dispozici žádné standardizované postupy a podmínky.

Tato práce byla zaměřena na studium vlivu velikosti larev, potažmo tedy vlivu vývojové fáze larev na výsledky týkající se toxicity DMSO. V rámci této studie byla při hodnocení toxicity zohledněna i směrnice OECD pro testování chemikálií [6]. Vystala tak otázka, zda jsou larvy *G. mellonella* dostatečně robustní pro toxikologické studie.

Slovo robustnost v našem případě znamená, jak moc si můžeme dovolit odbočit od podmínek, které předchází nebo jsou paralelními během testování. Pravda je taková, že co se týče přístupu k testování toxicity, tak jsou zde diskrepance, různorodé přístupy, jak se s larvami zachází před nebo v průběhu experimentu. Bohužel směrnice OECD jsou velmi obecné a spíše jsou orientovány na savčí modely. Dosud nebyla vydána standardní metoda pro testování toxicity s užitím larev *G. mellonella*. Problém tkví i v tom, že si každý autor bedlivě střeží své „know-how“. Tudíž bývá nezdůvodněná náročná dopátrat se dostatečných podrobností, jak autoři přistupovali k práci s larvami.

Nejsme však první, kdo na problematiku nejednotnosti v přístupech týkajících se testování toxicity s užitím tohoto zvířecího modelu mezi autory naráží. Lze se tak setkat se publikovanými studiemi, které hodnotí vliv vybraných podmínek experimentů na jejich výsledky, jako například: vliv teploty inkubace [28, 97], hmotnosti larev [94] či vliv diety volené při odchovu [65, 98].

Otázkou vlivu hmotnosti larev na hodnoty LD₅₀ po infekci larev bakterií *Staphylococcus aureus* se zabývali ve studii Hesketh-Best, et al. 2021 [94]. V této práci vytvořili šest váhových skupin (180–200 mg, 201–220 mg, 221–240 mg, 241–260 mg, 261–280 mg, 281–300mg). Nejvíce konzistentní data lze podle nich získat od larev, které se nacházejí ve váhovém rozmezí 180–260 mg. Naopak, u dvou hmotnostních skupin o nejvyšší váze (261–280 a 281–300 mg) nebyly zaznamenány spolehlivé a konzistentní výsledky. Navíc, larvy v těchto dvou skupinách vykazovaly vyšší citlivost a mortalitu.

Obdobného závěru bylo dosaženo i v této práci, do které byly zařazeny tři váhové kategorie (250 ± 10 mg, 350 ± 15 mg, 450 ± 15 mg). V rámci experimentů bylo zaznamenáno, jak je vidět z Grafů 1-3 a z Tabulky 7, že larvy nejvyšší váhové kategorie (450 ± 15 mg) byly oproti larvám váhové skupiny 350 ± 15 mg výrazně méně odolné vůči chemické noxe (DMSO). Larvy váhové kategorie 350 ± 15 mg v souhrnu vykazovaly nejvyšší míru přežití. Jedinci kategorie 250 ± 10 mg byli vůči kategorii 350 ± 15 mg méně odolné, avšak odolnější než larvy v kategorii 450 ± 15 mg. Zjevně, skupina 450 ± 15 mg vykazuje ve srovnání s ostatními váhovými kategoriemi nejmenší míru schopnosti přežití po expozici látkou DMSO.

Možná nejde ani tak o váhu larev v pravém slova smyslu, nýbrž o jejich vývojové stádium. Hmotnost larev, spíše než instar, odráží aplikovanou dietu. Vzhledem k tomu, že může být obtížné určit vývojové stádium (instar), není jednoduché tuto hypotézu ověřit.

Jak již bylo uvedeno, těla larev *G. mellonella* obsahují tuková tělesa. Funkčně jsou analogická k játrům savců. Tukové těleso je velmi metabolicky aktivní orgán. Dochází zde zároveň ke kumulaci životně důležitých živin, jako jsou tuky, bílkoviny či glykogen. (De Oliveira a Cruz-Landim, 2003 [99]).

Je všeobecně známo, že léčiva lipofilního charakteru mají tendenci deponovat se ve strukturách bohatých na lipidovou složku, kterou může být právě tukové těleso larev *G. mellonella*. Nicméně, nepodařilo se dohledat studii, v níž se její autoři zabývají ukládáním látek do tukového tělesa larev *G. mellonella*.

U lidí však může akumulace API v tukové tkáni vést k ovlivnění jejich farmakokinetických i farmakodynamických parametrů. Zejména se jedná o prodloužení plazmatického poločasu API a delší tzv. „wash-out“ periodu. Deponování API v tukové tkáni může teoreticky oddálit její toxický efekt. Excesivní ztráta většího množství tukové

tkáně následkem hladovění může být pro organismus škodlivá, jelikož by tím mohlo dojít k liberaci deponovaných xenobiotik a zvýšení jejich plazmatických koncentrací. [100]

Metamorfóza je pro larvy velmi energeticky náročný proces, kdy u larev dochází k celé řadě metabolických změn [101]. Již před přeměnou (v posledním instaru) přestává larva přijímat potravu a začíná být odkázána pouze na nastřádané zásobní látky. Jak již bylo nastíněno výše, spolu s mobilizací energetických zásob by mohlo dojít i k uvolnění deponovaných API. Případně i k náhlému projevu jejich toxicity. I tak by bylo možné odůvodnit vyšší míru letality u larev nejvyšší váhové kategorie (450 ± 15 mg), u nichž v experimentech této práce docházelo oproti ostatním skupinám k úhynu dříve.

Běžně se v odborných textech, kde je evidována práce s larvami *G. mellonella*, uvádí, že byly použity larvy z tzv. „last-instar“ či „final-instar“ (obě je možné přeložit do češtiny jako poslední larvální stadium). Jindy autoři uvádí aplikaci jedinců z tzv. „sixth-instar“ (šestý instar). Avšak, co je tím myšleno? V literatuře je totiž za poslední instar považováno až sedmé larvální stadium [22].

Mezi publikacemi lze vysledovat i diskrepance ve velikosti v rámci stejného instaru. Jako příklad lze porovnat tři studie, v nichž byly použity larvy posledního instaru. Použité larvy v práci Coskun *et al.*, 2021 [102] vážily 180-200 mg, u Suay-García *et al.*, 2019 [76] uvádí hmotnost jedinců 300 ± 20 mg, u Forastiero *et al.*, 2015 [103] se lze dočíst o larvách 400 ± 100 mg. Zde zcela logicky bude svoji roli hrát i dieta, která byla užita k odchovu larev.

V této práci se larvy váhové kategorie 350 ± 15 mg během experimentů jeví jako nejodolnější. Na druhou stranu, larvy váhové kategorie 250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg byly vůči xenobiotické noxe, zde DMSO, senzitivnější.

Pokud jde o odpověď na otázku, jakou váhovou kategorii larev tedy zvolit v rámci screeningu toxicity *in vivo* nových zkoumaných látek v rámci preklinických studií, považujeme za přínosnější se spíše ztotožnit s falešně pozitivními výsledky než s falešně negativními.

