

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



**Využití bezobratlého zvířecího modelu *Galleria mellonella* pro tvorbu
kvasinkových biofilmových společenství**

**Dominika Doubová
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.**

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal/a, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.

V Hradci Králové, 14.8.2023

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí této práce, RNDr. Kláře Konečné, Ph.D., za možnost vykonání diplomové práce pod jejím vedením v takto zajímavém oboru. Zároveň jí také děkuji za veškerý její čas, který mi věnovala a cenné rady. Poděkování patří samozřejmě i mé rodině za podporu nejen během celého studia.

ABSTAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studentka: Dominika Doubová

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití bezobratlého zvířecího modelu *Galleria mellonella* pro tvorbu kvasinkových biofilmových společenství

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo blíže představit bezobratlý organismus, *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), který lze v rámci vědeckého výzkumu využívat jako alternativní modelový organismus k obratlovcům. Model se jeví ekonomicky výhodnějším a morálně akceptovatelnějším, což je podstatný fakt v současné době, kdy stále roste tlak na upouštění testování zejména na obratlovcích. Experimentální část této práce se pak věnuje optimalizaci využití larvy *G. mellonella* jakožto modelového organismu v rámci výzkumu popáleninových zranění s fungálním infektem, vyvolaným kvasinkou *Candida albicans*. V rámci experimentů byly larvy využívány pro přípravu tkáňových explantů, na kterých probíhalo šetření formování monodruhového kvasinkového biofilmu.

Metody: Před získáváním tkáňových explantů byly larvy usmrceny dekapitací. Za účelem omezení kontaminace tkáňových vzorků především střevní mikrobiotou larev byl optimalizován přístup odstranění trávicí trubice. Popáleninové rány byly indukovány *post mortem* pomocí kovového terčíku. Po infekci popáleninových ran a inkubaci byla sledována tvorba kvasinkového biofilmu pomocí mikroskopických metod. Pro přibližné určení kontaminace rány mikrobiotou larvy byly voleny kultivační, mikroskopické a biochemické metody.

Výsledky: V rámci optimalizace metodického přístupu se zadařilo získat až tři reprezentativní explanty kutikuly z jedné larvy. V rámci našich experimentů se nám nezadařilo prokázat tvorbu monodruhového kvasinkového biofilmu v popáleninové ráně explantu larvální kutikuly. Zadařilo se nám prokázat, že po

infekci kvasinkou *C. albicans* dochází k invazi fungálního agens do hlubších vrstev tkáňového explantu (invazivní kandidóza). Zaznamenaly jsme přítomnost mikrobioty larev jak v hemolymfě, tak rovněž v homogenátu tkáňového explantu.

Závěr: Dle našich poznatků se nezdá být využití tkáňových explantů (explantů kutikuly larev) pro formování monodruhových kvasinkových biofilmových společenství v indukovaných popáleninových ranách jako zcela optimální volba. Je třeba brát v potaz, že larvy *G. mellonella* si nesou určitou mikrobiální zátěž, a to v celém svém organismu. Na základě této skutečnosti, tvorba monodruhových biofilmových společenství vybraných patogenů s využitím *G. mellonella* se pak stává experimentálně nesnadnou.

Klíčová slova: Biofilm, *Galleria mellonella*, *Candida albicans*

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Dominika Doubová

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title: Study of the development of microbial biofilm within an experimental model, *Galleria mellonella*

Aim of the thesis: The aim of this thesis is to introduce the invertebrate organism, *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), that can be used within the scientific research as an alternative model organism to vertebrates. This model seems to be more financially favorable and more ethically acceptable, which is an essential fact in the current era of increasing pressure to abandon testing on vertebrates in particular. The experimental part of this thesis is focused on optimizing the utilization of the *G. mellonella* larvae as a model organism within the research of fungal burn wounds fungal infections induced by the yeast *Candida albicans*. Within these experiments, larvae were used to preparation of tissue explants on which the formation of a single-species yeast biofilm was investigated.

Methods: Before obtaining of tissue explants, the larvae were decapitated. To reduce contamination of tissue samples primarily by the gut microbiota of the larvae, the approach of removing the digestive tube was optimized. Burn wounds were induced *post mortem* using a iron nail. After the burn wound infection and incubation, microscopic methods were employed for monitoring of yeast biofilm formation. Cultivation, microscopic and biochemical methods were chosen to approximate determination of microbial contamination of the wound by larval microbiota.

Results: Optimization of the methodological approach resulted in obtaining up to three representative cuticle explants from a single larva. In our experiments, we did not registered the formation of a mono-species yeast biofilm in the burn wound of a larval cuticle explant. We were able to demonstrate that after infection

with the yeast *C. albicans*, the fungal agent invades into deeper layers of the tissue explant (invasive candidiasis). We observed the presence of larval microbiota in the hemolymph as well as in the homogenate of the tissue explant.

Conclusion: According to our findings, the use of tissue explants (larval cuticle explants) for the formation of mono-species yeast biofilm communities in induced burn wounds doesn't appear to be optimal choice. It should be taken into account, that larvae of *G. mellonella* are associated with microbial load within the whole body. Based on this fact, employment of *G. mellonella* for formation of mono-species biofilm communities of selected pathogens *in vivo* is experimentally difficult.

Keywords: Biofilm, *Galleria mellonella*, *Candida albicans*

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
2	ÚVOD a cíl práce	14
3	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1	<i>Galleria mellonella</i>	15
	3.1.1 Základní informace o alternativním zvířecím modelu, <i>Galleria mellonella</i>	15
	3.1.2 Postavení organismu <i>Galleria mellonella</i> ve vědě.....	16
	3.1.3 Odchov <i>Galleria mellonella</i> v laboratoři	20
	3.1.4 Anatomický popis larvy <i>Galleria mellonella</i>	22
	3.1.5 Imunitní systém larvy <i>Galleria mellonella</i>	23
	3.1.6 Mikrobiota larvy <i>Galleria mellonella</i>	29
3.2	Mikrobiální biofilmy	31
	3.2.1 Základní informace o mikrobiálních biofilmech.....	31
	3.2.2 Formování mikrobiálních biofilmů – jednotlivé vývojové fáze	31
	3.2.3 Skladba a architektura biofilmu	33
	3.2.4 <i>Quorum sensing</i>	36
	3.2.5 Biofilmy v rámci klinické praxe.....	37
	3.2.6 Charakteristika infekčních onemocnění spojených s tvorbou biofilmu	38
	3.2.7 Pro nás významné mikroorganismy podílející se na formování biofilmů	39
3.3	<i>Candida albicans</i>.....	40
	3.3.1 Základní informace o kvasince <i>Candida albicans</i>	40
	3.3.2 <i>Candida albicans</i> jakožto původce infekčních onemocnění	40
3.4	Přístupy využití larvy <i>Galleria mellonella</i> jako modelového organismu pro formování biofilmu a indukci invazivní kandidózy	44
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
4.1	Seznam pomůcek, chemikálií a přístrojů.....	46

4.2	Optimalizace přípravy mikrobiálního inokula pro následné infekce „<i>burn-wound</i>“ modelu <i>ex vivo</i>	49
4.2.1	Pracovní hypotéza	49
4.2.2	Postup	50
4.2.3	Hodnocení a výsledky	50
4.3	Optimalizace přístupu vedoucího k odstranění trávicí trubice a vnitřních tělesných kompartmentů larvy <i>Galleria mellonella</i> ..	53
4.3.1	Pracovní hypotéza	53
4.3.2	Postup	54
4.3.3	Hodnocení a výsledky	55
4.4	Získávání explantů kutikuly larvy <i>Galleria mellonella</i> a následná indukce popáleniny	57
4.4.1	Pracovní hypotéza	57
4.4.2	Postup	58
4.4.3	Hodnocení a výsledky	59
4.5	Využití diagnostického barvení dle Grama pro přibližné zařazení mikrobiálních kontaminantů do taxonů	62
4.5.1	Pracovní hypotéza	62
4.5.2	Postup	62
4.5.3	Hodnocení a výsledky	62
4.6	Infekce indukovaných popáleninových ran na tkáňových explantech udržovaných ve hmyzím fyziologickém roztoku suplementovaným hemolymfou larev <i>Galleria mellonella</i>	64
4.6.1	Pracovní hypotéza	64
4.6.2	Postup	64
4.6.3	Hodnocení a výsledky	66
4.7	Hodnocení tvorby kvasinkového biofilmu v indukované popálenině tkáňových explantů tvořených z komerčně dostupných larev	67
4.7.1	Pracovní hypotéza	67
4.7.2	Postup	67
4.7.3	Hodnocení a výsledky	68

4.8 Šetření mikrobiálního zatížení hemolymfy komerčně dostupných larev	71
4.8.1 Pracovní hypotéza	71
4.8.2 Postup:	71
4.8.3 Závěr	73
4.9 Hodnocení tvorby biofilmového společenství tvořeného kvasinkou <i>Candida albicans</i> v popáleninové ráně explantu kutikuly larvy <i>Galleria mellonella</i> z vlastního chovu	74
4.9.1 Postup	74
4.9.2 Hodnocení a výsledky	74
4.10 Infekce indukovaných ran tkáňových explantů kvasinkou <i>Candida albicans</i> - udržování explantů v médiu suplementovaném glukózou 77	77
4.10.1 Pracovní hypotéza	77
4.10.2 Postup	78
4.10.3 Hodnocení a závěr	79
4.11 Určení mikrobiální zátěže hemolymfy larev <i>Galleria mellonella</i> z vlastního odchovu a určení přítomnosti infekčního činitele, <i>C. albicans</i> po infekci indukovaných popáleninových ran v explantech larev z komerčního chovu.....	82
4.11.1 Pracovní hypotéza	82
4.11.2 Postup	82
4.11.3 Hodnocení a závěr	83
4.12 Biochemické určení mikroorganismů nalezených v homogenátu infikovaných tkáňových explantů získaných z komerčně dostupných larev a hemolymfy odchovaných larev	86
4.12.1 Pracovní hypotéza	86
4.12.2 Postup	86
4.12.3 Hodnocení a závěr	87
4.13 Bližší určení neznámého mikrobiálního agens, které tvoří součást mikrobioty komerčně dostupných larev <i>Galleria mellonella</i>	89
4.13.1 Pracovní hypotéza	89

4.13.2	Postup	89
4.13.3	Hodnocení a závěr	92
5	DISKUSE	94
6	ZÁVĚR.....	98
7	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	99
8	LITERATURA	102

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam zkratky	Český ekvivalent
„3R“	Replace, Reduction and Refine	náhrada, snížení počtu, zjemnění
c-di-GMP	Bis-(3'- 5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate	bis-(3'-5')-cyklický dimerní guanosinmonofosfát
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Kandida bělostná
EPS	Extracellular polymeric substance	extracelulární polymerní substance
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>	zavíječ voskový
IC	Invasive candidiasis	invazivní kandidóza
IPS	insect phosphate buffer	hmyzí fyziologický roztok
MBC	Minimum bactericidal concentration	minimální baktericidní koncentrace
MIC	Minimum inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NAM	New approach methodologies	nové metodické přístupy
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	s patogenem asociované molekulární vzory
PI	Propidium iodide	propidium jodid
QS	<i>Quorum sensing</i>	
SSSB	Standardized skin surface biopsy	standardizovaná biopsie kůže

TIS	Transposon insertion sequencing	sekvenování inzerovaných transpozonů
TLR	Toll-like receptor	receptor podobný genu Toll
TNF α	Tumour necrosis factor alpha	faktor nádorové nekrózy alfa

2 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V současné době je jedním z významných medicínských problémů nárůst mikrobiálních infekcí, které jsou odolné vůči antimikrobní léčbě, proto je důležité v rámci výzkumu neustále hledat a testovat nové látky, které budou efektivní i vůči rezistentním původcům infekcí. Mezi původce takových infekcí patří bakterie a v některých případech to mohou být i kvasinky. V případě bakterií i kvasinek k celkové rezistenci přispívá i schopnost tvořit biofilmy.

Kromě snahy stále hledat nové látky je v průběhu jejich testování kladen čím dál tím větší důraz na "3R" (Replacement, Reduction, Refinement – nahrazení, redukce, zdokonalení). V podstatě se jedná o snahu zacházet se zvířecími modely s co největším důrazem na etiku a pokud je to možné, tak i snížit počet laboratorních zvířat, která jsou užitá k testování. I tomuto faktu se část této diplomové práce věnuje. Jako model pro testování je v této práci představena larva motýla *Galleria mellonella*, která by mohla sloužit jako náhrada modelových organismů, obratlovců. Její výhodou jakožto modelového organismu je to, že experimenty na larvě *Galleria mellonella* nepodléhají schvalování etickou komisí, zároveň se jedná o modelový organismus, který lze snadno odchovat bez jakýchkoliv specifických nároků například na vybavení a je ekonomicky výhodný.

Tato práce měla v experimentální části v podstatě dva hlavní cíle. Prvním z cílů byla snaha nalézt postup, jak co nejefektivněji využít larvální model *Galleria melonella* pro indukci infekce v popáleninové ráně. Druhým cílem pak bylo zjistit, za jakých podmínek dochází na larvách, respektive na jejich indukovaných popáleninových zraněních, k formování monodruhových kvasinkových biofilmů, na kterých by pak bylo možné testovat účinnost kandidátních antimikrobních látek, či různých kombinací antimikrobních léčiv.