Tento přístup umožní do následných experimentů pro studium toxicity *in vivo* na jiných modelových organismech se lépe vymezit toxickým látkám, které by zvířatům mohla zbytečně způsobit značné utrpení až smrt. Což je v podstatě v souladu s principy „Tří R“. 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.

Mimo značné citlivosti jsou larvy váhové kategorie 450 ± 15 mg výhodné i v dalších charakteristikách. Ve srovnání se dvěma zbylými váhovými kategoriemi, se s jedinci okolo 450 mg dobře manipulovalo. A to i v rámci intrahaemocoelické administrace. Využití larev váhové kategorie 450 ± 15 mg zajišťuje vyšší bezpečnost práce, nižší riziko poranění pracovníka při administraci a následného ohrožení jeho zdraví, či života potencionálně toxickou látkou.

Přesto je nutné konstatovat, že vážení jednotlivých larev je samo o sobě časově náročná procedura. Zejména při třídění velkého množství larev dle hmotnosti. Ve studii Hesketh-Best *et al.*, 2021 [94] zjistili, že délka larev je přímo úměrná hmotnosti. Měření délky může být preferovanou alternativou k přesnému vážení všech larev.

Zpravidla je koncový bod experimentu definován jako zaznamenání ztráty životaschopnosti larvy. Což koliduje s principem „Tří R“, a to s „Refinement“ (zjemnění). Právě na tuto problematiku ve své práci poukazují Loh *et al.*, 2013 [56]. Vytvořili proto systém za účelem hodnocení celkové zdravotní kondice larev, též označovaný zkratkou HISS, jenž vychází z anglického jazyka zkrácením víceslovného pojmenování „Health Index Scoring System“. Vznikla tak soustava parametrů, podle nichž se hodnotí kondice jednotlivých larev, viz Tabulka 5. Dodatečné použití HISS jim umožnilo měření některých jemnějších rozdílů, které jsou často pozorovány během experimentů s larvami (melanizace, změny v pohybové aktivitě či tvorba kokonu a kuklení).

Jak již bylo zmíněno výše, pro toxikologický screening stačí zahrnout menší počet testovacích zvířat. Zavedením hodnotícího systému HISS lze od skupiny s malým počtem larev *G. mellonella* získat daleko více informací než jen mortalitní údaje.

Paradoxní výsledek byl zaznamenán u zahrnutých dvou kontrolních skupin, kdy vyšší míra formování zámotku vycházela právě u kontrolní skupiny, do které byl administrován roztok PBS (viz 9.4.4., Grafy 23-28). Tedy u jedinců, kteří podstoupili intrahaemocoelovou administraci (Grafy 23-25), a ne u druhé kontrolní skupiny (larev bez administrace, Grafy 26-28). U všech kontrolních skupin po administraci PBS došlo při posledním odečtu (po 168 hodinách od administrace) k tvorbě plného zámotku u 15 ze 17 (88,24 %) živých jedinců. Pokud by zde byla zahrnuta i jedna uhynulá larva, tak by se jednalo o 83,33 % první kontrolní skupiny. Avšak u druhé kontrolní skupiny (bez

administrace) vytvořilo plný kokon 11 z 18 jedinců (61,11 %). Na zbylých sedmi larvách nebyly pozorovány ani známky formování zámotku.

Tvorba kokonů je u larev *G. mellonella* neopomenutelným zdrojem informací, proto byly tomuto parametru zvlášť vytvořeny Grafy 32-34. Kokon je nutný pro zahájení procesu metamorfózy, ke kterému může dojít jen, pokud je larva v dostatečně dobré kondici. Nicméně, tvorba kokonu a kuklení larvy vyhodnocování skóre HISS značně komplikovaly.

Pokud nebyly larvy v posledním instaru, v našem případě jedinci nejvyšší váhové kategorie, výrazně zasaženy vlivem xenobiotika, přecházely do vývojového stádia s tvorbou zámotku (kokonu). I když tento výsledek lze považovat za pozitivní znamení (látka výrazně negativně nezasáhla do přirozeného vývoje larvy), tak v rámci tohoto vývojového stádia bylo nezřídka náročné až nemožné (Grafy 14 a 22) ohodnotit určitá kritéria, které jsou v rámci HISS hodnoceny (zejména pohyb a melanizaci).

Kuklí se larvy bývají totiž ze své podstaty méně pohyblivé (v rámci již vytvořeného kokonu/zámotku se utváří nepohyblivá kukla) a bez šetrného rozstříhnutí kokonu nelze hodnotit ani jejich stupeň melanizace. Navíc při pokusu o rozstříhnutí zámotku hrozí velké riziko zranění až usmrcení larvy, a tak možnému zkreslení výsledku. To je právě jednou z nevýhod větších larev (především 450 ± 15 mg), které mají už blíže k procesu metamorfózy. Řešením daného problému by mohlo být přehodnocení a modifikace zdraví larev hodnotícího systému HISS (například upravení bodování pro tvorbu zámotku). O modifikaci hodnotícího systému HISS se již některé výzkumné skupiny pokusily, jedna modifikace je uvedena v Durieux *et al.*, 2021 [105]. Porovnání „klasického“ HISS od Loh *et al.*, 2013 [56] s modifikací představenou v Durieux *et al.*, 2021 [105] znázorňuje Tabulka 8.

Je nutno podotknout, že intrahaemocoelová administrace by se dala považovat za 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 LD_{50} (tedy pro tři váhové kategorie) po 24 hodinách z Tabulky 6 pro larvy *G. mellonella* s hodnotami akutní toxicity (vyjádřené jako LD_{50} [g/kg], též po 24 hodinách, zdroj: NIOSH [104], které jsou taktéž uvedené v Tabulce 6, tentokrát však pro tři různé způsoby administrace vybraným modelovým zvířatům, je možné si povšimnout jiného směru.

Jak je zachyceno v Tabulce 6, hodnota LD₅₀ po 24 hodinách pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg, byla stanovena programem jako 22,0 g/kg, pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg jako 19,66 g/kg a pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg činila 18,15 g/kg. Tyto hodnoty LD₅₀ larev *G. mellonella* po intrahaemocoelové administraci jsou bližší hodnotě LD₅₀ po perorální administraci DMSO například potkana, jehož LD₅₀ po 24 hodinách je v NIOSH [104] uvedena jako 14,5-28,3 g DMSO/kg živé váhy (ve stejném zdroji jsou také uvedeny hodnoty LD₅₀ po 24 hodinách pro myš, tedy 16,5-21,4 g DMSO/kg živé váhy).