3 TEORETICKÁ ČÁST

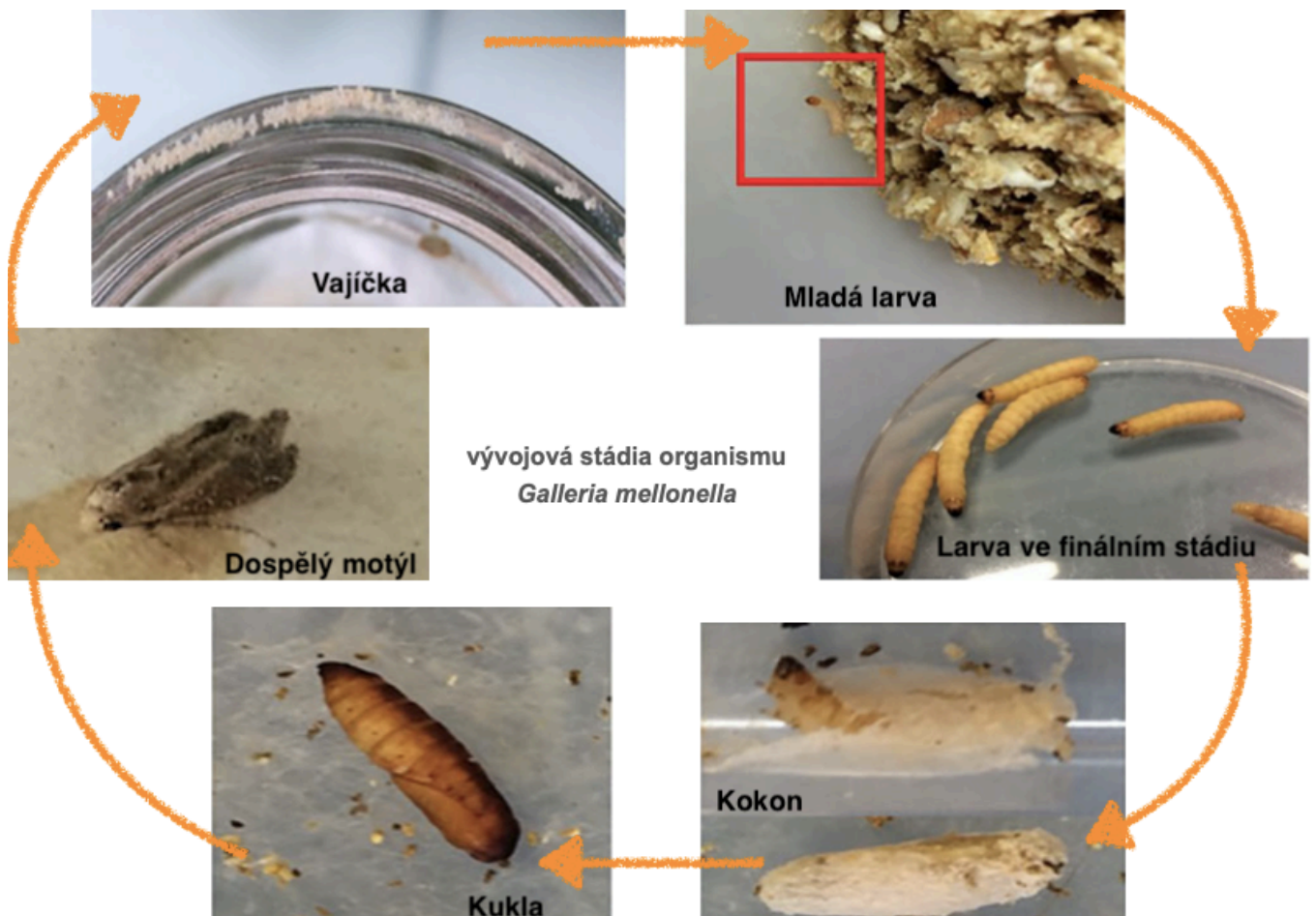
3.1 *Galleria mellonella*

3.1.1 Základní informace o alternativním zvířecím modelu, *Galleria mellonella*

Galleria mellonella (*G. mellonella*), neboli zavíječ voskový patří mezi hmyz z řádu *Lepidoptera*. Tento organismus je rozšířen prakticky celosvětově. Obvykle žije uvnitř včelích úlů, živí se voskem a pylem z pláství a je považován za škůdce způsobujícího včelí chorobu zvanou gallerióza. Kromě včelstev se může gallerióza vyskytovat také u vos a čmeláků, tento jev je ale méně častý (Wojda 2017).

Jedná se o typického zástupce holometabolického hmyzu s úplným cyklem metamorfózy. To znamená, že organismus *G. mellonella* v průběhu života prochází několika vývojovými stádii (Obr. 1), mezi která patří: vajíčko, larva, kukla a dospělý jedinec (Ménárd *et al.* 2021).

Životní cyklus organismu *G. mellonella* trvá v rozmezí 5-6 týdnů (nebo 6-8 týdnů, zde se informační zdroje rozcházejí) a během jednoho roku dochází k obnově 4-6 generací. Cyklus se odehrává při teplotách v rozmezí 29-39 °C (Singkum *et al.* 2019, Kwadha *et al.* 2016).



Obr. 1: Jednotlivá vývojová stádia organismu *Galleria mellonella*.

Převzato a upraveno z Ménárd *et al.* 2021

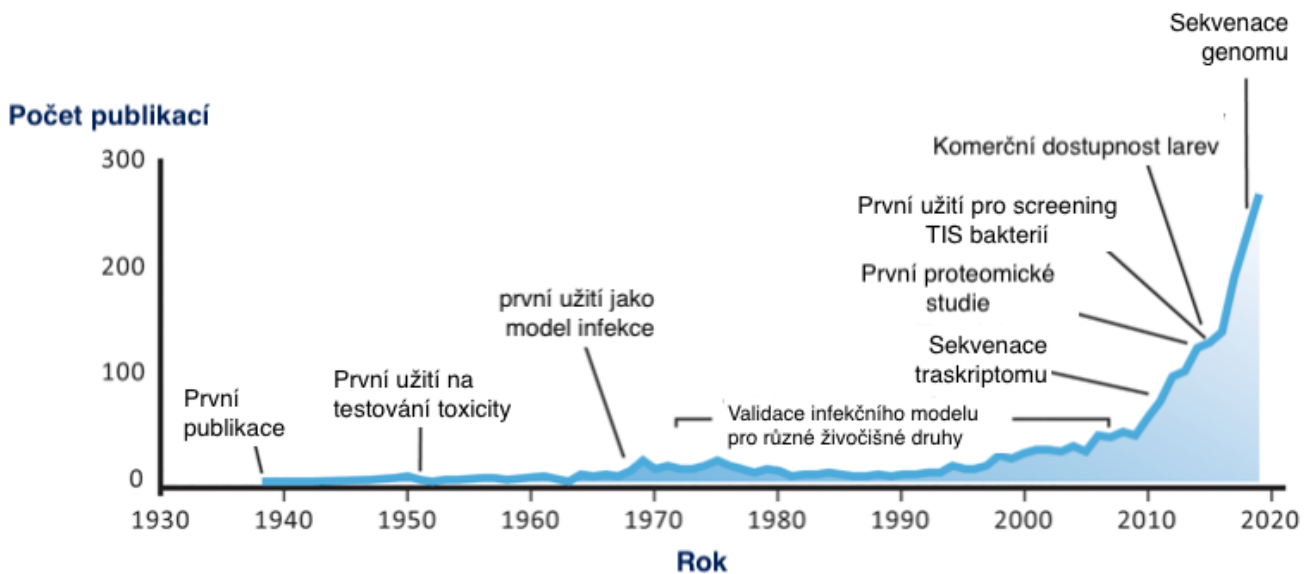
3.1.2 Postavení organismu *Galleria mellonella* ve vědě

Obecně lze konstatovat, že pro studium bakteriální, virové nebo fungální infekce je vhodné vybrat takový modelový organismus, který dokáže co nejlépe mimikovat prostředí lidského organismu od fáze kolonizace až po samotnou obrannou imunitní reakci. Nejběžněji využívanými modelovými organismy v rámci biomedicínského výzkumu jsou obratlovci, hlavně zajícovci (například: myši, krysy, morčata, králíci). Jejich časté využití je zapříčiněno jejich imunologickou podobností s člověkem. Využití těchto modelových organismů v experimentech má však jistá úskalí. Jedná se o logistické, ekonomické i etické komplikace. A právě z těchto důvodů se jeví výhodné v rámci experimentů jako alternativu k obratlovcům využít bezobratlé organismy (Mikulak *et al.* 2018).

Larva *G. mellonella* je celosvětově považována za vhodný experimentální model. Využívá se pro studium infekcí způsobených bakteriálními a fungálními patogeny, pro screening nových antimikrobních látek, dále pro studium imunitní odpovědi v případě koinfekce, interakce hostitel – patogen, nebo jako model pro studium toxicity (Junquiere 2014, Serrano *et al.* 2023).

Využití larvy *G. mellonella* je také v souladu s principy „3R“ (Replace, Reduction and Refine). Cílem je co nejvíce nahradit obratlovce a následně snížit počet savců, kteří jsou využíváni jako modelové organismy pro experimentální výzkum. *G. mellonella*, patřící mezi bezobratlý hmyz, není zahrnuta do etických pokynů ani právních předpisů o podmínkách jak zacházet s laboratorními zvířaty, což je jeden z důvodů, proč se jeví jako výhodný experimentální model.

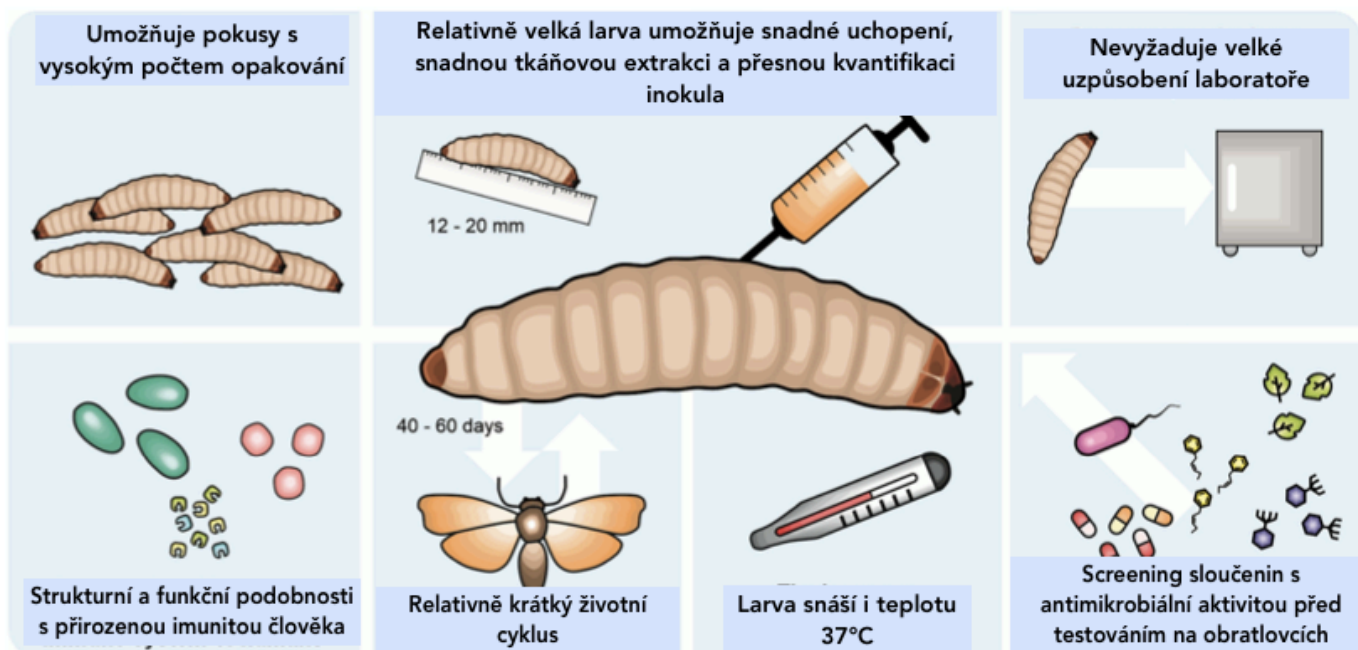
To, že je *G. mellonella* stále oblíbenějším modelem pro vědecký výzkum je patrné i z níže přiloženého obrázku (Obr. 2). První užití této larvy ve vědě proběhlo v roce 1938 (Smith 1938), již v roce 1951 byla na tomto modelu testována *in vivo* toxicita antituberkulotik (Ingrao *et Belli* 1951), později pak i antimykotik (Morellini *et Avegno* 1957, Smisman *et al.* 1961). V průběhu 60. – 90. let byl tento model využíván pro testování virulence různých bakteriálních patogenů. Od roku 2000 je pak larva *G. mellonella* využívána jako *in vivo* model ve farmakologických studiích a studiích zabývajících se virovými, bakteriálními i fungálními infekcemi (Dinh *et al.* 2021).



Obr. 2: Časová osa vývoje užití *G. mellonella* jako modelového organismu pro vědecký výzkum. Počet publikací za rok odpovídá počtu publikací nalezených v PubMed pomocí vyhledávání výrazu „*Galleria mellonella*“. TIS – transposon insertion sequencing, skeyvenování inzerovaných transpozonů

Převzato z Dinh *et al.* 2021 a upraveno

Využití larvy *G. mellonella* skýtá řadu výhod (Obr. 3). Oproti savčím modelům je modelový organismus *G. mellonella* méně náročný v rámci chovu, ani nevyžaduje žádné velké prostorové přizpůsobení laboratoře. Velikost larev, která je zhruba 12-20 mm, pak umožňuje snadnou manipulaci a v případě potřeby i docela snadný odběr tkání. Další nespornou výhodou je to, že larvy jsou poměrně veliké a díky tomu je možné nanést přesně definované množství infekčního inokula, se kterým se v rámci experimentů pracuje. Za zmínku pak stojí také krátký životní cyklus organismu, což umožňuje provádění studií s vysokým výnosem informací, kdy můžeme během poměrně krátkého časového úseku experiment několikrát zopakovat, a to i díky větší dostupnosti těchto experimentálních zvířat. Výhodu v užití tohoto modelu pak také lze spatřovat v tom, že se zde nachází strukturní a funkční podobnost se složkami, které jsou rovněž součástí lidské přirozené imunity (Pereira *et al.* 2020).



Obr. 3: Shrnutí výhod nabízených modelovým organismem *Galleria mellonella*.

Převzato z Pereira *et al.* 2020 a upraveno

Velkým celosvětovým problémem je léková rezistence bakteriálních i fungálních patogenů. Z toho důvodu je třeba neustále hledat různé způsoby a terapeutické přístupy pro léčbu infekcí vyvolaných především rezistentními původci. V oblasti výzkumu toxicity různých látek obecně stále narůstá tlak, aby bylo testování na zvířatech nahrazeno jinými metodami a strategiemi. Tento přístup se označuje jako metodologie nového přístupu, označováno také zkratkou NAM (new approach methodologies). NAM zahrnují metody *in vitro*, *in chemico* a *in silico*. Velký potenciál je v současné době viděn v *in vitro* metodách založených na lidských buňkách. Nahradit pokusy na zvířatech je však v současné době stále obtížné (Zink *et al.* 2020).

Použití savců, jako modelových organismů je tedy evidentně stále zásadní pro hodnocení bezpečnosti a účinnosti látek. Larva *G. mellonella* se však zdá být vhodným modelem pro vyhodnocování aktivity nových látek metodou *in vivo* a právě díky ní by mohlo dojít ke snížení počtu využívaných savčích modelových organismů (Kavanagh *et Sheehan* 2018).

Studie testování antimikrobiální aktivity na larvách *G. mellonella* poukazují na silnou korelaci s výsledky na savčích modelech (Peleg *et al.* 2009). Díky tomuto zjištění je možné využívat larvy *G. mellonella* jak k rychlé identifikaci *in vivo* toxicity, tak i k testování *in vivo* účinnosti sloučenin, což by následně mohlo vést k cílenějšímu

testování látek na savčích modelech (Piatek *et al.* 2020). V praxi to znamená, že by pouze ty sloučeniny, které slibně prošly fází testování na larvách, postoupily k testování na savčích modelech.

3.1.3 Odchov *Galleria mellonella* v laboratoři

Získání larev pro experimenty má jistá úskalí, a to v podobě toho, že doposud chybí dobře zavedené protokoly pro odchov larvy *G. mellonella*. Jednou z možností je získání larev komerční cestou, z chovu TruLarv (BioSystems Technology, Spojené království Velké Británie a Severního Irska). Zde se však vyskytuje problém v podobě distribuce z původní chovné laboratoře do destinace. Jak již bylo výše zmíněno, podmínky, kterým je *G. mellonella* vystavena, mají vliv na imunitní odpověď jejího organismu (Banville *et al.* 2012, Jorjão *et al.* 2018).

V případě, že je jedinec vystaven nepříznivým vlivům, může dojít k negativnímu ovlivnění celého výzkumu. Jelikož je samozřejmě snaha zachovat co nejvíce standardizované a následně reprodukovatelné experimenty, tak se jako lepší strategie jeví druhá možnost získávání larev, tou je odchov jedinců *G. mellonella* přímo v laboratořích.

Samotný odchov jedinců *G. mellonella* je poměrně nenáročný (Obr. 4). V podstatě postačuje několik skleněných nebo plastových nádob s vhodným odvětráním. Jedna z nádob slouží pro umístění motýlů, kteří kladou vajíčka. Vajíčka jsou pak uchovávána samostatně v další nádobě a zde se z nich líhnou larvy. Ty jsou krmeny až do chvíle, kdy postupně začnou tvořit zámotek (kokon). V určitou chvíli jsou tedy v jedné nádobě přítomny larvy i kokony. Pak znovu následuje stádium motýla, které je chováno opět samostatně (Pereira *et Rossi* 2020).

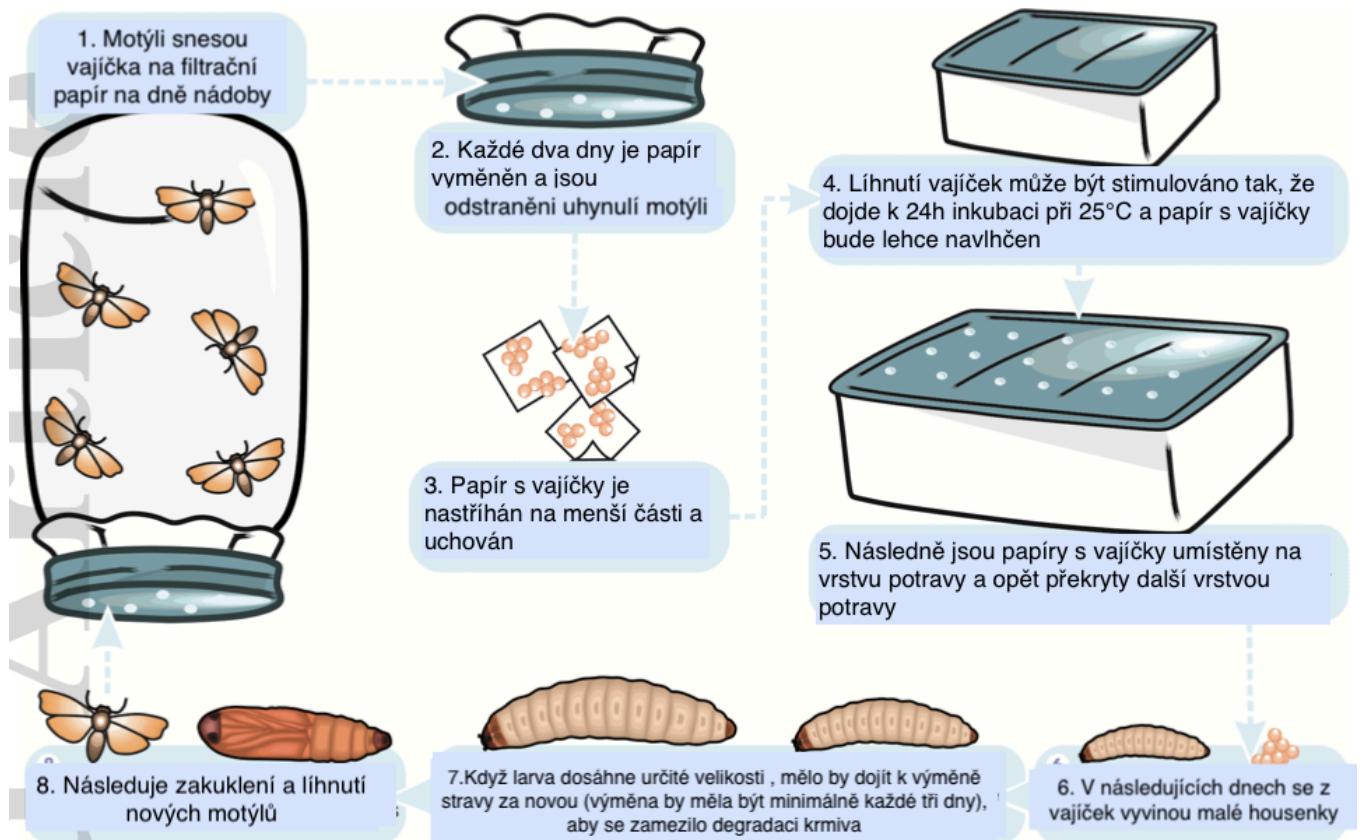
Při odchovu tohoto organismu v laboratorních podmínkách se viabilita vajíček v závislosti na jednotlivých výzkumech pohybuje v rozmezí mezi 84 a 100 % (Wojda *et al.* 2020).

V přirozeném prostředí se larvy *G. mellonella* živí plástvemi z včelích úlů. Jedná se o stravu, která zahrnuje vysoký podíl včelího vosku, med, pozůstatky skeletů včelích larev a pyl. Tato strava je pro larvy bohatým zdrojem energie, ale je poměrně chudá na bílkoviny. Pokud klesne příjem bílkovin pod určitou hranici, larvy přestanou tvořit hedvábí, ze kterého si pak formují kokon v dalším vývojovém stádiu. Jejich růst a vývoj

je tím celkově zpomalen (Wojda *et al.* 2020). Kromě příjmu bílkovin má na kondici larev vliv také teplota prostředí, ve kterém jsou chovány. Optimum je okolo 30°C. Při teplotě mezi 4-5 °C je růst larev zpomalen. (Singkum *et al.* 2019).

Nabízejí se v podstatě dvě možnosti, jak larvy živit. První možností je chov larev vylíhnutých z vajíček na včelím plástu. Druhou možností je podávání umělé stravy, která se skládá z cereální složky, sušeného mléka, kvasnic, medu a glycerolu.

Existují důkazy, že kvalita stravy má zásadní vliv na kondici larev. Jedinci, kterým se nedostává dostatek živin projevují vyšší vnímavost vůči infekcím (Wojda *et al.* 2020). Hladovění má negativní vliv na metabolickou aktivitu larvy, dochází ke zpomalení metabolických procesů organismu, ke snížené produkci proteinů, mezi které se řadí i antimikrobiální peptidy. Právě tyto peptidy hrají roli v imunitní odpovědi vůči patogenu (Banville *et al.*, 2012).



Obr. 4: Schéma odchovu modelového organismu *Galleria mellonella* v laboratorních podmínkách.

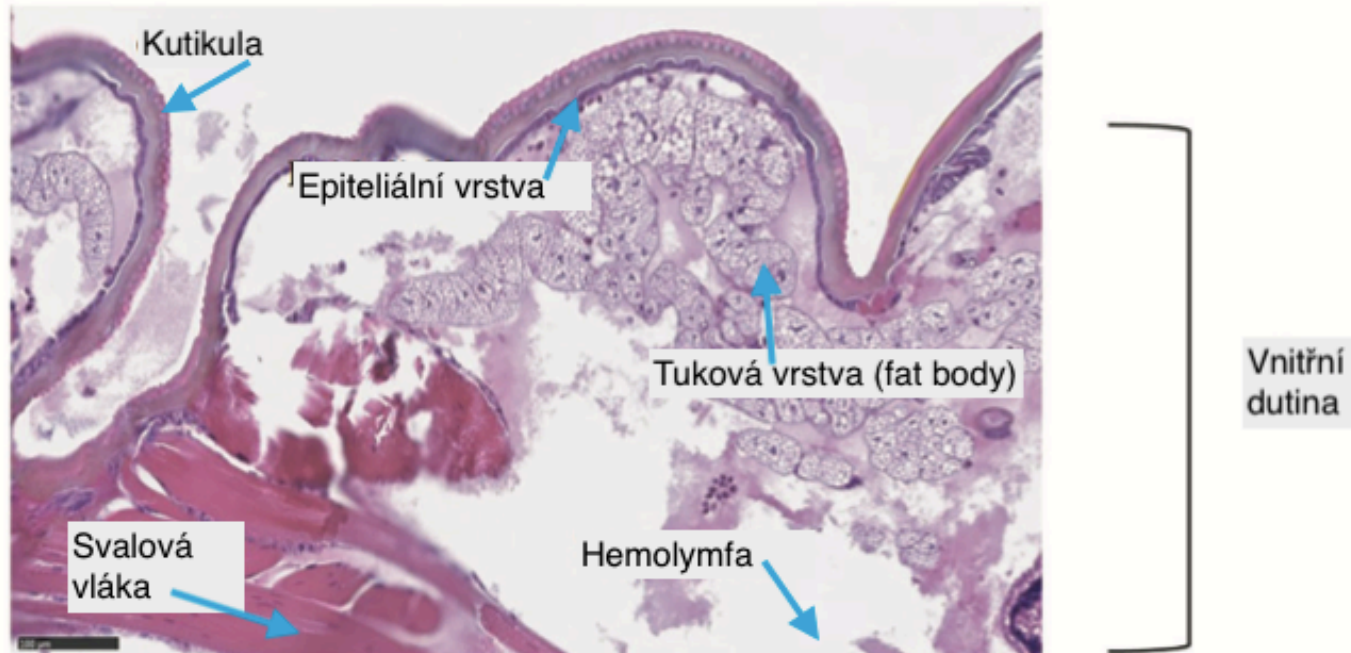
Převzato z Pereira *et Rossi*, 2020 a upraveno

3.1.4 Anatomický popis larvy *Galleria mellonella*

V experimentální části této práce jsou uvedeny kroky, během kterých bylo nutné odstranit trávicí trubici larvy *G. mellonella*, proto je žádoucí v rámci této práce se rámcově obeznámit se základní anatomií larev tohoto hmyzu.

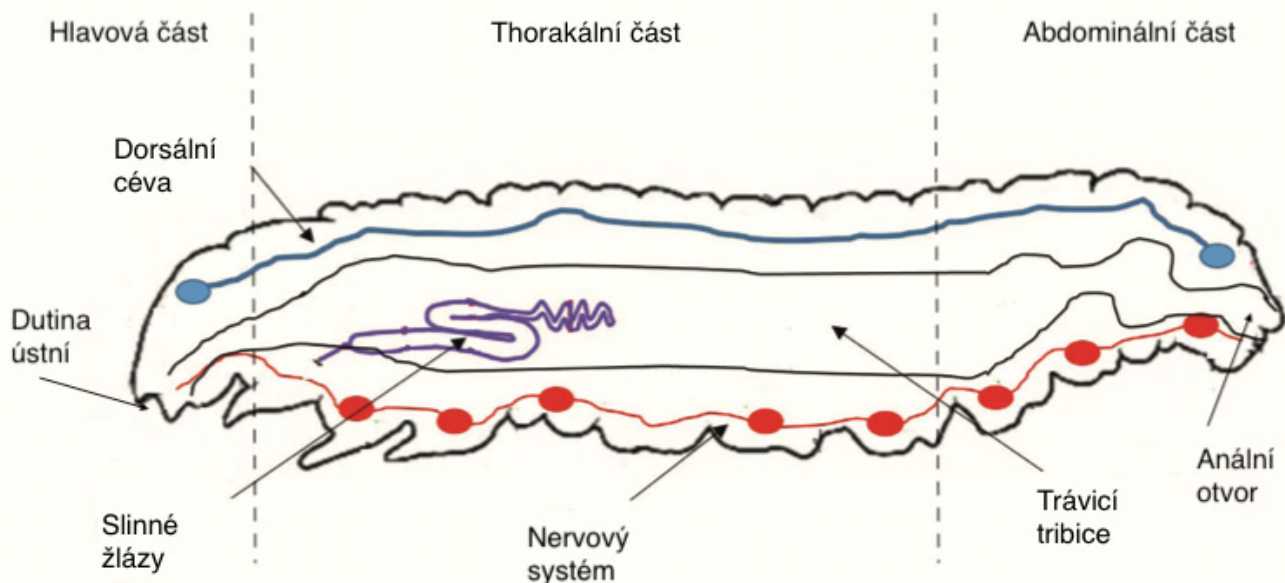
Tělo larvy má podlouhlý zaoblený tvar a je kryto kutikulou krémové barvy. Hlavička larvy má tmavší barvu. Tělo se skládá ze segmentů, které tvoří tři anatomické části: hlavičku, hruď a zadeček (Obr. 6). V rámci hrudní (thorakální) části se nachází tři páry nožiček, v abdominální části se pak nachází ještě jeden pár panožek.

Pod kutikulou má pak larva tenkou epitelální vrstvu následovanou tukovou vrstvou – takzvané „fat body“ (Obr. 5). Vnitřní dutina tělíčka je vyplněna hemolymfou, která v podstatě plní úděl cirkulačního systému. Trávicí trubice pak vede napříč celým tělem larvy. Za hlavičkou, v hrudní části se nachází slinné žlázy sloužící k produkci hedvábí, které larva produkuje, aby si vytvořila kokon. Ve hřbetní oblasti se podél celého těla táhne dorzální céva, v břišní oblasti je pak nervová trubice (Durieux *et al.* 2021, Ménárd *et al.* 2021, Singkum *et al.* 2019).



Obr.5: Analýza histologické sekce larvy *Galleria mellonella*. Povrchový systém zahrnuje kutikulu a tenkou epitelální vrstvu. Vnitřní dutina se mimo jiné skládá z tukových vrstev, svaloviny a hemolymfy, cévní soustavy a trávicí trubice.

Převzato z Ménárd *et al.* 2021 a upraveno



Obr. 6: Schématické znázornění anatomie larvy *Galleria mellonella* znázorňující hlavovou, thorakální a abdominální oblast.

Převzato z Ménárd *et al.*, 2021 a upraveno

3.1.5 Imunitní systém larvy *Galleria mellonella*

To, že je v rámci vědeckého výzkumu výhodné využívat larvu *G. mellonella* z ekonomických a etických důvodů, i díky poměrně snadnému odchovu v laboratoři již bylo zmíněno. Další nespornou výhodou je skutečnost, že imunitní systém této larvy vykazuje v rámci složek a imunitních mechanismů výraznou podobnost se složkami přirozené imunity savců, tedy i člověka. (Pereira *et al.* 2020). V odborných textech je dokonce imunitní systém hmyzu, tedy i larvy *G. mellonella* popisován jako „evoluční kořeny lidské vrozené imunity“, a to právě proto, že sdílí společné rysy s přirozenou imunitou člověka (Vilmos *et Kurucz* 1998, Wojda *et al.* 2020).

Za první obrannou bariéru, díky které larva, potažmo hmyz obecně, vykazují vysokou odolnost proti infekcím je považována pevná kutikula. Kutikula formuje mechanickou bariéru účinně chránící organismus před mikrobiální invazí. Další obrannou bariéru pak vytváří tuková tkáň. Podle současných poznatků tuková vrstva plní funkci biosyntetického orgánu a lze ji tak považovat za funkční analog jater u savců. Lymfatická žláza ležící na předním konci dorsální cévy produkuje hemocyty, které jsou zahrnuty v dalších obranných, nespecifických imunitních mechanismech. (Vilmos *et Kurucz* 1998).

G. mellonella disponuje pouze nespecifickými (vrozenými) imunitními mechanismy. Vrozená imunitní odpověď larvy je založena na dvou pilířích – buněčné a humorální imunitní odpovědi. Buněčnou odpověď zprostředkovávají již výše zmíněné buňky zvané hemocyty, které mají schopnost fagocytózy, enkapsulace a srážení. Nacházejí se volně v hemolymfě, kterou lze považovat za analog krve u savců. Humorální imunitní odpověď je zprostředkována pomocí tzv. efektorových molekul, které mají schopnost patogen imobilizovat nebo dokonce usmrtit. Mezi tyto efektorové molekuly se řadí proteiny, které jsou podobné komplementu, melanin a antimikrobiální peptidy (Tsai *et al.* 2016).