Nakonec je třeba zmínit, že u řady látek, které jsou podrobovány základnímu výzkumu jakožto potenciální léčiva na pracovišti Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (FaF UK v HK), bývá problémem jejich rozpustnost (solubilita) ve vodě. Solubilitu ve vodě lze zvýšit pomocí vhodného kosolventu. Mezi běžně používané kosolventy patří i DMSO. Obvykle se uvádí, že DMSO vykazuje vůči organismům, včetně člověka, velmi nízkou toxicitu, avšak ne nulovou. Ve studiích prováděných na larvách *G. mellonella* se DMSO používá o různých cílových koncentracích v administrovaném objemu. Na pracovišti FaF UK v HK se nejčastěji volí koncentrace DMSO 30 % (v/v). Jedná se o nejvyšší koncentraci DMSO, která se zde osvědčila a nedocházelo při ní u larev k jakýmkoli změnám v kondici. I proto byl pro experimenty a implementaci HISS zvolen DMSO jako zkoumaná látka.

Tabulka 8: Porovnání dvou skórovacích systémů pro experimenty na larvách *G. mellonella*. Vlevo původní HISS od Loh *et al.*, 2013 [56]. Vpravo upravený HISS uvedený v Durieux *et al.*, 2021 [105].

Loh <i>et al.</i> (2013)			Durieux <i>et al.</i> (2021)		
PARAMETR		SKÓRE	PARAMETR		SKÓRE
Aktivita	Bez aktivity	0	Aktivita	Bez pohybu	0
	Minimální aktivita	1		Žádné otáčení se a minimální pohyb po stimulaci	1
	Po stimulaci	2		Obtížné otáčení se a slabá spontánní aktivita	2
	Bez stimulace	3		Normální schopnost se otáčet a spontánně pohybovat	3
Formování zámotku	Žádné	0	Formování zámotku	Žádný kokon	0
	Částečně	0,5		Plný kokon	1
	Plně	1			
Melanizace	Kompletní	0	Melanizace	Melanizované larvy	0
	Černé skvrny na hnědém těle	1		Bez melanizace	1
	≥3 skvrny na béžovém těle	2			
	≤3 skvrny na béžovém těle	3			
	Bez melanizace	4			
Přežití	Smrt	0	Přežití	Smrt	0
	Přežití	2		Přežití	2

Závěr

Malý, nevzhledný motýl, navíc parazit včel. I přesto je možné vyjmenovat mnoho důvodů, proč zrovna druh *Galleria mellonella* nabývá na popularitě ve vědecké sféře a upevňuje si zde svou pozici.

Využití larev *G. mellonella* jako modelového organismu přináší řadu výhod. Vědecké studie mohou být provedeny i při nízkém finančním rozpočtu. Mimoto, larvy *G. mellonella* jako živočišný model mají navíc relativně univerzální použití a hodí se na mnoho různých typů studií. Jejich nesespecifická složka imunity se až překvapivě podobá v řadě ohledech té savčí. Mimo jiné, *G. mellonella* se nachází na nižší vývojové úrovni než savčí modely, díky čemuž dosud není pro využití těchto larev v experimentech potřebné schválení etickou komisí.

Mezi další neopomenutelné výhody lze zařadit i dostatečně velké rozměry pro intraperitoneální administraci, nenáročný odchov, krátký reprodukční cyklus, prospívání na umělé stravě i při celoročním odchovu, a to bez nutnosti speciálního vybavení či bez větší nároků na prostor.

Pro účely této práce byly vytvořeny tři různé váhové kategorie: 250 ± 10 mg, 350 ± 15 mg a 450 ± 15 mg. Byl zjišťován vliv hmotnosti, respektive instaru, na výsledky toxicity DMSO na larvy *G. mellonella*. Administrovány byly dávky 12,751 g DMSO/kg živé váhy larvy, 15,714 g DMSO/kg živé váhy larvy, 18,85 g DMSO/kg živé váhy larvy) a 22,0 g DMSO/kg živé váhy larvy.

Bylo zjištěno, že váhová kategorie larev 350 ± 15 mg se jevila jako nejodolnější, se stabilním mediánem přežití (168 hodin), a to nezávisle na administrované dávce. Oproti nim, byly larvy o hmotnosti 250 ± 10 mg a 450 ± 15 mg vůči DMSO citlivější. Dle našeho úsudku, pro screeningové a preklinické studie by mohla být nejvhodnější volbou váhová kategorie larev, které se jeví jako nejsensitivnější. Nejsensitivnější váhovou kategorií v rámci naší studie byly larvy o hmotnosti 450 ± 15 mg. Náš úsudek vychází z podstaty takové, že je vhodnější se spíše vyvarovat falešně pozitivních (příslibných) výsledků.

Volba tohoto přístupu lépe umožní se vymezit potencionálním útrapám laboratorních zvířat v následujících experimentech pro studium toxicity *in vivo* 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, je nutné nahlížet i na systém principů „Tří R“. Pro toxikologický screening stačí i méně početné skupiny, od kterých je snaha získat co možná nejvíce dat.

Z tohoto důvodu byl pro tyto experimenty použit velmi malý počet jedinců na jednu skupinu ($n_i = 6$). Aby bylo od tak nízkého počtu použitých zvířat získáno maximum dat, byl zde zaveden skórovací systém HISS, díky čemuž bylo získáno mnohem více informací o toxickém vlivu DMSO na testovací subjekty. Čímž je tato práce v souladu s jedním z principů „Tří R“, zvaným redukce.

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.

Seznam zkratek

AMPs	antimicrobial peptides and proteins, antimikrobní peptidy a proteiny
API	active pharmaceutical ingredient, účinná farmaceutická látka
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i> , zavíječ voskový
HISS	The Health Index Scoring System, bodovací systém pro určení indexu zdraví
LD₅₀	median lethal dose, střední smrtelná dávka
NIOSH	The National Institute of Occupational Safety and Health, Národní institut bezpečnosti práce a ochrany zdraví při práci
NO	oxid dusnatý
OECD	The Organisation for Economic Co-operation and Development, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufrovací fyziologický roztok
PO	fenoloxidáza
PPO	profenoloxidáza
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
Sub.	Subjekt

Seznam grafů

Graf 1: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 250 ± 10 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$	37
Graf 2: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 350 ± 15 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$	38
Graf 3: Hodnocení přežití larev váhové skupiny 450 ± 15 mg při různých administrovaných dávkách DMSO. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkem jedinců na experiment – $n_\Sigma = 36$	39
Graf 4: Stanovení LD_{50} po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám <i>G. mellonella</i> tří váhových kategorií. Hodnocení LD_{50} 24 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.....	42
Graf 5: Stanovení LD_{50} po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám <i>G. mellonella</i> tří váhových kategorií. Hodnocení LD_{50} 48 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.....	43
Graf 6: Stanovení LD_{50} po intrahaemocoelové administraci DMSO larvám <i>G. mellonella</i> tří váhových kategorií. Hodnocení LD_{50} 168 hodin od administrace DMSO. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1.....	44
Graf 7: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 12,571 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$ (Celkový počet jedinců na experiment – $n_\Sigma = 30$).....	48
Graf 8: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 15,714 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$ (Celkový počet jedinců na experiment – $n_\Sigma = 30$).....	49
Graf 9: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 18,85 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meier křivka (program GraphPad Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkový počet jedinců na experiment – $n_\Sigma = 30$	50
Graf 10: Hodnocení přežití larev různých váhových skupin při administrované dávce DMSO = 22,0 g/kg. K vyjádření závislosti v grafické podobě byla zvolena Kaplan-Meierova křivka (program GraphPad	