V následujících několika podkapitolách jsou uvedeny skutečnosti na základě, kterých lze vyvozovat analogii imunitního systému larev *G. mellonella* a imunitního systému člověka.

3.1.5.1 Toll a Toll-like receptory

Během studia obranyschopnosti mušky *Drosophila melanogaster* (octomilka) byla na buňkách hemolymfy tohoto hmyzu objevena skupina transmembránových receptorů. Tyto receptory se pak shodně nalézají i u larvy *G. mellonella*. Jedná se o receptory, které mají schopnost reagovat se strukturami, které nejsou tělu vlastní, tedy například s mikroby. Tyto receptory byly nazvány *Toll*. O něco později byly velmi podobné receptory nalezeny i na buňkách imunitního systému savců, a právě na základě jejich podobnosti s výše zmíněnými receptory hmyzu byly nazvány *Toll-like* receptory (TLR, Toll-like receptors). Výzkumem bylo prokázáno, že *Toll* receptory hmyzu i TLR savců plní obdobnou úlohu spočívající v rozpoznání cizorodých, tedy i potenciálně nebezpečných struktur a aktivaci složek imunitního systému.

Tyto receptory se vyskytují jak intracelulárně, tak extracelulárně. Znamená to, že mají schopnost rozeznat patogen na svém povrchu i nitrobuněčně. Homologii u savčích i hmyzích receptorů lze sledovat u cytoplazmatické domény receptoru i u extracelulární domény, která se skládá z několika na leucin bohatých repetit. I přes tuto podobnost, ale existují i určité strukturní a funkční rozdíly. Savčí TLR na C-konci terminální domény leucinového řetězce obsahují jeden cysteinový shluk, zatímco *Toll-like* receptory larvy na tomto konci obsahují cysteinových shluků více (Imler *et Zheng* 2004, Sheehan *et al.* 2018).

TLR jsou schopné mikrobiální agens rozeznávat na základě tzv. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). PAMP jsou molekulární struktury a vzory, které jsou přítomny na povrchu mikrobů. Prostřednictvím *Toll* a TLR pak dochází k rozeznání hrozby a k aktivaci složek přirozené imunity. U hmyzu i savců dochází k iniciaci podobných signálních drah a ty pak následně vedou k aktivaci homologních transkripčních faktorů. Drobný rozdíl je pouze na počátku iniciačního mechanismu. U savců dochází k přímému navázání mikrobiálních antigenních determinant na TLR a tím nastává přímá aktivace celé kaskády dějů. V případě hmyzu dochází v místě mikrobiální invaze k produkci proteinu tvořícího cysteinový uzlík. Tento uzlík se váže na receptor, a to následně vede k aktivaci imunitní odpovědi (Jílek 2014, Sheehan *et al.* 2018).

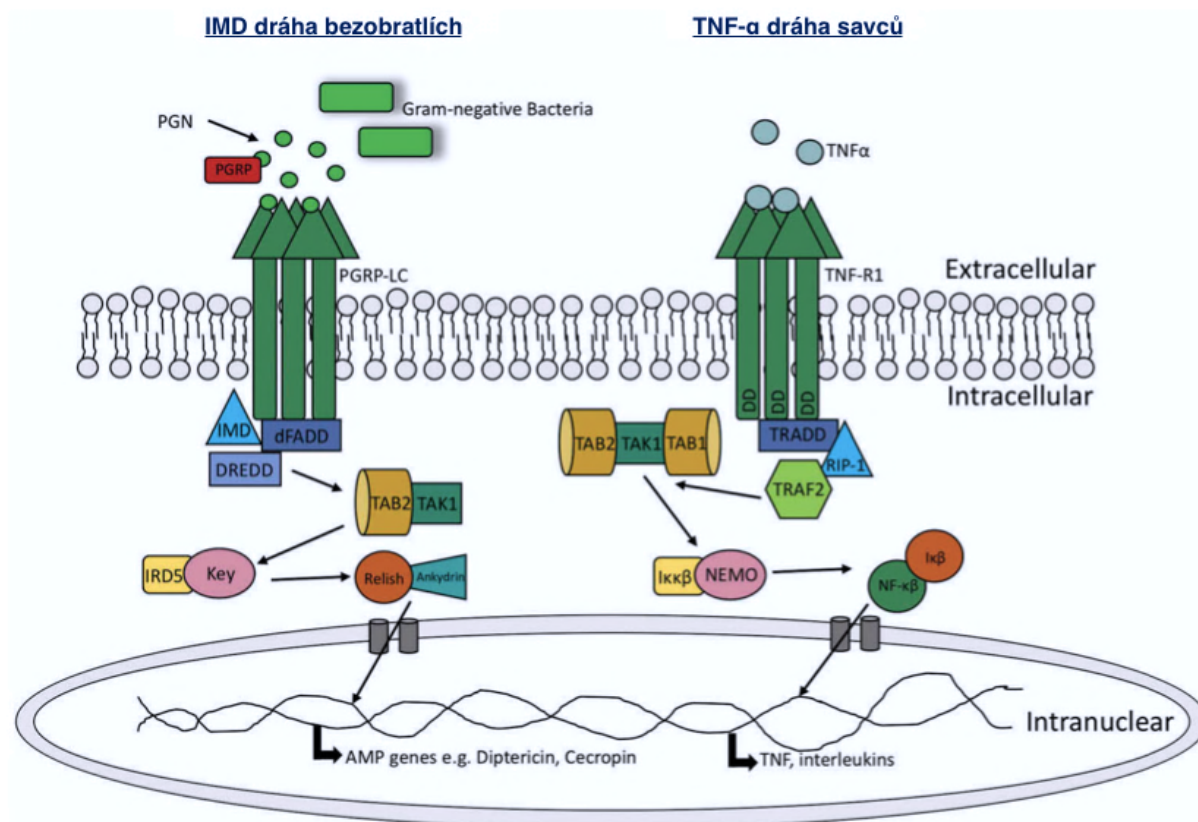
3.1.5.2 Úloha IMD signalizační dráhy

Kromě buněčné signalizace prostřednictvím *Toll* receptorů může hmyz, tedy i *G. mellonella*, využít i IMD signální kaskádu, která stejně jako *Toll* - signální dráhy vede k produkci antimikrobiálních peptidů (AMP, antimicrobial peptides).

IMD je dráha je pojmenována po genetické analýze mutantní varianty hmyzu *Drosophila melanogaster*, u které docházelo k závažné imunodeficienci (asociovaný lokus byl označen „immunodeficiency“, tedy *imd*). Jedná se o dráhu, která u hmyzu hraje klíčovou roli při obraně proti bakteriím (Kleino *et Silverman*, 2014). Tato dráha má schopnost identifikovat peptidoglykan, což je jedna ze složek bakteriální buněčné stěny. Dochází pak opět k aktivaci kaskády dějů, na jejímž konci dochází k produkci AMP.

AMP jsou všudypřítomné humorální působky, které lze nalézt v různých koncentracích v hemocytech, tukové tkáni, slinných žlázách i trávicím traktu hmyzu. Působením AMP dochází k lýze bakteriálních buněk což je způsobeno různými mechanismy (podrobněji v následující podkapitole).

Jak zmiňovaná *Toll*, tak i IMD signalizační dráha vykazuje určité podobnosti se signální dráhou pro lidský IL-1 (interleukin 1) a TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa, tumor necrosis factor α). Obě tyto dráhy (Obr.7) totiž nakonec vedou k produkci homologních transkripčních faktorů (Ménard *et al.* 2021, Sheehan *et al.* 2018).



Obr.7: Srovnání IMD dráhy u hmyzu TNF- α dráhy u savců: Dráha IMD je aktivována vazbou peptidoglykanu (PGN, peptidoglycan) na proteiny rozpoznávající peptidoglykan (PGRP, peptidoglycan-recognition protein), což vede ke kaskádě dějů, na jejímž konci je produkce antimikrobních peptidů (AMP). U savců dochází k analogickému procesu – TNF- α je vázán receptorem TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1), což opět vede ke kaskádě dějů a na konci této kaskády jsou produkovány prozánětlivé cytokiny.

Legenda: extracellular – extracelulární část buňky, intracellular – intracelulární část buňky, intranuclear – jaderná část buňky, Gram-negative bacteria – gramnegativní bakterie

Převzato z Sheehan *et al.* 2018 a upraveno

3.1.5.3 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou okrajově zmíněny již v předešlé podkapitole. Jedná se o skupinu nízkomolekulárních proteinů s širokým spektrem vlastností. Nalézají se v rostlinách, u bezobratlých živočichů i obratlovců. Mají imunomodulační účinky, uplatňují se i v boji s bakteriálními, virovými a fungálními infekcemi. AMP jsou v rámci imunomodulace poměrně efektivními molekulami, a to díky tomu, že mikroorganismy nejsou schopné vyvinout si vůči většině těchto peptidů rezistenci (Boparai *et al.* Sharma 2020).

V případě savců jsou AMP produkovány na sliznici v místě, kde došlo v danou chvíli k infekci – může se jednat například o sliznici dutiny ústní, nosní, gastrointestinálního nebo třeba reprodukčního traktu. U hmyzu jsou AMP syntetizovány hlavně v oblasti tukové tkáně, v malém množství pak i v hemocytech nebo v oblasti trávicí trubice (Bals 2000).

Ať už se jedná o AMP u hmyzu nebo savců, mechanismus jejich účinku se zdá být totožný. AMP se účastní eliminace patogenů dvojitým způsobem. První spočívá ve vazbě na buněčnou membránu cílového patogenu, a následném narušení integrity buněčné membrány, čímž je vyvolána lýza patogenu. Další možností je to, že se intracelulárně naváže na DNA, nebo RNA a ovlivní tak syntézu intracelulárních proteinů, což následně vede k alteraci buněčné integrity, která ve finále vede k buněčné smrti (Matóti *et al.* 2011, Yang *et al.* 2000).

AMP jsou rozmanitou skupinou molekul, spousta z nich je charakteristická pouze pro určitý živočišný či rostlinný druh. Na druhou stranu ale nacházíme i takové zástupce, které jsou společné napříč různými organismy.

Za zmínku stojí lysozomy. Jsou to enzymy, které jsou společné pro člověka i larvu *G. mellonella* a zároveň jsou to první AMP, které byly u této larvy podrobněji popsány. Jedná se o skupinu enzymů, které mají významnou roli při imunitní obraně organismu proti grampozitivním bakteriím. Lysozomy mají totiž schopnost hydrolyzovat peptidoglykan v buněčné stěně. U larev má lysozym navíc, kromě protibakteriální obrany, ještě jednu důležitou funkci. Bylo prokázáno, že s poklesem hladin lysozymu roste nárůst enterobakterií. Lze tedy vyvozovat, že lysozym se podílí na regulaci mikrobioty larvy (podrobněji v kapitole 3.1.6.) (Ménárd *et al.* 2021, Sheehan *et al.* 2018).

3.1.5.4 Krev a hemolymfa – koagulace

Koagulace je proces, kdy dochází ke vzniku sraženiny. Může se jednat o proces vyvolaný v důsledku určitého poranění a je důležitou složkou vrozeného imunitního systému. Sraženina vzniká v hemolymfě hmyzu i krvi savců a děje se to proto, aby zamezila invazi patogenu do organismu. Podstatným rozdílem je ale to, že savci, potažmo všichni obratlovci mají uzavřenou cévní soustavu a v důsledku vzniku sraženiny tak může docházet i k nežádoucím projevům jako je ischemie, která může vyústit až v usmrcení organismu. Hmyz má naopak otevřenou cévní soustavu, což zajišťuje její dynamičtější vlastnosti. Díky otevřené cévní soustavě dochází k rychlejšímu uzavření rány, tedy i rychlejšímu zamezení ztráty tekutin a nehrozí případná ischemie. Nevýhodou však může být to, že se patogen snáze dostane do dalších částí organismu (Dushay 2009).

Mezi hmyzími i savčími koagulačními kaskádami lze nalézt určité podobnosti, a to v rodině transglutamináz, které mají podíl na zatuhnutí sraženiny. Transglutaminázy hmyzu vykazují homologii s lidským koagulačním faktorem *XIIIa*. Právě faktor *XIIIa* se podílí na konečném vytvoření sraženiny. Dále byla nalezena analogie mezi hemolektinem u hmyzu a von Willebrandovým faktorem (vWF). Hemolektin hmyzu tvoří strukturu – vlákna – sraženiny (Sheehan *et al.* 2018). vWF je glykoprotein, který se u lidí podílí na hemostáze tím, že zprostředkovává agregaci trombocytů a jejich následnou adhezi ke kolagenu (Kitnar *et al.* 2011).

3.1.5.5 Melanin

Melanin je tmavě pigmentovaný polymer odvozený od fenolické sloučeniny tyrosinu. Nalézá se u rostlin, hmyzu i obratlovců. U savců hraje roli hlavně jako pigment zbarvující kůži, oči či vlasy a funguje jako ochrana před UV zářením (Riley 1997).

U hmyzu pak zastupuje odlišnou roli – funguje v rámci vrozeného imunitního systému při sklerotizaci exoskeletu nebo při hojení ran. Proces melanizace se skládá z kaskády dějů, kterou spouští s patogenem asociované molekuly (PAMPS, pathogen associated molecular patterns). Celý sled dějů vede až ke vzniku cytotoxických produktů. V důsledku toho nastává vytvoření jakéhosi pouzdra v místě poranění a následnému zapouzdření patogenu, čímž dojde k zamezení šíření infekce (Cerenius *et al.* 2008, Singkum 2019).

Proces melanizace u larvy *G. mellonella* je patrný i makroskopicky, kdy dochází k tmavému zbarvení kutikuly. Tento jev je pak patrný v experimentální části této práce, konkrétně v kapitole 4.6.3 (Obr. 22).

3.1.6 Mikrobiota larvy *Galleria mellonella*

V rámci experimentální části této práce jsme na počátku pracovali s larvou *G. mellonella* s předpokladem, že její hemolymfa je sterilní a počítali jsme pouze s tím, že hojně osídlená mikrobiotou je hlavně trávicí trubice. Ovšem během jednoho z experimentů bylo zjištěno, že osídlení mikrobiotou se týká prakticky celé larvy, včetně hemolymfy.

V současné době se pro vědecké účely nejčastěji využívají larvy ze dvou různých zdrojů. Jedním ze zdrojů jsou larvy odchované v laboratorních podmínkách, které jsou odchovány na nutriční bez suplementace hormonů nebo antibiotik. Alternativou jsou pak krmné larvy, které se využívají jako návnady pro lov ryb a krmivo pro domácí zvířata. Právě u krmných larev není jistota, zda a jaké hormony a případně i antibiotika jim byly spolu s potravou podány (Allonius *et al.* 2019). Podle doposud provedených studií všechny výsledky nasvědčují tomu, že larvy, které jsou chovány za laboratorních podmínek poskytují mnohem kvalitnější a snáze statisticky reprodukovatelné výsledky (Champion *et al.* 2016).

Ve studii zabývající se přímo mikrobiotou larvy, a těchto studií zatím není mnoho, její autoři uvádějí, že larvě dominuje bakterie rodu *Enterococcus*. Byly zkoumány vzorky pocházející z kutikuly, trusu, tukové tkáně a hemolymfy larvy. Výzkumu byly podrobeny jak larvy pocházející z laboratorního odchovu, tak larvy krmné. Výsledným zjištěním bylo, že veškeré testované tkáně obsahují mikrobiální zátěž v různé míře (Johnston *et Rolff* 2015).

Nejmenší mikrobiální zátěž byla nalezena v hemolymfě, ale ani tu nelze považovat za sterilní. Tuto skutečnost lze vysvětlit jako důsledek „clearance“ imunitními buňkami, které jsou v hemolymfě zastoupeny v poměrně vysokém počtu (Ratcliffe *et Walters* 1983).

Zajímavé bylo také zjištění, že trávicí trakt krmných larev obsahuje přibližně 5,3krát nižší množství zastoupení bakterií než larvy pocházející z laboratorního chovu. Tento jev je způsoben s největší pravděpodobností podáním antibiotik v potravě a není

žádoucí. Předešlé studie na modelu *Drosophila melanogaster* totiž ukázaly, že při narušení přirozené rovnováhy mikrobiomu dochází k větší náchylnosti k infekcím, což může značně zkreslovat výsledky studií, které jsou na tomto modelovém organismu prováděny (Allonius *et al.* 2019).

Jak již bylo zmíněno výše, u *G. mellonella* jsou nejhojněji zastoupenými bakterie taxonu *Enterococcus*. Nalezeny, ale byly i další bakteriální (s největší pravděpodobností komenzální) agens, například z taxonu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* a *Peptoniphilus*. Kromě těchto bakterií byly v larvách nalezeny také potenciálně patogenní bakterie rodu *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* a *Streptococcus* (Allonius *et al.* 2019).

3.2 Mikrobiální biofilmy

3.2.1 Základní informace o mikrobiálních biofilmech

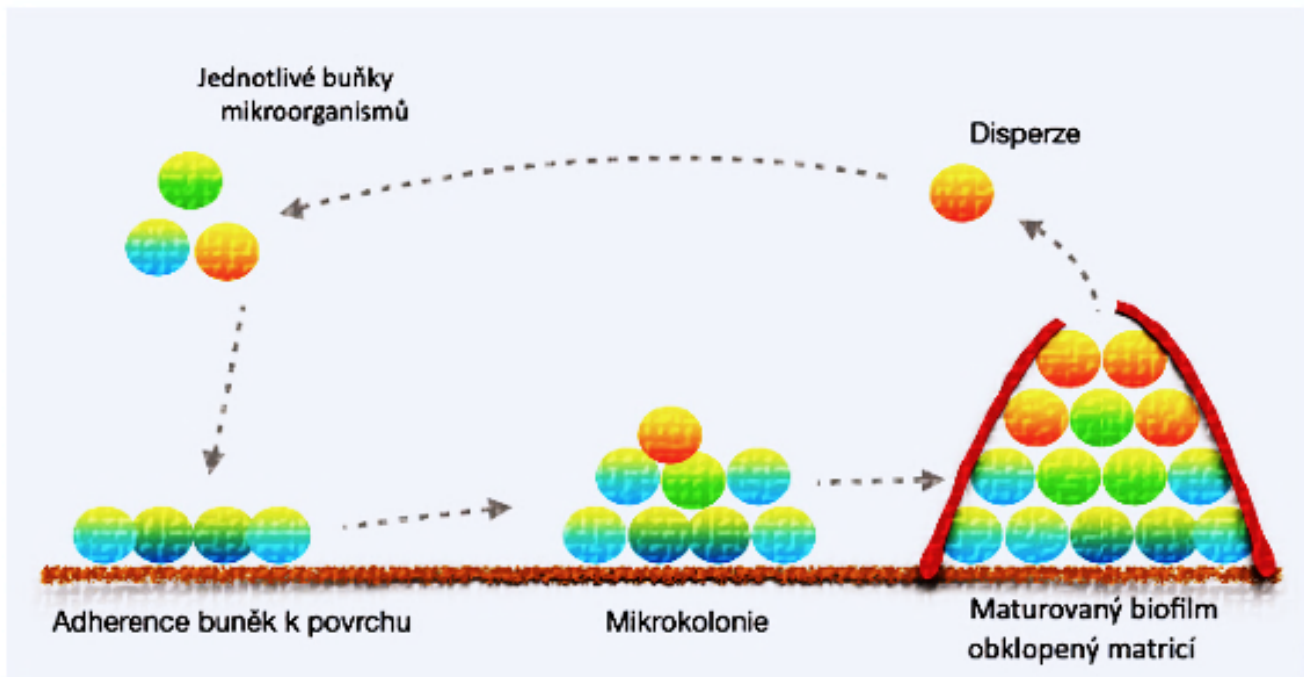
Mikrobiální biofilmy jsou tvořeny společenstvím heterogenních mikrobiálních buněk, která jsou uspořádána do trojrozměrné vrstvené struktury. Mikrobiální buňky mohou být původu bakteriálního i mykotického. K povrchu, který může být jak živý, tak neživý, jsou pak pevně přisedlé díky adhezivním molekulám. Významnou roli následně hraje ale takzvaná extracelulární polymerní substance (EPS), kterou si sami tvoří. EPS společenství mikroorganismů obklopuje a poskytuje tak prostředí, které skýtá řadu výhod, jako je ochrana před predátory nebo i před reakcemi imunitního systému, pokud se jedná o biofilmy uvnitř organismu. Biofilmová společenství v případě patogenních agens hrají klíčovou roli v otázce rezistence vůči konvenční antiinfektivní léčbě. Jsou často spojeny s nozokomiálními infekcemi, které jsou rezistentní vůči antiinfekční léčbě. Právě to je jeden z hlavních důvodů, proč jsou biofilmová společenství v současné době předmětem zájmu mnoha výzkumů (Konečná *et al.* 2021, Rather *et al.* 2021).

3.2.2 Formování mikrobiálních biofilmů – jednotlivé vývojové fáze

Za základní jednotku biofilmu lze považovat mikrokolonie, které jsou tvořeny menšími shluky jednotlivých mikrobiálních buněk. Na tvorbě celého společenství biofilmu se podílí více faktorů, ale v současné době ještě nejsou řádně objasněny. Je ovšem známo, že složky extracelulární matrice propojují jednotlivé buňky a celému buněčnému společenství biofilmu tak umožňují vzájemnou kooperaci (Tolker-Nielsen 2015).

V současné době probíhají diskuse ohledně toho, zda by se biofilm měl považovat za soubor jednotlivých buněk, nebo spíše za vícebuněčné individuum (organismus), kde jednotlivé mikrokolonie představují část celého organismu. V minulosti se vědecká společnost přikláněla spíše k tomu, že se jedná o shluky samostatných buněk, v současné době se ale naopak stále více přiklání k tomu, že se jedná spíše o komplexnější „organismus“. K tomuto přesvědčení přispívá poznání životního cyklu biofilmu (Obr. 8), který jeví určité atributy vícebuněčného organismu.

Formování biofilmu je zahájeno adhezí jednotlivých buněk k povrchu pomocí adhezivních molekul, které buňky exprimují na svém povrchu, následuje shlukování mikrokolonií, které přecházejí v maturovaný biofilm propojený a obklopený EPS (Rather *et al.* 2021).



Obr.8: Schéma vzniku mikrobiálního biofilmu, kdy na začátku jsou jednotlivé samostatné buňky mikroorganismů, které následně adherují k povrchu a formují mikrokolonie. Konečnou vývojovou fází biofilmu je pak maturovaný biofilm, ve kterém jsou mikrobiální buňky obklopeny extracelulární polymerní substancí.

Jak je patrné ze schématu (Obr. 8) tvorba biofilmu probíhá v několika krocích a jedná se o vícestupňový komplexnější proces. Na počátku jsou mikroorganismy ve volné formě, tato forma je někdy nazývána planktonická. Následně planktonická forma mikroorganismů přechází do formy přisedlé. Na tento krok mají vliv okolní podmínky – zásadní roli rovněž hraje povrch, na kterém se má proces odehrávat. Podstatné jsou ale i další okolní vlivy, jako je například pH prostředí, hydrodynamické síly nebo třeba teplota. Na počátku je přilnutí prvních mikroorganismů k povrchu reverzibilní, právě proto je někdy toto stádium nazýváno jako stádium reverzibilního připojení. Bylo prokázáno, že v této fázi se u bakterií začíná uplatňovat bis-(3'-5')-cyklický dimerní guanosinmonofosfát (c-di-GMP, Bis-(3'- 5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate),

což je intracelulární signální molekula, která snižuje pohyblivost buněk a zvyšuje produkci složek matrice (Valentini *et* Filloux 2016).

Postupně dochází k silnější adhezi buněk a proces se již stává nevratným. S rostoucím množstvím přisedlých buněk roste i produkce c-di-GMP. Vznikající společenství je v tuto chvíli již významně odolnější vůči vnějším fyzikálním vlivům. Po úspěšné adhezi, kdy dojde k ireverzibilnímu přisednutí na povrch, dochází k množení mikroorganismů a dalšímu růstu společenství. Celý děj se odehrává v prostředí matrice, jejíž složky mikroorganismy sami produkují. Tyto kroky vedou ke zformování malých agregátů, které nazýváme mikrokolonie (Armbruster *et* Parsek 2018). K agregaci i komunikaci mezi jednotlivými buňkami v rámci nově vzniklé mikrokolonie přispívají bičíky a pili jednotlivých bakteriálních buněk (Jamal *et al.* 2015).

Jednotlivé buňky mikroorganismů se v rámci mikrokolonie množí a postupně vzniká maturovaný biofilm. Maturovaný biofilm pak získává plastickou 3D strukturu. Mikroorganismy jsou uspořádány jednak podle aerotolerance a jednak podle rychlosti metabolismu. Vnitřní vrstva má regulační schopnosti, střední vrstva je tzv. základní vrstva a vnější vrstva je tvořena buňkami, které mají schopnost opustit biofilm a přeměnit se do planktonické fáze (Rather *et al.* 2021).

U vyzrálého biofilmu po čase dochází k disagregaci celého společenství a uvolňování buněk do okolního prostředí. Tímto je zahájen nový proces tvorby biofilmu. Mezi faktory zodpovědné za rozptýlení biofilmu do okolí patří jednak to, že populace v určitou chvíli přeroste, v daném místě vzniká větší konkurence a zároveň ubývá dostupných živin (Rabin *et al.* 2015).

3.2.3 Skladba a architektura biofilmu

Biofilm přisedlý k určitému povrchu je tvořen jednotlivými mikrobiálními buňkami a dalšími extracelulárními složkami (Tabulka 1). Tyto extracelulární složky dávají základ tzv. matici neboli extracelulární polymerní substanci (EPS, extracellular polymeric substance). Obecně lze říci, že hlavní složkou EPS jsou polysacharidy, ty ale mohou být odlišné dle toho, jaký mikroorganismus dané společenství vytváří. Od toho se pak odvíjejí fyzikální i chemické vlastnosti biofilmu. Například EPS gramnegativních bakterií je obvykle neutrální nebo polyaniontová. Aniontové vlastnosti jsou zapříčiněny výskytem uronových kyselin (např. D-glukuronová, D-galakturonová).

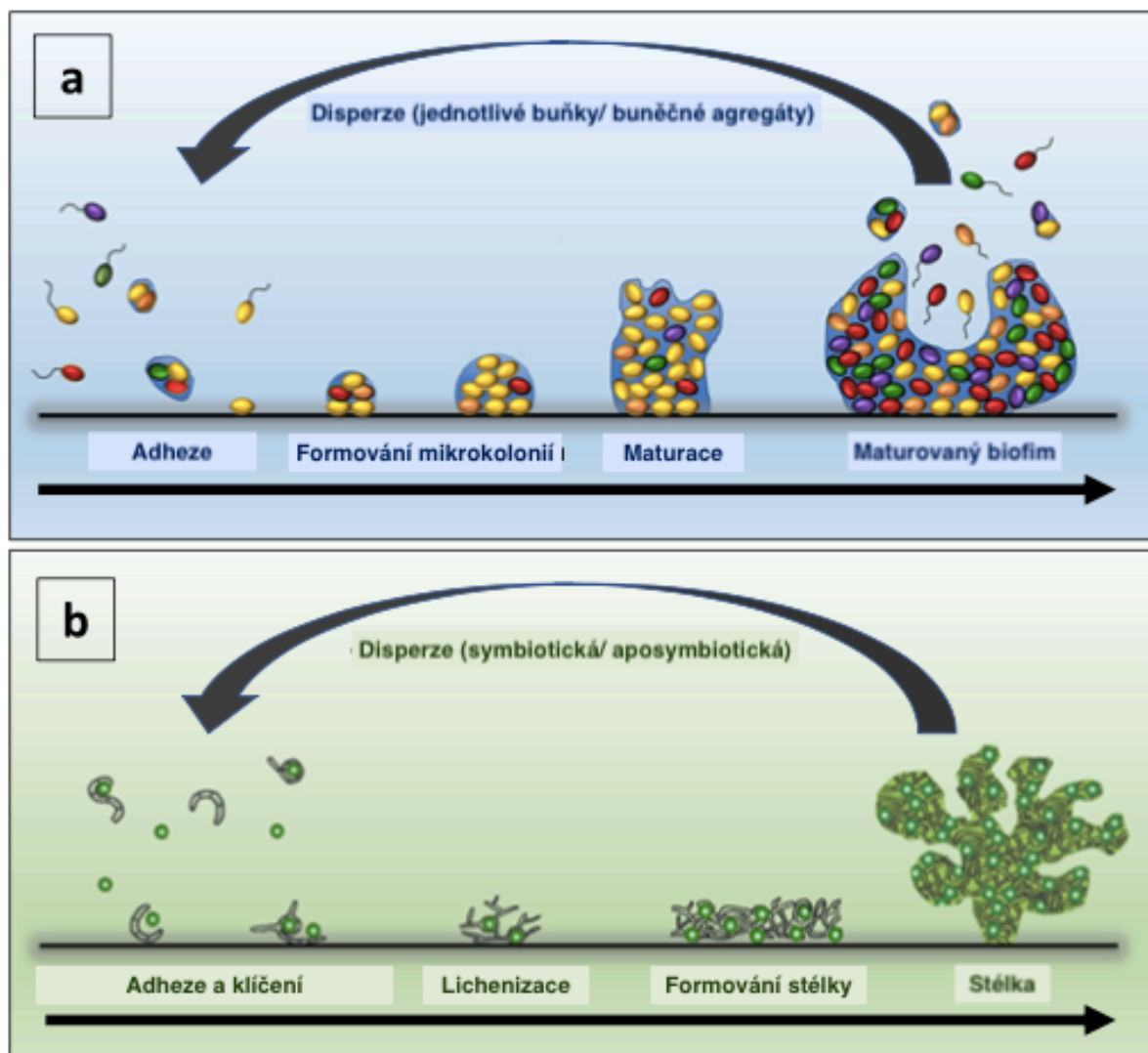
Na základě této povahy EPS pak může docházet k vazbě dvojmocných kationtů, kam se řadí vápník a hořčík. V případě hořčíku se ukázalo, že hraje podstatnou roli, kdy umožňuje zesíťování polymerních vláken a tím zvyšuje vazebnou sílu biofilmu. U gram pozitivních bakterií naopak bylo zjištěno naprosto odlišné složení EPS, které je primárně kationické (Donlan 2002, Hussain *et al.* 1993).