Prism 9.5.1). Počet jedinců na jednu skupinu – $n_i = 6$. Celkový počet jedinců na experiment – $n_{\Sigma} = 30$	51
Graf 11: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	56
Graf 12: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	57
Graf 13: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	58
Graf 14: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 250 ± 10 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol vyjadřuje úmrtí subjektu v daném čase.....	59
Graf 15: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	63
Graf 16: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	64
Graf 17: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	65
Graf 18: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 350 ± 15 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	66
Graf 19: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 24 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	69
Graf 20: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 48 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	70
Graf 21: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 96 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	71

Graf 22: Grafická prezentace výstupů z hodnocení zdravotní kondice larev (Sub. 1-6) pomocí skórovacího systému HISS (Health Index Score System) pro váhovou kategorii 450 ± 15 mg při různých dávkách po 168 hodinách. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	72
Graf 23: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 250 ± 10 mg.	74
Graf 24: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 350 ± 15 mg. Symbol ☞ znázorňuje úmrtí larvy v daném čase.	75
Graf 25: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu, které bylo administrováno pouze čistý PBS. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 450 ± 15 mg.	76
Graf 26: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 250 ± 10 mg.	77
Graf 27: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 350 ± 15 mg.	78
Graf 28: Grafická prezentace jednotlivých skóre HISS pro kontrolní skupinu bez administrace. Vpravo průměrné hodnoty v příslušném čase odečtu. Váhová kategorie 450 ± 15 mg.	79
Graf 29: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 250 ± 10 mg po administraci různých dávek DMSO.	81
Graf 30: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 350 ± 15 mg po administraci různých dávek DMSO.	82
Graf 31: Spojnicový graf znázorňující změny průměrné hodnoty HISS pro každou dávkovou skupinu váhové kategorie 450 ± 15 mg po administraci různých dávek DMSO.	83
Graf 32: Průměrné hodnoty pro parametr "formování zámotku" v daném čase po administraci DMSO váhové kategorie 250 ± 10 mg.	86
Graf 33: Průměrné hodnoty pro parametr "formování zámotku" v daném čase po administraci DMSO váhové kategorie 350 ± 15 mg.	87
Graf 34: Průměrné hodnoty pro parametr "formování zámotku" v daném čase po administraci DMSO váhové kategorie 450 ± 15 mg.	88

Seznam tabulek

Tabulka 1: Vybrané příklady výhod a limitací aplikací larev <i>G. mellonella</i> jako živočišného modelu ve studiích.....	16
Tabulka 2: Porovnání <i>G. mellonella</i> s jinými experimentálními (nesavčími) modely na základě vybraných parametrů. Přeloženo a upraveno z Champion <i>et al.</i> , 2018 [34]. *) upraveno ze zdroje Simões <i>et al.</i> , 2021 [35].	18
Tabulka 3: Srovnání vybraných publikací, kde byl prověřován i toxický efekt DMSO na larvách <i>G. mellonella</i> . Byly zvoleny parametry: finální koncentrace DMSO v roztoku [% v/v], hmotnost larev [mg], administrovaný objem [μl], množství DMSO na kilogram živé váhy larvy [g/kg] a instar.	28
Tabulka 4: Složení diety dle Haydaka [83] pro odchov hmyzu <i>Galleria mellonella</i>	29
Tabulka 5: Kritéria pro hodnocení zdravotní kondice larev pomocí zavedení systému HISS (the Health Index Score System), převzato z Loh <i>et al.</i> , 2013 [56]......	33
Tabulka 6: Vyhodnocení LD ₅₀ larev <i>G. mellonella</i> po intrahaemocoelové administraci DMSO (horní část tabulky). LD ₅₀ byla hodnocena po 24, 48, a 168 hodinách. Pro ilustraci jsou ve spodní části tabulky uvedeny také hodnoty LD ₅₀ po 24 hodinách pro jiná modelová zvířata (myš, potkan), zdroj: National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) [104]. Legenda: (i.v.) = intravenózní administrace; (p.o.) = perorální administrace; (i.p.) = intraperitoneální administrace.	40
Tabulka 7: Medián přežití v závislosti na administrované dávce DMSO a na hmotnosti jedince stanovený programem GraphPad Prism 9.5.1.	45
Tabulka 8: Porovnání dvou skórovacích systémů pro experimenty na larvách <i>G. mellonella</i> . Vlevo původní HISS od Loh <i>et al.</i> , 2013 [56]. Vpravo upravený HISS uvedený v Durieux <i>et al.</i> , 2021 [105]......	95

Seznam ilustrací

- Obrázek 1: Dospělý jedinec (imago) na včelí plástvi. Zdroj: BioChemTech.eu [14]..... 13
- Obrázek 2: Vývojová stádia *G. mellonella*: vajíčka (1), přibližně deset dní stará larva (2), přibližně dvacet dní stará larva (3), dvacet pět až třicet pět dní stará larva (4 a 5), přibližně čtyřicet dní stará larva (poslední stadium larvy) (6), kokon a kukla (7 a 8), imago (9). Pro názornost použita ilustrace od Jorjão *et al.*, 2018 [16]..... 14
- Obrázek 3: Vybraná vývojová stadia *G. mellonella*: a) vajíčka krátce po naklazení, b) larva v prvním instaru, c) druhý instar, d) třetí instar, e) čtvrtý instar, f) pátý instar, g) šestý instar, h) sedmý instar, g) kokon. Převzato a upraveno z publikace od Desai *et al.*, 2019 [20]..... 15
- Obrázek 4: Pět typů haemocytů v hemolymfě larev *G. mellonella*: a) prohaemocyty (PR), b) granulocyty (GR), c) plazmatocyty (PL), d) spherulocyty (SP), e) oenocytoidy (OE). Barvení dle Giemsy. Zdroj: Mohamed *et al.*, 2022 [65]..... 24
- Obrázek 5: Bližší pohled na intrahaemocoelovou administraci pomocí běžné injekční stříkačky přes poslední levou panožku. V porovnání s Obrázkem 5 je zjevné, že využití Hamiltonovy mikrostříkačky v této práci je vůči larvám mnohem šetrnější. Zdroj obrázku Mukherjee *et al.*, 2011 [86]..... 31
- Obrázek 6: Administrace roztoku o objemu 10 μ l pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky přes poslední levou panožku larvy *Galleria mellonella*. Fotografie poskytnula dr. Konečná..... 31
- Obrázek 7: Foto-ilustrace pro hodnocení melanizace na základě bodovacího systému indexu zdraví (HISS). (A) bez melanizace; (B) ≤ 3 skvrny na béžovém těle (červené šipky ukazující skvrny); (C) ≥ 3 skvrny na béžovém těle, často tvořící tmavý pruh na hřbetu larvy; (D) Černé skvrny na hnědém těle; (E) kompletní melanizace (černé tělo). Zdroj: Torres, *et al.* (2020) [88]. 32
- Obrázek 8: Foto-ilustrace pro hodnocení „formování zámotku“ na základě bodovacího systému indexu zdraví. V horní polovině obrázku larva s částečným zámotkem. V dolní polovině obrázku plný kokon larvy. Zdroj: Ménard *et al.*, 2021 [89]. 32
- Obrázek 9: Foto-ilustrace ze čtyř fotografií. A) červenou šipkou vyznačena kompletně melanizovaná larva; B) červené šipky znázorňují larvy s melanotickými skvrnami na hnědém těle, žluté šipky ukazují na larvy s více jak třemi skvrnami na béžovém těle, zelená šipka značí larvu s méně jak třemi skvrnami na béžovém těle; C) červenou šipkou vyznačena larva se dvěma melanotickými ložisky, zelenou šipkou označena larva bez melanizace, žlutá šipka zvýrazňuje částečně vytvořený zámotek; D) charakteristické projevy melanizace na hřbetě, respektive bříšku, larev, tedy v místě výskytu „srdce“ larvy, kde je nejvyšší koncentrace haemocytů. Obrázky poskytnula dr. Klára Konečná. 34
- Obrázek 10: Larva v kokonu (červená šipka) v porovnání s larvou, co ještě nevytvořila ani částečný zámotek (zelená šipka), žluté šipky značí krmivo. Foto poskytnula dr. Konečná..... 35
- Obrázek 11: Larvy, jenž už formují své zámotky (oranžové šipky). Foto poskytnula dr. Konečná. 35