Obecně lze konstatovat, že zásadní vliv na formování a architekturu biofilmu mají polysacharidy. Právě složení polysacharidů, které tvoří EPS, určuje konformaci celého biofilmového společenství. Některé polysacharidy (hexózy s vazbou 1,3 nebo 1,4) udělují vlastnosti, které se projeví vyšší pevností a sníženou rozpustností ve vodném prostředí. Pokud jsou takové polysacharidy v biofilmu obsaženy, celé společenství se logicky stává odolnější vůči chemickým a fyzikálním vlivům okolního prostředí (Sutherland 2001).

Biofilmy mohou být monodruhové i multidruhové, heterogenní společenství mikrobiálních buněk. Architektura biofilmu se může značně lišit podle druhu mikroorganismů. Různé mikroorganismy vytváří jednotlivé mikrokolonie, které jsou pro daný druh charakteristické. Architektura celého biofilmu tedy závisí na tom, z jakých mikrokolonií se skládá. Jednotlivé buňky mohou být různě prostorově uspořádané od poměrně plochých vrstev a stejně tak mohou vytvářet věžovité struktury tvořené vícero vrstvami buněk (Parsek *et Greenberg* 2005, Tolker-Nielsen 2015). Jednotlivé vrstvy jsou propojeny díky EPS a jsou protkány systémem vodních kanálů, což jsou v podstatě intersticiální dutinky uvnitř EPS. Vodní kanály zajišťují proudění a difuzi živin, kyslíku, ale rovněž umožňují komunikaci mikrobiálních agens tvořících biofilm. Skutečnost že, mikroorganismy v biofilmech vykazující vzájemnou komunikaci poukazuje na to, že biofilmy se chovají v podstatě jako primitivní vícebuněčné organismy (Evans 2000, Jamal *et al.* 2015). Dalším faktem, díky kterému lze o biofilmech uvažovat jako určité formě vícebuněčného organismu je i blízká podobnost vývoje, respektive spíše životního cyklu, s lišejníky (Obr. 9) (Penesyán *et al.* 2021).

Tabulka 1: Procentuální zastoupení jednotlivých složek biofilmové matrice

Jednotlivé složky	Procentuální zastoupení v biofilmu
DNA/ RNA	<1-2 %
Proteiny (včetně enzymů)	<1-2 %
Polysacharidy	1-2 %
Mikrobiální buňky	2-5 %
Voda	až 97 %



Obr.9: Srovnání vývojového cyklu mikrobiálního biofilmového společenství (a) a životního cyklu lišejníku (b).

Převzato z Penesyan *et al.* 2021 a upraveno

3.2.4 Quorum sensing

V rámci biofilmového společenství je důležité, aby mezi sebou mohly mikroorganismy komunikovat. Proces této mezibuněčné komunikace probíhá na chemické úrovni a nazývá se *quorum sensing* (QS). Jedná se o proces, který umožňuje bakteriím sdílet informaci o buněčné hustotě a podle toho upravovat, regulovat genovou expresi. Bakterie snímající kvorum produkují a uvolňují molekuly chemického signálu zvané autoinduktory. Celý proces je poměrně složitým komunikačním systémem. Ovlivňuje biofilmové společenství v různých etapách vývoje. (Miller *et* Basler 2001).

Proces komunikace funguje tak, že určitý mikroorganismus, který je součástí biofilmu, uvolní autoinduktorové molekuly. Následně dojde k navázání těchto autoinduktorů v místě určení na příslušné receptory. Po obsazení receptorů následně dochází ke změně genové exprese cílových buněk (Mukherjee *et* Bassler 2019).

QS řídí geny, které mají vliv na mnoho činností, synchronně řídí celé biofilmové uskupení, v podstatě dochází ke kooperativnímu chování celého společenství. Mezi procesy řízené QS patří například bioluminiscence, sporulace, kompetence, produkce antibiotik, tvorba biofilmu nebo sekrece faktorů virulence (Rutherford *et* Bassler 2014)

Celý proces QS závisí na densitě buněk, jež jsou součástí formujícího se biofilmu. S rostoucí densitou buněk v biofilmu roste množství uvolňovaných signalizačních molekul. Po určité době je dosaženo prahové hodnoty – *kvora*. Právě dosažení tohoto bodu umožňuje QS podílet se na regulaci biofilmu včetně disperze. Krok disperze je nezbytný, aby bylo dovoleno mikroorganismům opustit společenství biofilmu a kolonizovat nové oblasti (Solano *et al.* 2014).

Existují různé strategie k dosažení disperze biofilmu, může se jednat například o ukončení syntézy sloučenin matrice biofilmu, degradace matrice a také přerušení nekovalentních interakcí mezi složkami matrice (Otto 2013). Regulační sítě QS jsou složité, mohou zahrnovat několik genů, které ovlivňují vývoj biofilmu v různých fázích. Zatím tedy není úplně snadné pochopit, jak aktivace QS nakonec spouští disperzi biofilmu (Solano *et al.* 2014).

Ve chvíli, kdy se jedná o patogenní mikroorganismy jsou procesy jako produkce faktorů virulence, sporulace nebo disperze filmu poměrně znepokojivým faktem. Předmětem zkoumání je tedy v tuto chvíli nalezení takových inhibitorů QS, které

dokážou nejen zničit tvorbu biofilmu rezistentního na antibiotika, ale také inhibovat obnovu patogenů (Li a Zhao 2020).

3.2.5 Biofilmy v rámci klinické praxe

S biofilmem se v rámci lidského organismu setkáváme poměrně běžně, nečastější a asi i nejdéle známá forma biofilmu v našem těle je zubní plak, jehož tvorba je v podstatě fyziologická. I přesto, že se jedná o jev fyziologický, je důležité biofilm ze zubní skloviny odstraňovat, jinak může dojít například k rozvoji periodontitidy. Při periodontitidě se v oblasti pod dásní vytvoří jakási kapsa s nahromaděným biofilmovým povlakem a dochází k rozvoji zánětu (Schindler 2014).

Tvorba biofilmu nicméně stojí také za řadou patologických stavů. Ke vzniku biofilmu na sliznicích dýchacích cest například dochází často u pacientů trpících cystickou fibrózou. Toto onemocnění vzniká na genetickém podkladě, kdy postupně dochází v důsledku opakovaných infekcí k poškození tkání dýchacích cest. Na tkáních poškozených zánětem se pak usadí bakterie, které se začnou formovat biofilmové společenství. Charakteristickým zástupcem, který se na tom podílí je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Srdeční zánět, bakteriální endokarditida, je dalším z řady onemocnění, jež je asociováno se vznikem biofilmu. Jedná se o proces, kdy na srdečních chlopních dojde ke vzniku biofilmu, který následně vyvolává zánětlivé procesy. Nejčastějšími původci jsou v tomto případě různé streptokoky nebo stafylokoky. Proti proudu moči mohou bakterie pronikat do prostaty, kde se pak podílejí na zánětlivém onemocnění prostaty. V tomto případě pak vznik biofilmu v oblasti prostaty vede k rozvoji chronického zánětu. Za rozvojem chronického zánětu středouší také mohou stát biofilmy, stejně tak za chronickou sinusitidou. Výjimkou není ani rozvoj biofilmu v otevřených ránách jako jsou například bércové vředy a popáleniny. V těchto případech, k rozvoji biofilmu dochází i kvůli tomu, že pokožka je méně prokrvena, a tedy i méně vyživována (Parsek *et* Singh 2003).

Zavádění různých zdravotnických pomůcek (jako jsou například katetry) do organismu je v současné době nedílnou součástí medicíny. Ovšem je zde riziko, že spolu s pomůckou dojde i k zanesení mikrobiálního agens do organismu. Například s katetrizací se pojí tzv. biofilmové infekce asociované s katetry (catheter-associated biofilm infection). Původci infekcí se do organismu mohou dostat cestou močového či žilního katétru, spolu se stentem, drénem, nebo třeba s kloubní náhradou případně i

nitroděložním tělískem. Při špatném zacházení může dojít k usazení bakterií i na kontaktních čočkách (Pozo 2017).

Infekce založené na vzniku biofilmu je obtížné vymýtiti kvůli jejich schopnosti odolávat i vysokým koncentracím antibiotik, které by za normálních okolností zabily volně plující planktonické buňky. V důsledku toho bakteriální biofilmy významně přispívají k morbiditě a úmrtnosti pacientů. Právě z toho důvodu, jsou biofilmová společenství předmětem zájmu mnoha výzkumů (Hall *et al.* 2017). V rámci výzkumu se stále řeší například to, zda je biofilm příčinou onemocnění, nebo spíše důsledek toho, že bakterie pouze využívají příznivého prostředí, které kolonizují (Vestby *et al.* 2020).

3.2.6 Charakteristika infekčních onemocnění spojených s tvorbou biofilmu

Mikroorganismy, jež jsou součástí biofilmových společenství vykazují jiné vlastnosti, než pokud jsou v planktonické formě. Zásadním problémem v klinické praxi je u infekcí asociovaných s tvorbou biofilmu výrazně zvýšená tolerance biofilm-formujících mikroorganismů vůči antimikrobním látkám. Minimální inhibiční koncentrace (MIC, minimum inhibitory concentration) a minimální baktericidní koncentrace (MBC, minimum bactericidal concentration) antibiotik může být 100 až 1000krát vyšší v případě biofilm-formujících mikroorganismů ve srovnání s jejich planktonickou formou. Některé zdroje pak dokonce uvádí, že rezistence může být vyšší až 10 000krát (Rabin *et al.* 2015). Příčinou tak vysoké rezistence biofilm-formujících mikroorganismů vůči antimikrobní léčbě je kombinace více faktorů. Mikroorganismy, jež jsou součástí biofilmu, využívají mechanismy své antimikrobní rezistence, které mají shodné s planktonickými buňkami. K tomu se ale přidávají mechanismy, které získávají tím, že jsou součástí biofilmu (Høiby *et al.* 2011).

V rámci uskupení mikroorganismů do jednoho většího celku k antibiotické rezistenci přispívá například matrice, která poskytuje mikroorganismům určitou formu ochrany. Jedná se v podstatě o bariéru, které znesnadňuje průnik antimikrobních látek do místa působení. Samotná matrice nemusí úplně inhibovat průnik antimikrobního léčiva, ale může jej zpomalit. Díky tomuto zpomalení pak mají buňky patogenních mikroorganismů dostatečný čas na expresi genů způsobující rezistenci. V matrici se vyskytují také různě nabitě polymery a enzymy, na které se mohou antimikrobní látky vyvazovat, či mohou být enzymaticky zasaženy a tímto může tak docházet k jejich

deaktivaci. Populace mikroorganismů v biofilmech také vykazují rozdíly v expresi povrchových molekul a různých faktorů virulence. U buněk obsažených v biofilmu byla oproti planktonickým buňkám mimo jiné zaznamenána vyšší exprese efluxních pump. Navíc, buněčná signalizace v rámci biofilmu umožňuje koordinovaně reagovat na podněty z okolního prostředí. Dalším významným faktorem přispívajícím k rezistenci biofilm-formujících mikroorganismů jsou buňky, které jsou ve stádiu dormance (metabolicky neaktivní). Jedná se o buňky mikroorganismů, jenž jsou umístěny v hlubších vrstvách biofilmu a jsou ochuzeny o přísun živin. Takové buňky neumírají, jen přecházejí do stacionární fáze a tato fáze vede k tomu, že nereagují na podněty z okolí a v daný okamžik jsou tedy i rezistentní vůči případné léčbě. Současné studie rovněž poukazují na to, že biofilm-formující mikroorganismy jsou rezistentní nejen vůči antimikrobní léčbě, ale i vůči fagocytóze (Hall-Stoodley *et al.* 2009, Rabin *et al.* 2015).

Pro výše popsané schopnosti buněk biofilmu odolávat léčbě antimikrobiálními látkami byl stanoven termín adaptivní rezistence. Jedná se v podstatě o to, co již bylo popsáno v předchozích odstavcích. Buňky v biofilmu oproti planktonické formě mají značnou výhodu v podobě různých adaptivních reakcí, které získávají tím, že jsou součástí biofilmu (Szomolay *et al.* 2005).

3.2.7 Pro nás významné mikroorganismy podílející se na formování biofilmů

V současné době lze konstatovat, že na formování biofilmových společenství je schopná se podílet valná většina mikroorganismů.

Jako nejčastější původce patologií vyvolaných biofilmy u člověka nalézáme bakterie rodu *Pseudomonas*, *stafylokoky*, *streptokoky*, dále pak *E. coli* a *aktinomyceety*. Z kvasinek pak v biofilmu lze nejčastěji nalézt kvasinku *Candida albicans*, které je v této práci věnována samostatná kapitola (Schindler 2014).

3.3 *Candida albicans*

3.3.1 Základní informace o kvasince *Candida albicans*

Candida albicans (*C. albicans*) je řazena k dimorfním houbám. Tato kvasinka je schopna tvořit jednak pseudohyfy (protáhlé buňky, nepravá vlákna), tak i pravé hyfy, které jsou tvořené více buňkami. Kvasinky se množí pučením a pro většinu kmenů *C. albicans* je charakteristická také germinace. Germinace je proces, kdy dochází ke vzniku tzv. zárodečných klíčků (klíčící hyfa), ze kterých následně mohou vzniknout pravé hyfy. Podstatnou vlastností je u *C. albicans* to, že v infikované tkáni se může vyskytovat jak ve formě kvasinkových buněk, tak i ve formě vláknité.