Použitá literatura

- [1] *Science, Medicine, and Animals* [online]. Washington, D.C: National Academies Press, 2004 [cit. 2023-05-13]. ISBN 978-0-309-08894-7. Dostupné z: doi:10.17226/10733
- [2] GAD, Shayne C. *Preclinical Development Handbook* [online]. Hoboken, N.J: Wiley, 2008 [cit. 2023-05-13]. ISBN 9780470248478. Dostupné z: doi:10.1002/9780470249031
- [3] VAN NORMAN, Gail A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1. *JACC: Basic to Translational Science* [online]. 2016, **1**(3), 170-179 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2452302X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacbts.2016.03.002
- [4] PARASURAMAN, Subramani. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* [online]. 2011, **2**(2), 74-79 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0976-500X. Dostupné z: doi:10.4103/0976-500X.81895
- [5] *Toxicity Testing for Assessment of Environmental Agents* [online]. Washington, D.C: National Academies Press, 2006 [cit. 2023-05-13]. ISBN 978-0-309-10092-2. Dostupné z: doi:10.17226/1152
- [6] *Test No. 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method* [online]. OECD, 2002 [cit. 2023-05-13]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264071001. Dostupné z: doi:10.1787/9789264071001-en
- [7] Recommendation of the Council on Compliance with Principles of Good Laboratory Practice. *OECD* [online]. OECD Legal Instruments, 1995 [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://legalinstruments.oecd.org/en/instruments/OECD-LEGAL-0252>
- [8] Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances. *Official Journal L 050*, 2004 P. 0044–0059. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32004L0010>
- [9] The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* [online]. 1960, **1**(13), 500-500 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0025-729X. Dostupné z: doi:10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x
- [10] GOLDBERG, Alan M., Joanne ZURLO a Deborah RUDACILLE. The Three Rs and Biomedical Research. *Science* [online]. 1996, **272**(5267), 1403-1403 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.272.5267.1403

- [11] HYRŠL, Pavel. Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů. *Živa: časopis pro popularizaci biologie*. Praha: Academia, 2018, **66**(1), 32-34. ISSN 0044-4812. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/imunita-hmyzu-a-dalsich-bezobratlych-zivocichu-1.pdf>
- [12] HYRŠL, Pavel. Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů. *Živa: časopis pro popularizaci biologie*. Praha: Academia, 2018, **66**(2), 91-93. ISSN 0044-4812. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/imunita-hmyzu-a-dalsich-bezobratlych-zivocichu-2.pdf>
- [13] OERTEL, E. Greater Wax Moth Develops on Bumble Bee Cells. *Journal of Economic Entomology* [online]. 1963, **56**(4), 543-544 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1938-291X. Dostupné z: doi:10.1093/jee/56.4.543
- [14] The Greater Wax Moth / *Galleria mellonella*. *BioChemTech* [online]. [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://biochemtech.eu/products/the-greater-wax-moth-galleria-mellonella>
- [15] KWADHA, Charles A., George O. ONG'AMO, Paul N. NDEGWA, Suresh K. RAINA a Ayuka T. FOMBONG. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects* [online]. 2017, **8**(2) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects8020061
- [16] JORJÃO, Adeline L., Luciane D. OLIVEIRA, Liliana SCORZONI, Lívia Mara A. FIGUEIREDO-GODOI, Marcia CRISTINA A. PRATA, Antonio Olavo C. JORGE a Juliana C. JUNQUEIRA. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence* [online]. 2018, **9**(1), 383-389 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2017.1397871
- [17] WOJDA, Iwona. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* [online]. 2017, **24**(3), 342-357 [cit. 2023-05-13]. ISSN 16729609. Dostupné z: doi:10.1111/1744-7917.12325
- [18] KAVANAGH, Kevin a Emer P. REEVES. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2004, **28**(1), 101-112 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsre.2003.09.002
- [19] SALÁŠKOVÁ, Vendula (2008). *Fyziologie zavíječe voskového *Galleria mellonella**. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Hyršl, Pavel. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/j3n26/>
- [20] DESAI, Ankur V., Mukesh R. SIDDHAPARA, Payal K. PATEL a Ayodhya P. PRAJAPATI. Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella*. On artificial diet. *J Exp Zool India*. 2019, **2**(22), 1267-1272. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/340582979_BIOLOGY_OF_GREATER_WAX_MOTH_GALLERIA_MELLONELLA_L_ON_ARTIFICIAL_DIET