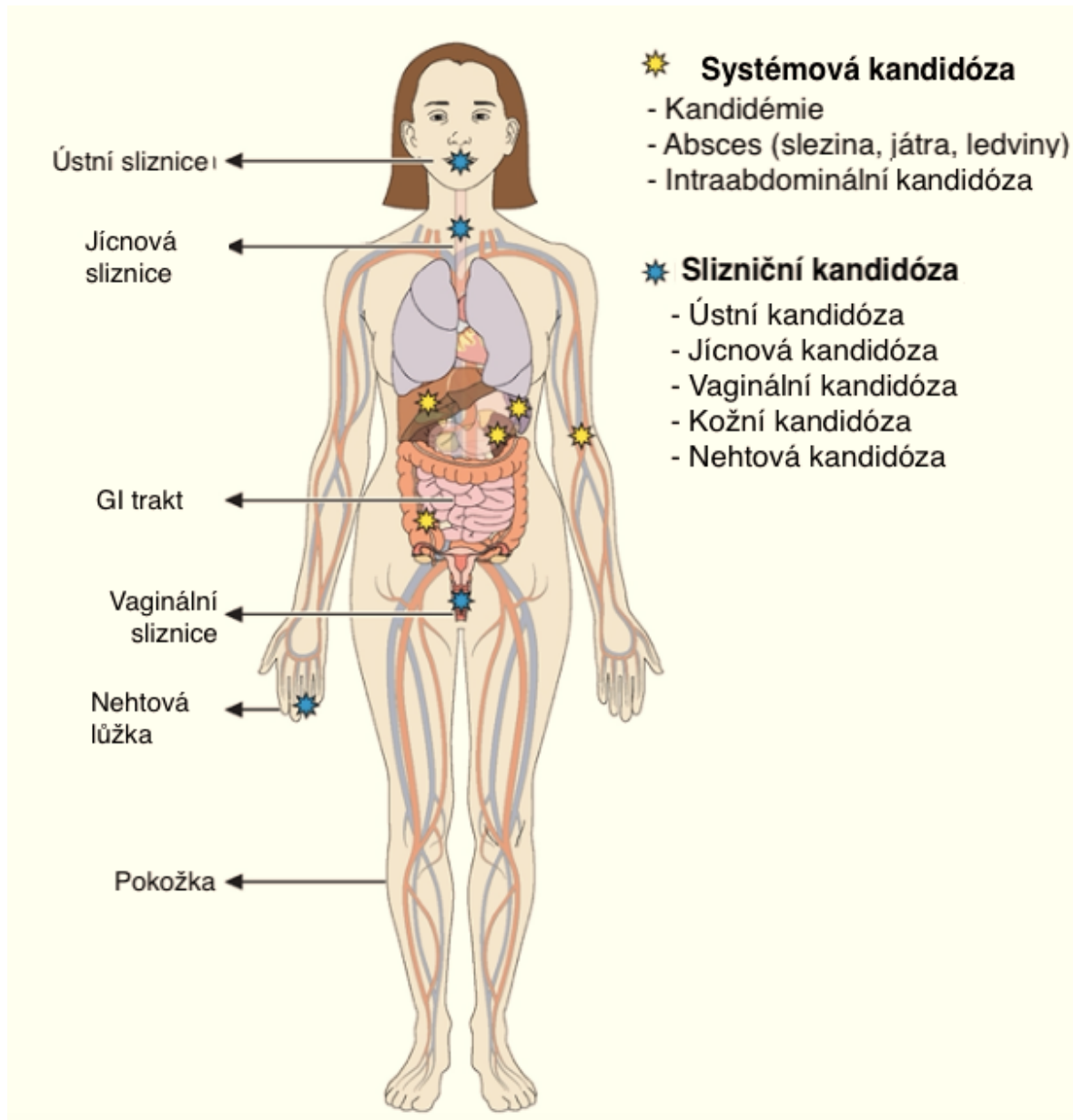
V rámci diagnostického barvení dle Grama se kvasinky *C. albicans* barví jako Gram-pozitivní bakterie. Jedná se o fakultativně anaerobní agens, nutričně relativně nenáročný mikroorganismus. Na Sabouradově glukózovém agaru jsou schopny růst při teplotách 20-37 °C. Pro určování jednotlivých druhů kvasinek v rámci rodu *Candida* se pak často využívá jejich metabolické diverzity v rámci utilizace různých cukrů, při tzv. asimilačních testech (Bednář *et al.* 1996).

3.3.2 *Candida albicans* jakožto původce infekčních onemocnění

Za normálních podmínek je kvasinka *C. albicans* pro lidský organismus neškodná. Jako komenzální organismus nejčastěji osidluje různé slizniční povrchy. Zcela běžně je součástí přirozené mikrobioty člověka. V určitých situacích, například, když z nějakého důvodu dojde k oslabení imunity může způsobit řadu infekcí – od povrchových, slizničních až po život ohrožující systémové infekce. Bylo zjištěno, že řada kandidových infekcí je spojena s tvorbou biofilmu (Wall *et al.* 2019). Systémová onemocnění vyvolaná kvasinkami rodu *Candida*, jsou považována za velmi problematické, jelikož vykazují vysokou mortalitu u hospitalizovaných pacientů. *C. albicans* je v současné době čtvrtou nejčastější příčinou nozokomiálních infekcí (Pereira *et al.* 2021, Tsui *et al.* 2016).

C. albicans disponuje širší škálou faktorů virulence a může stát za infekcemi v různých lidských nikách (Obr. 10). Mezi faktory virulence se řadí například exprese invazinů, či adhezinů na buněčném povrchu a také schopnost tvořit biofilmy. Navíc má tato kvasinka schopnost přizpůsobit se výkyvům pH, vykazuje metabolickou flexibilitu,

a má výkonné systémy pro vypořádání se stresovými faktory. Toto vše pak činí z kvasinky *C. albicans* potenciálně nebezpečného patogenu (Mayer *et al.* 2014).

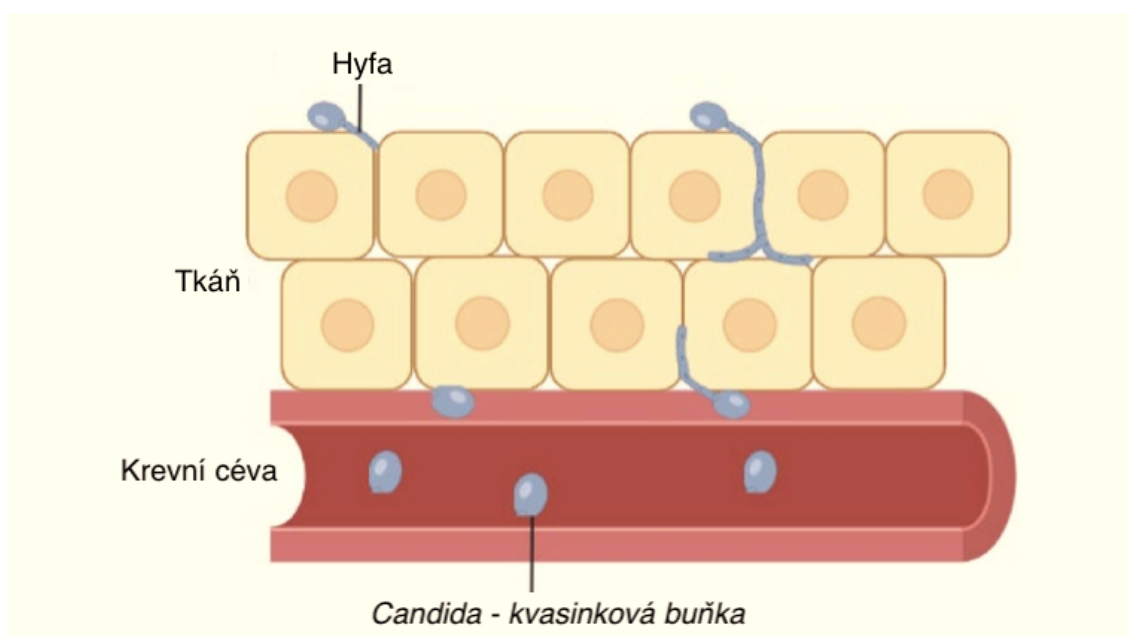


Obr. 10: Přehled oblastí lidského těla, kde může dojít ke klinickým projevům infekce vyvolané kvasinkou *C. albicans*.

Převzato z Lopes *et al.* 2022 a upraveno

3.3.2.1 Invazivní kandidové infekce

Invazivní kandidóza (IC, invasive candidiasis) je život ohrožující systémové onemocnění, které obvykle postihuje pacienty s oslabenou imunitou. K IC se běžně váží dva děje (Obr. 11). Jedná se o kvasinkovou infekci krevního řečiště s následnou diseminací v organismu, s následným prorůstáním do tkání. Oba tyto stavy mohou existovat i nezávisle na sobě, ale platí, že kvasinky rodu *Candida* přítomné v krevním řečišti jsou často zdrojem tkáňové kandidózy a naopak (Parslow *et Thornton* 2022).



Obr. 11: Dva procesy, které zahrnuje invazivní kandidóza. Jedná se o kvasinkové buňky přítomné v krevním řečišti a o buňky, které prorůstají do hlubších vrstev tkání.

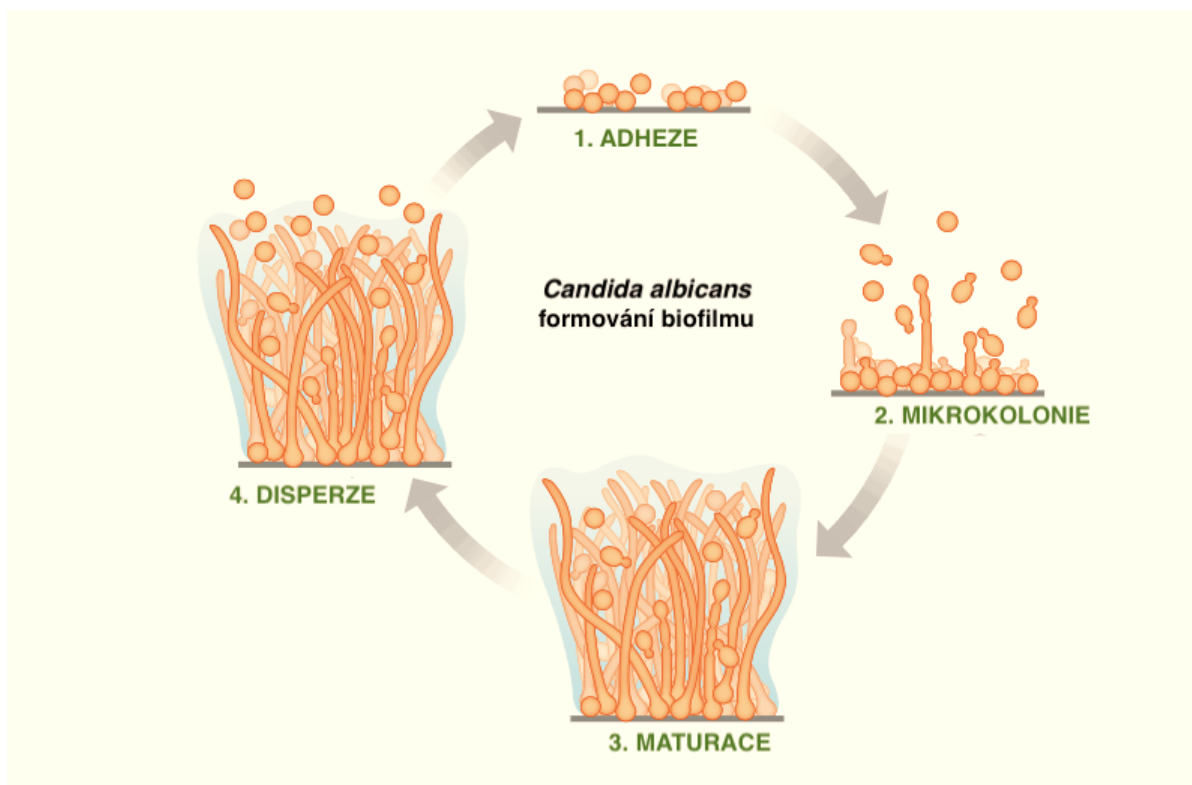
Převzato z Parslow *et Thornton* 2022 a upraveno

Obecně lze definovat tři základní faktory, které podmiňují vznik kvasinkových infekcí. Prvním takovým stavem je dlouhodobé užívání širokospektré antibiotické léčby, které umožní vyšší míru kolonizace kvasinkou *C. albicans*, než je fyziologické. Dalším faktorem je porušení gastrointestinální sliznice nebo kožní bariéry, což umožní kvasince invazi do okolních tkání. Posledním faktorem je již zmiňovaná imunoprese pacienta, která může mít nejrůznější příčiny, ale často je také iatrogenního původu. Tento stav může nastávat například i pacientů, jež dlouhodobě podstupují léčbu kortikoidy nebo u pacientů s neutropenií navozenou chemoterapií (Pappas *et al.* 2018).

3.3.2.2 *Candida albicans* a biofilmy

Kvasinka se řadí mezi mikroorganismy, mezi jejíž faktory virulence patří také schopnost tvorby biofilmu.

Proces, který je již podrobně popsán v kapitole Mikrobiální biofilm (kapitola 3.2) je v případě kvasinky, tedy i kvasinky *Candida albicans*, téměř identický (Obr. 12). Rozdíl, kterým se liší od bakteriálních buněk, lze spatřovat v tom, že kvasinka má navíc schopnost tvořit vláknité struktury – hyfy. Právě tyto hyfy začíná kvasinka tvořit již ve fázi adheze k povrchu, což přispívá k ještě větší odolnosti biofilmu. Ve fázi disperze, pak z biofilmu kromě kvasinkových buněk mohou odcházet i hyfy (Pereira *et al.* 2021). V rámci biofilmových společenství kvasinek tak lze nalézt kvasinky jak ve vláknité podobě, tak i v kvasinkové neboli blastosporické podobě.



Obr. 12: Schéma formování biofilmu kvasinkou *Candida albicans*.

Převzato z Nobile *et Johnson* 2015 a upraveno

3.4 Přístupy využití larvy *Galleria mellonella* jako modelového organismu pro formování biofilmu a indukci invazivní kandidózy

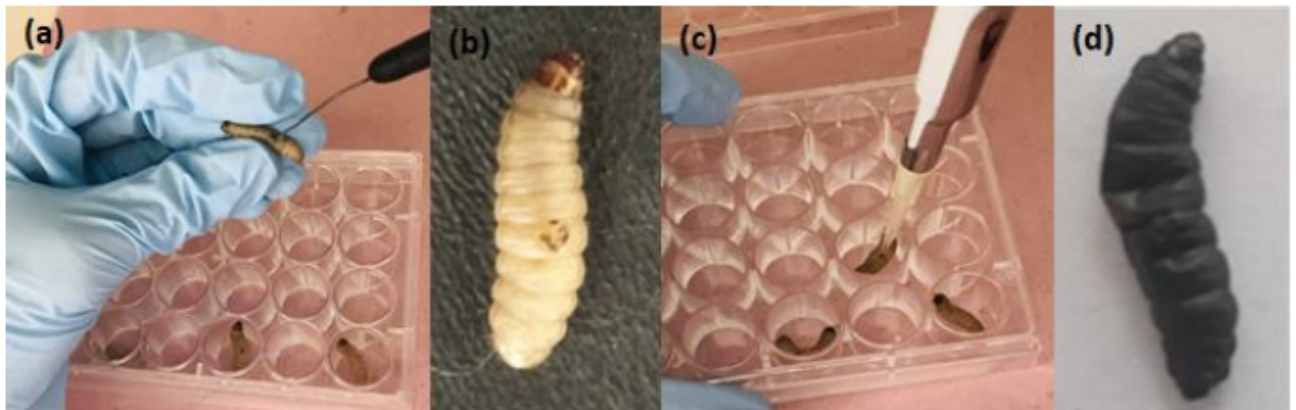
Jak je uvedeno v rámci experimentální části této práce, pro tvorbu tkáňových explantů, formování popáleninové rány (tzv. *burn-wound*) a následnou infekci rány kvasinkou *C. albicans*, byl využit modelový organismus, larvy *G. mellonella*. K dnešní době existují práce, které se zabývají jak využitím těchto larev pro indukci popáleninových ran s následnou infekcí, tak pro indukci invazivní kandidózy.

V rámci studie autorů Maslova *et al.* 2020 byl například využit model *G. mellonella* pro tvorbu popálenin s následnou infekcí rány bakteriálním agens, jmenovitě *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) a *Acinetobacter baumannii*. Infekce popálenin především původci nosokomiálních nákaz mohou mít pro pacienty fatální následky. Účelem této studie bylo využít bezobratlý model *G. mellonella* pro studium popáleninové rány namísto dosud využívaného myšího modelu.