- [21] BECK, Stanley D. Growth and development of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences Arts and Letters*. 49. University of Wisconsin Madison, 1960, 137-148. Dostupné také z: <https://images.library.wisc.edu/WI/EFacs/transactions/WT1960/reference/wi.wt1960.sdbeck.pdf>
- [22] WILLIAMS, Jason L. Insects: Lepidoptera (moths). Honey bee pests, predators, and diseases. *The AI Root Company*. Ohio, USA, 1997, 121-141. Dostupné také z: [https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60500500/PDFFiles/1-100/066-Williams--Insects;%20Lepidoptera%20\(Moths\).pdf](https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60500500/PDFFiles/1-100/066-Williams--Insects;%20Lepidoptera%20(Moths).pdf)
- [23] IGNASIAK, Katarzyna a Anthony MAXWELL. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Research Notes* [online]. 2017, **10**(1) [cit. 2023-05-13]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-017-2757-8
- [24] COATES, Christopher J., Jenson LIM, Katie HARMAN, Andrew F. ROWLEY, David J. GRIFFITHS, Helena EMERY a Will LAYTON. The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2019, **35**(3), 219-232 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-018-09448-2
- [25] BETTS, Jonathan W., Michael HORNSEY, David W. WAREHAM a Roberto M. LA RAGIONE. *In vitro* and *In vivo* Activity of Theaflavin–Epicatechin Combinations versus Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2017, **6**(3), 435-442 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2193-8229. Dostupné z: doi:10.1007/s40121-017-0161-2
- [26] THOMAS, Rachael J., Karleigh A. HAMBLIN, Stuart J. ARMSTRONG, Claudia M. MÜLLER, Monika BOKORI-BROWN, Stan GOLDMAN, Helen S. ATKINS a Richard W. TITBALL. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2013, **41**(4), 330-336 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.12.009
- [27] HILL, Lucy, Neyme VELI a Peter J. COOTE. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2014, **43**(3), 254-261 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.11.001
- [28] ZHANG, Bi, Rui XIAO, Elizabeth A. RONAN, Yongqun HE, Ao-Lin HSU, Jianfeng LIU a X.Z. Shawn XU. Environmental Temperature Differentially Modulates *C. elegans* Longevity through a Thermosensitive TRP Channel. *Cell Reports* [online]. 2015, **11**(9), 1414-1424 [cit. 2023-05-13]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.04.066

- [29] TROTTA, Vincenzo, Federico C. F. CALBOLI, Marcello ZIOSI, Daniela GUERRA, Maria C. PEZZOLI, Jean R. DAVID a Sandro CAVICCHI. Thermal plasticity in *Drosophila melanogaster*: a comparison of geographic populations. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 2006, **6**(1), 67 [cit. 2023-05-13]. ISSN 14712148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-6-67
- [30] TSAI, Catherine Jia-Yun, Jacelyn Mei San LOH a Thomas PROFT. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* [online]. 2016, **7**(3), 214-229 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2015.1135289
- [31] PEREIRA, Thais, Patrícia DE BARROS, Luciana FUGISAKI, Rodnei ROSSONI, Felipe RIBEIRO, Raquel DE MENEZES, Juliana JUNQUEIRA a Liliana SCORZONI. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi* [online]. 2018, **4**(4) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof4040128
- [32] MAURER, Elisabeth, Niall BROWNE, Carla SURLIS, Emina JUKIC, Patrizia MOSER, Kevin KAVANAGH, Cornelia LASS-FLÖRL a Ulrike BINDER. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. *Virulence* [online]. 2015, **6**(6), 591-598 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2015.1045183
- [33] KAVANAGH, Kevin a Gerard SHEEHAN. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *Journal of Fungi* [online]. 2018, **4**(3) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof4030113
- [34] CHAMPION, Olivia, Richard TITBALL a Steven BATES. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. *Journal of Fungi* [online]. 2018, **4**(3) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof4030108
- [35] SIMÕES, José Miguel, Joshua I. LEVY, Emanuela E. ZAHARIEVA, et al. Robustness and plasticity in *Drosophila* heat avoidance. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-22322-w
- [36] NIELSEN, Ross A. a C. D. BRISTER. Greater Wax Moth: 1 Behavior of Larvae2, 3. *Annals of the Entomological Society of America* [online]. 1979, **72**(6), 811-815 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1938-2901. Dostupné z: doi:10.1093/aesa/72.6.811
- [37] BRONSKILL, John F. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*. 1961, **15**(2), 102-104. ISSN 0024-0966. Dostupné také z: [https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1960s/1961/1961-15\(2\)102-Bronskill.pdf](https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1960s/1961/1961-15(2)102-Bronskill.pdf)

- [38] JONES, Gareth a Anna BARABAS, Wendy ELLIOT, Stuart PARSONS. Female greater wax moths reduce sexual display behavior in relation to the potential risk of predation by echolocating bats. *Behavioral Ecology* [online]. 2002, **13**(3), 375-380 [cit. 2023-05-13]. ISSN 14657279. Dostupné z: doi:10.1093/beheco/13.3.375
- [39] ELLIS, James D, Jason R GRAHAM a Ashley MORTENSEN. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, **52**(1), 1-17 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.3896/IBRA.1.52.1.10
- [40] SIVA-JOTHY, Michael T. a John J. W. THOMPSON. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology* [online]. 2002, **27**(3), 206-212 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0307-6962. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x
- [41] KRAMS, Indrikis, Sanita KECKO, Katariina KANGASSALO, et al. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* [online]. 2015, **22**(3), 431-439 [cit. 2023-05-13]. ISSN 16729609. Dostupné z: doi:10.1111/1744-7917.12132
- [42] RIERA ROMO, Mario, Dayana PÉREZ-MARTÍNEZ a Camila CASTILLO FERRER. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* [online]. 2016, **148**(2), 125-139 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00192805. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12597
- [43] ROSALES, Carlos. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. In: SHIELDS, Vonnie D.C., ed. *Insect Physiology and Ecology* [online]. InTech, 2017, 2017-04-12 [cit. 2023-05-13]. ISBN 978-953-51-3033-8. Dostupné z: doi:10.5772/67107
- [44] LAVINE, Mark D. a Michael R. STRAND. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2002, **32**(10), 1295-1309 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- [45] TOJO, Sumio, Fumihiko NAGANUMA, Kenryo ARAKAWA a Shinya YOKOO. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* [online]. 2000, **46**(7), 1129-1135 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1910(99)00223-1
- [46] MAGUIRE, Ronan, Orla DUGGAN a Kevin KAVANAGH. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2016, **32**(3), 209-216 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-016-9329-x
- [47] RATCLIFFE, Norman A. a Stephen J. GAGEN. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell* [online]. 1977, **9**(1), 73-85 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00408166. Dostupné z: doi:10.1016/0040-8166(77)90050-7

- [48] JIRAVANICHPAISAL, Pikul, Bok Luel LEE a Kenneth SÖDERHÄLL. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* [online]. 2006, **211**(4), 213-236 [cit. 2023-05-13]. ISSN 01712985. Dostupné z: doi:10.1016/j.imbio.2005.10.015
- [49] LACKIE, Ann M. Haemocyte Behaviour. In: *Advances in Insect Physiology Volume 21* [online]. Elsevier, 1988, 1988, s. 85-178 [cit. 2023-05-13]. Advances in Insect Physiology. ISBN 9780120242214. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2806(08)60123-X
- [50] PECH, L.L. a M.R. STRAND. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* [online]. 1996, **109**(8), 2053-2060 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.109.8.2053
- [51] GRIZANOVA, Ekaterina V., Alexandra D. SEMENOVA, Denis A. KOMAROV, Ekaterina A. CHERTKOVA, Irina A. SLEPNEVA a Ivan M. DUBOVSKIY. Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* [online]. 2018, **98**(4) [cit. 2023-05-13]. ISSN 07394462. Dostupné z: doi:10.1002/arch.21460
- [52] ARTEAGA BLANCO, Luis Andrés, Josicelli Souza CRISPIM, Kenner Morais FERNANDES, Leandro Licursi DE OLIVEIRA, Monalessa Fábila PEREIRA, Denise Mara Soares BAZZOLLI a Gustavo Ferreira MARTINS. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research* [online]. 2017, **370**(1), 153-168 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-017-2653-5
- [53] ELEFThERIANOS, Ioannis a Christina REVENIS. Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2010, **3**(1), 28-33 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000321931
- [54] KOPÁČEK, Petr, Christoph WEISE a Peter GÖTZ. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 1995, **25**(10), 1081-1091 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/0965-1748(95)00040-2
- [55] PEREIRA, Monalessa Fábila, Ciro César ROSSI, Marisa VIEIRA DE QUEIROZ, et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Microbiology* [online]. 2015, **161**(2), 387-400 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.083923-0
- [56] LOH, Jacelyn MS, Nazneen ADENWALLA, Siouxsie WILES a Thomas PROFT. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* [online]. 2014, **4**(5), 419-428 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.24930

- [57] ZDYBICKA-BARABAS, Agnieszka a Małgorzata CYTRYŃSKA. Phenoloxidase activity in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Aspergillus oryzae*. *Annales UMCS, Biologia* [online]. 2010, **65**(2) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2083-3563. Dostępne z: doi:10.2478/v10067-011-0013-5
- [58] CHAPMAN, R. F. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 4. ISBN 978-0-521-57890-5. Dostępne také z: https://www.academia.edu/44250415/Chapman_1998_The_Insects_Structure_and_Function
- [59] SPOCHACZ, Marta, Szymon CHOWAŃSKI, Monika SZYMCZAK-CENDLAK, Paweł MARCINIAK, Filomena LELARIO, Rosana SALVIA, Marisa NARDIELLO, Carmen SCIE-UZO, Laura SCRANO, Sabino A. BUFO, Zbigniew ADAMSKI a Patrizia FALABELLA. Solanum nigrum Extract and Solasonine Affected Hemolymph Metabolites and Ultrastructure of the Fat Body and the Midgut in *Galleria mellonella*. *Toxins* [online]. 2021, **13**(9) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2072-6651. Dostępne z: doi:10.3390/toxins13090617
- [60] BOMAN, Hans G. a Dan HULTMARK. Cell-Free Immunity in Insects. *Annual Review of Microbiology* [online]. 1987, **41**(1), 103-126 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0066-4227. Dostępne z: doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.000535
- [61] COTTER, Gary, Sean DOYLE a Kevin KAVANAGH. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. 2000, **27**(2), 163-169 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09288244. Dostępne z: doi:10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x
- [62] BERGIN, David, Marc BRENNAN a Kevin KAVANAGH. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infection* [online]. 2003, **5**(15), 1389-1395 [cit. 2023-05-13]. ISSN 12864579. Dostępne z: doi:10.1016/j.micinf.2003.09.019
- [63] WU, Gongqing, Yi LIU, Ying DING a Yunhong YI. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell* [online]. 2016, **48**(4), 297-304 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00408166. Dostępne z: doi:10.1016/j.tice.2016.06.007
- [64] SHEEHAN, Gerard, Amy GARVEY, Michael CROKE a Kevin KAVANAGH. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ?. *Virulence* [online]. 2018, **9**(1), 1625-1639 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostępne z: doi:10.1080/21505594.2018.1526531
- [65] MOHAMED, Hend O. a Abdulraouf AMRO. Impact of different diets' nutrition on the fitness and hemocytic responses of the greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology* [online]. 2022, **83**(1) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2090-990X. Dostępne z: doi:10.1186/s41936-022-00274-x

- [66] ZHANG, Jian-Hua, Na YU, Xi-Xia XU a Ze-Wen LIU. Community structure, dispersal ability and functional profiling of microbiome existing in fat body and ovary of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Science* [online]. 2018, **26**(4), 683-694 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1672-9609. Dostupné z: doi:10.1111/1744-7917.12575
- [67] SKOWRONEK, Patrycja, Łukasz WÓJCIK a Aneta STRACHECKA. Fat Body—Multi-functional Insect Tissue. *Insects* [online]. 2021, **12**(6) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects12060547
- [68] ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* [online]. 2002, **415**(6870), 389-395 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/415389a
- [69] MODRZYŃSKI, Jakub J., Jan H. CHRISTENSEN a Kristian K. BRANDT. Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds. *Ecotoxicology* [online]. 2019, **28**(9), 1136-1141 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0963-9292. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-019-02107-0
- [70] MARTIN, D., A. WEISE a H.-J. NICLAS. The Solvent Dimethyl Sulfoxide. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1967, **6**(4), 318-334 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0570-0833. Dostupné z: doi:10.1002/anie.196703181
- [71] BRAYTON, Cory F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell veterinarian*. 1986, **76**(1), 61-90. Dostupné také z: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=coo.31924053530501&view=1up&seq=79>
- [72] HORITA, Akira a Lavern J. WEBER. Skin penetrating property of drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and other vehicles. *Life Sciences* [online]. 1964, **3**(12), 1389-1395 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/0024-3205(64)90079-7
- [73] KLIGMAN, Albert M. "Topical Pharmacology of Dimethyl Sulfoxide" - Parts I and 2. *J. of Amer. Med. Assn.* 1965, (193), 796-804, 923-928. Dostupné také z: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/656449>
- [74] SIGMA-ALDRICH. *Bezpečnostní list DMSO. Verze 6.3* [online]. 2023. Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/sds/SIGMA/D2650>
- [75] PubChem Compound Summary for CID 679, Dimethyl Sulfoxide. *PubChem, NCBI* [online]. [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-Sulfoxide>
- [76] Q3C Tables and List Rev. 4. *FDA* [online]. 2022 [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q3c-tables-and-list-rev-4>

- [77] Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety. *Gaylord Chemical* [online]. [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://www.gaylordchemical.com/environmental-health-safety/dmsso-health-safety/>
- [78] SUAY-GARCÍA, Beatriz, Pedro A. ALEMÁN-LÓPEZ, José Ignacio BUESO-BORDILS, Antonio FALCÓ, Gerardo ANTÓN-FOS a María Teresa PÉREZ-GRACIA. New solvent options for *in vivo* assays in the *Galleria mellonella* larvae model. *Virulence* [online]. 2019, **10**(1), 776-782 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2019.1659663
- [79] EMERY, Helena, Richard JOHNSTON, Andrew F. ROWLEY a Christopher J. COATES. Indomethacin-induced gut damage in a surrogate insect model, *Galleria mellonella*. *Archives of Toxicology* [online]. 2019, **93**(8), 2347-2360 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-019-02508-4
- [80] ALLEGRA, Enrico, Richard W. TITBALL, John CARTER a Olivia L. CHAMPION. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. *Chemosphere* [online]. 2018, **198**, 469-472 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.175
- [81] MOYA-ANDÉRICO, Laura, Marija VUKOMANOVIC, Maria del Mar CENDRA, Miriam SEGURA-FELIU, Vanessa GIL, José A. DEL RÍO a Eduard TORRENTS. Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. *Chemosphere* [online]. 2021, **266** [cit. 2023-05-13]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129235
- [82] ZHANG, Keyun, Weixian DING, Jie SUN, Bin ZHANG, Fujiao LU, Ren LAI, Yong ZOU a Gabriel YEDID. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. *Biochimie* [online]. 2014, **107**, 203-210 [cit. 2023-05-13]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2014.03.014
- [83] HAYDAKM, Mykola H. Is Wax a Necessary Constituent of the Diet of Wax Moth Larvae?1. *Annals of the Entomological Society of America* [online]. 1936, **29**(4), 581-588 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1938-2901. Dostupné z: doi:10.1093/aesa/29.4.581
- [84] KUBÍČEK, Jiří. *Zavedení bezobratlého zvířecího modelu, Galleria mellonella, pro studium účinnosti in vivo, stávajících a nově syntetizovaných, kandidátních antituberkulotik*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce Konečná, Klára.
- [85] POLOVÁ, Dominika. *Galleria mellonella in vivo model pro studium interakce antimikrobní látka vs. patogen*. 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce Konečná, Klára. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/109595>

- [86] KONEČNÁ, Klára, Adéla DIEPOLTOVÁ, Pavlína HOLMANOVÁ, et al. Comprehensive insight into anti-staphylococcal and anti-enterococcal action of brominated and chlorinated pyrazine-based chalcones. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, **13** [cit. 2023-05-13]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.912467
- [87] MUKHERJEE, Krishnendu, Eugen DOMANN a Torsten HAIN. The Greater Wax Moth *Galleria mellonella* as an Alternative Model Host for Human Pathogens. In: VILCINSKAS, Andreas, ed. *Insect Biotechnology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, 2011-10-20, s. 3-14 [cit. 2023-05-13]. ISBN 978-90-481-9640-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-9641-8_1
- [88] TORRES, Maritza, Elkin Nicolás PINZÓN, Flor Maria REY, Heydys MARTINEZ, Claudia Marcela PARRA GIRALDO a Adriana Marcela CELIS RAMÍREZ. *Galleria mellonella* as a Novelty *in vivo* Model of Host-Pathogen Interaction for *Malassezia furfur* CBS 1878 and *Malassezia pachydermatis* CBS 1879. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10** [cit. 2023-05-13]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.00199
- [89] MÉNARD, Guillaume, Astrid ROUILLON, Vincent CATTOIR a Pierre-Yves DONNIO. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2021, **11** [cit. 2023-05-13]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.782733
- [90] RAMARAO, Nalini, Christina NIELSEN-LEROUX a Didier LERECLUS. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (70) [cit. 2023-05-13]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/4392
- [91] ANTORAN, Aitziber, Leire APARICIO-FERNANDEZ, Aize PELLON, et al. The monoclonal antibody Ca37, developed against *Candida albicans* alcohol dehydrogenase, inhibits the yeast *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-65859-4
- [92] HYRŠL, Pavel. Ender BÜYÜKGÜZEL a K. BÜYÜKGÜZEL. Boric acid-induced effects on protein profiles of *Galleria mellonella* hemolymph and fat body. *Acta Biologica Hungarica* [online]. 2008, **59**(3), 281-288 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0236-5383. Dostupné z: doi:10.1556/ABiol.59.2008.3.2
- [93] MAGUIRE, Ronan, Martin KUNC, Pavel HYRSL a Kevin KAVANAGH. Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae. *Neurotoxicology and Teratology* [online]. 2017, **64**, 37-44 [cit. 2023-05-13]. ISSN 08920362. Dostupné z: doi:10.1016/j.ntt.2017.10.002
- [94] HESKETH-BEST, Poppy J, Michelle V MOURITZEN, Kayleigh SHANDLEY-EDWARDS, Richard A BILLINGTON a Mathew UPTON. *Galleria mellonella* larvae exhibit a weight-dependent lethal median dose when infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease* [online]. 2021, **79**(2) [cit. 2023-05-13]. ISSN 2049-632X. Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftab003

- [95] COOK, Simon M a Jason D MCARTHUR. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* [online]. 2014, **4**(5), 350-353 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.25240
- [96] EISENMAN, Helene C, Raymond DUONG, Hsi CHAN, Ryan TSUE a Erin E MCCLELLAND. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. *Virulence* [online]. 2014, **5**(5), 611-618 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.29234
- [97] MOWLDS, Peter a Kevin KAVANAGH. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* [online]. 2008, **165**(1), 5-12 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0301-486X. Dostupné z: doi:10.1007/s11046-007-9069-9
- [98] BANVILLE, Nessa, Niall BROWNE a Kevin KAVANAGH. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence* [online]. 2014, **3**(6), 497-503 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.21972
- [99] DE OLIVEIRA, V. P. a C. CRUZ-LANDIM. Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências Porto Alegre* [online]. 2003, **2**(11), 195-205 [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/277226002_Morphology_and_function_of_insect_fat_body_cells_A_review
- [100] HANLEY, Michael J., Darrell R. ABERNETHY a David J. GREENBLATT. Effect of Obesity on the Pharmacokinetics of Drugs in Humans. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2010, **49**(2), 71-87 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/11318100-000000000-00000
- [101] MOON, Barbara J. a Thomas H. CAREFOOT. The energy requirements of metamorphosis of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *Canadian Journal of Zoology* [online]. 1972, **50**(1), 67-75 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0008-4301. Dostupné z: doi:10.1139/z72-013
- [102] COSKUN, Mustafa, Tamer KAYIS, Mehmet YILMAZ, Osman DURSUN a Iskender EMRE. Copper and zinc impact on stress biomarkers and growth parameters in a model organism, *Galleria mellonella* larvae. *BioMetals* [online]. 2021, **34**(6), 1263-1273 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0966-0844. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-021-00341-w
- [103] FORASTIERO, A., L. BERNAL-MARTÍNEZ, E. MELLADO, E. CENDEJAS a A. GOMEZ-LOPEZ. *In vivo* efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2015, **46**(5), 511-517 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.007
- [104] Methyl Sulfoxide. *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)* [online]. [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh-rtecs/PV5EC1D0.html>

- [105] DURIEUX, Marie-Fleur, Élise MELLOUL, Sana JEMEL, Lolita ROISIN, Marie-Laure DARDÉ, Jacques GUILLOT, Éric DANNAOUI a Françoise BOTTEREL. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence* [online]. 2021, **12**(1), 818-834 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2021.1893945