Pro experiment byly voleny komerčně dostupné larvy, které byly před popálením ošetřeny 70 % ethanolem. Popáleninové zranění bylo provedeno zhruba ve střední oblasti dorsální části larvy. Provedeno bylo nahřátým ocelovým nástrojem a velikost rány odpovídala v průměru 2 mm. Bezprostředně po provedení zranění byla rána infikována bakteriální suspenzí. Po poranění a následné infekci rány byly larvy inkubovány při teplotě 37 °C a monitorovány po 72-120 hodinách. Průběžně byla zaznamenávána úmrtnost, byla monitorována melanizace larvy a ztráta pohyblivosti. V rámci této studie se rovněž hledělo na etické hledisko - larvy, které vykazovaly výrazný stres, nebo u nich došlo k výrazné ztrátě hemolymfy byly okamžitě usmrceny jejich inkubací při teplotě -20 °C po dobu 20 minut (Maslova *et al.* 2020).

V rámci studie autorů Figueiredo-Godoi *et al.* 2022 bylo rovněž využito alternativního zvířecího modelu, *G. mellonella*. Indukované rány byly infikovány bakterií *Acinetobacter baumannii*, která je řazena mezi oportunní patogeny spojené s nosokomiálními infekcemi, a je schopná vytvářet na různých površích biofilmová společenství. V rámci této práce byla indukována infekce popáleniny, s následným léčebným přístupem v podobě ošetření fotosensitizerem. V experimentech dané studie

byla použita analogická metodika, jako v předešlém případě. Jednalo se tedy o indukci popáleninového zranění na hřbetní části larvy. Po infekci a ošetření byly larvy umístěny každá samostatně ve 24jamkové sterilní destičce (Obr. 13). Stav larev byl opět průběžně monitorován. Sledována byla jejich pohybová aktivita, postupná melanizace, ale třeba taky schopnost začít tvořit kokon (Figueiredo-Godoi *et al.* 2022).



Obr.13: Indukce popáleniny a infekce u larvy *G. mellonella*. (a) Larva byla popálena kovovým rozpáleným nástrojem, (b) došlo ke vzniku léze, (c) do které bylo následně nanášeno infekční inokulum. (d) Postupně docházelo k melanizaci larvy.

Převzato z Figueiredo-Godoi *et al.* 2022

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam pomůcek, chemikálií a přístrojů

- 24 jamkový panel (Gamedium, Česká republika)
- 96 jamkový panel, sterilní mikrotitrační destička (Gamedium, Česká republika)
- Aparatura na Gramovo barvení (stojan, odkapávací vana)
- Bujóny YNB (yeast nitrogen base) s přidanými cukry (glukóza, laktóza, sacharóza, trehalóza, rhamnóza, xylóza, maltóza, galaktóza, arabinóza) – laskavě poskytnuto ing. J. Vackovou
- Buničina
- *Candida albicans* ATCC 90028, CCM 8261 (Česká sbírka mikroorganismů, Česká republika)
- Centrifuga (Hettich Rotanta, Německo)
- Denzitometr DEN-18 McFarland Densitometer Biosan (P-LAB, Česká republika)
- Desinfekce (70% roztok ethanolu), Penta (Česká republika)
- Destilovaná voda
- Diagnostické proužky pro oxidázový test - ITEST Oxidáza (ITEST, Česká republika)
- Explanty získané z larev *Galleria mellonella*
- Falconyho 15ml centrifugační zkumavky (Gamedia, Česká republika)
- Fluorescenční mikroskop Olympus Provis AX 70 s kamerou připojenou k PC s programem NIS – elements AR, Nikon, Japonsko
- Glukóza (Sigma-Aldrich, USA cílová koncentrace 0.1 mM)
- Hamiltonova jehla (Hamilton microsyringes, Německo)
- Homogenizátor HandheldMT-30K (Hangzhou Miu Instruments Co., Čína)
- HoneyComb destička (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finsko)
- Chemikálie pro přípravu IPS (insect phosphate buffer, hmyzí fyziologický roztok) roztoku: NaCl, KCl, TRIS/HCl, EDTA, citrát sodný (Dr. Pharma Kulich, Česká republika)
- Chromogenní půda CandiSelect (Bio-Rad, Francie)
- Inkubátor Binder WTB (Binder, Germany)

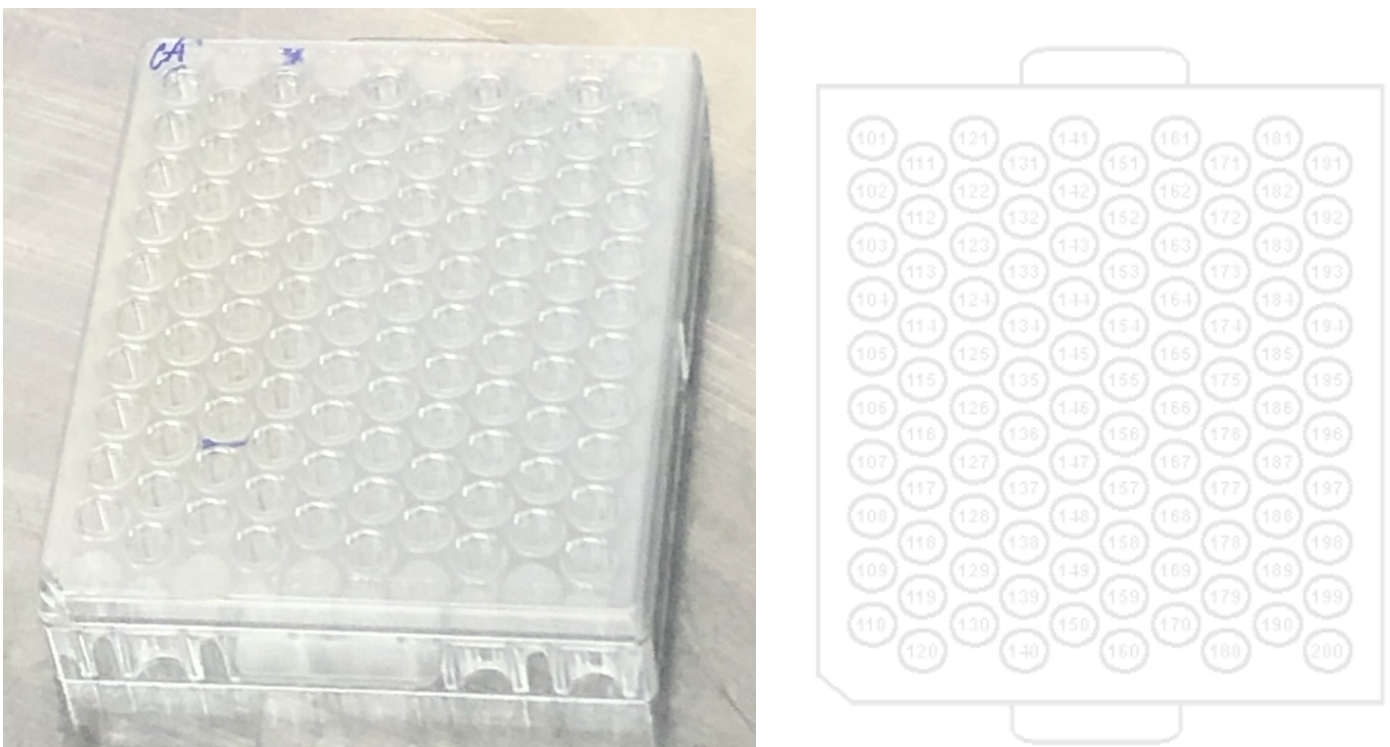
- Jednorázové očkovací klíčky (Gamedium, Česká republika)
- Kalkofluorová běloba (18909 Calcofluor White Stain, Sigma-Aldrich, USA)
- Kyanoakrylát (sekundové lepidlo)
- Kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker (Biosan, Litva)
- Laboratorní špičky (Eppendorf, Německo)
- Laminární box Esco Class II type A2 (Dynex laboratories s.r.o, Česká republika)
- Larvy *Galleria mellonella*, hmotnostní rozmezí larev: 0,3130 g – 0,4250 g (zakoupeny v Acheta, Česká republika)
- Larvy *Galleria mellonella*, hmotnostní rozmezí larev: 0,580 g – 0,600 g (odchováno v rámci biologické laboratoře, Katedry Biologických a lékařských věd, Faf UK HK)
- Lihový kahan
- Lugolův roztok - laskavě poskytnuto ing. J. Vackovou
- Methyl modř vodný roztok - laskavě poskytnuto Ing. J. Vackovou
- Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, ATCC 43300, CCM 4750 (Česká sbírka mikroorganismů, Česká republika)
- Mikropipeta (Fisher Scientific, s.r.o., Česká republika)
- Mikrozukmavky Eppendorf (VWR International s.r.o, Česká republika)
- Nádoza s ledem
- Peroxid vodíku 3% (Coopharma s.r.o, Česká republika)
- Petriho miska (Gamedia, Česká republika)
- Pinzeta
- Plastová L-hokejka (Gamedia, Česká republika)
- plotny s Müeller-Hintonovým agarem (MHA, Himedia, India) – laskavě poskytnuto I. Dufkovou
- Plotny se Sabouradovým agarem – bez obsahu antibiotik (SA, Himedia, India) – laskavě poskytnuto I. Dufkovou
- Podložní a krycí mikroskopická sklíčka (Fisher Scientific, s.r.o, Česká republika)
- Pozinkovaný hřebík (průměr hlavičky 3,5 mm)
- Propidium jodid (Propidium iodide, P4864 – 10 ml, 1 mg/ml PI in water, MW 668,39; c = 1,496 mM, Sigma-Aldrich, USA)

- Roztok safraninu - laskavě poskytnuto ing. J. Vackovou
- Roztok krystalové violeti - laskavě poskytnuto Ing. J. Vackovou
- Samolepící fólie na překrytí mikrotitrační destičky (VWR International s.r.o, Česká republika)
- Skalpel
- Soyabean medium– Soyabean Casein Digest Medium (Himedia, India)
- Spektrofotometr Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finsko)
- Sterilní OD zkumavky (Gamedia, Česká republika)
- Stojany na zkumavky (Gamedia, Česká republika)
- Syto 9 – S34854, 5 mM solution in DMSO (Invitrogen, USA)
- Třepací inkubátor Heidolph Inkubator 1000 (Heidolph, Germany)
- Vortex M52 Minishaker IKA (P-LAB, Česká republika)
- Zkumavky 10 ml (Gamedia, Česká republika)

4.2 Optimalizace přípravy mikrobiálního inokula pro následné infekce „burn-wound“ modelu *ex vivo*

4.2.1 Pracovní hypotéza

Pro infekční inokulum, které bylo vneseno do indukované rány, bylo třeba zajistit, aby bylo v plné viabilitě. Pro infekci ran byla tedy připravena mikrobiální suspenze v exponenciální růstové fázi. Pro zaznamenání exponenciální fáze růstu byla volena kultivace v destičkách Honeycomb s kontinuálním měřením optické density (O.D.) pomocí přístroje Bioscreen C.



Obr. 14: Vlevo na obrázku je zachycena Honeycomb destička, která byla užita pro kultivaci kmenů kvasinky *Candida albicans* a bakterie *Staphylococcus aureus*. Vpravo je pak schematicky znázorněné rozvržení Honeycomb destičky.

Tabulka 2: Mikrobiální kmeny užívané k experimentu

Označení	Mikrokolonie	Sbírkový kód
CA	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
		CCM 8261
MRSA	met icilin rezistentní	ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4750

Legenda: ATCC - *American Type Culture Collection*, *Americká sbírka mikroorganismů*, CCM – *Czech Collection of Microorganisms*, *Česká sbírka mikroorganismů*

4.2.2 Postup

Den 1

- naočkování kmenů MRSA a CA na Sabouraudův agar a Müller-Hintonův agar
- kultivace ploten proběhla při 37°C, po dobu 24 hodin

Den 2

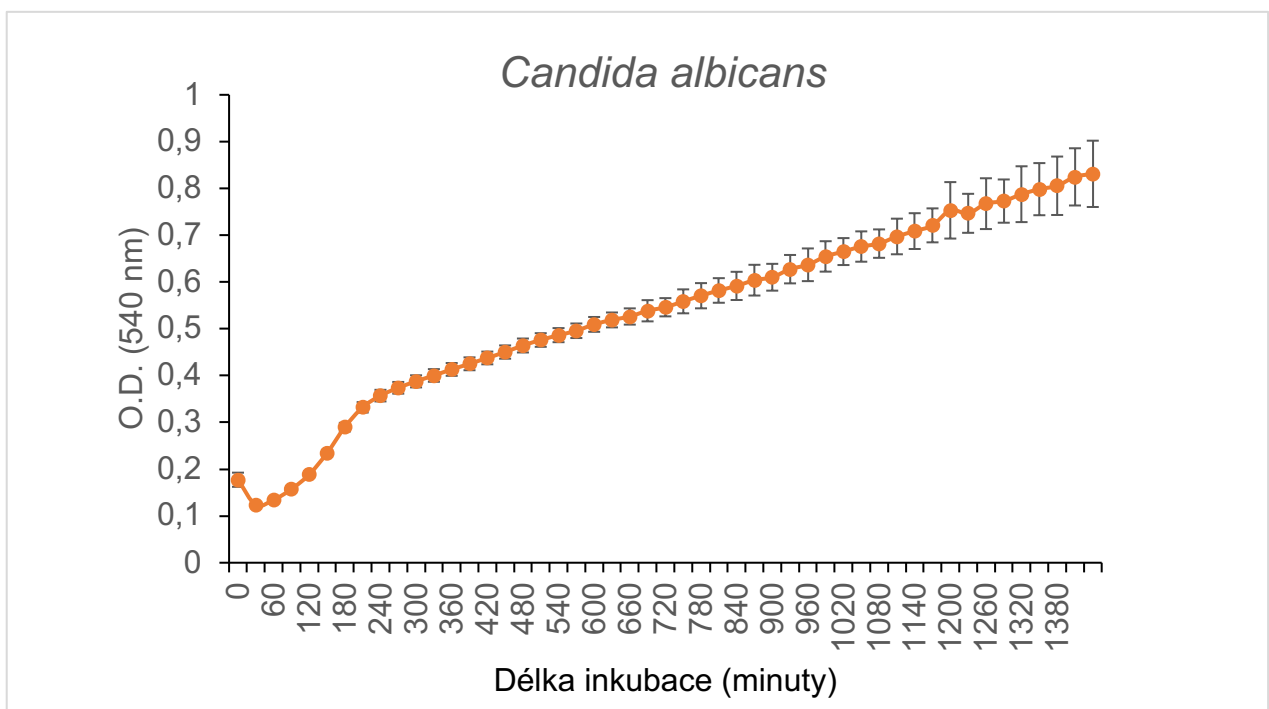
- vytvoření bakteriální/kvasinkové suspenze o optické densitě 0.5 McFarlanda (suspenze vytvořeny v Soyabean mediu) do O.D. zkumavek (vytvoření duplikátu pro každý kmen)
- mikrobiální suspenze se přenesla po 100 µl do Honeycomb destičky v oktaplikátu pro každý kmen
- destičky se vložily do přístroje Bioscreen C, mapování růstu při teplotě 36.8°C po dobu 24 hodin

4.2.3 Hodnocení a výsledky

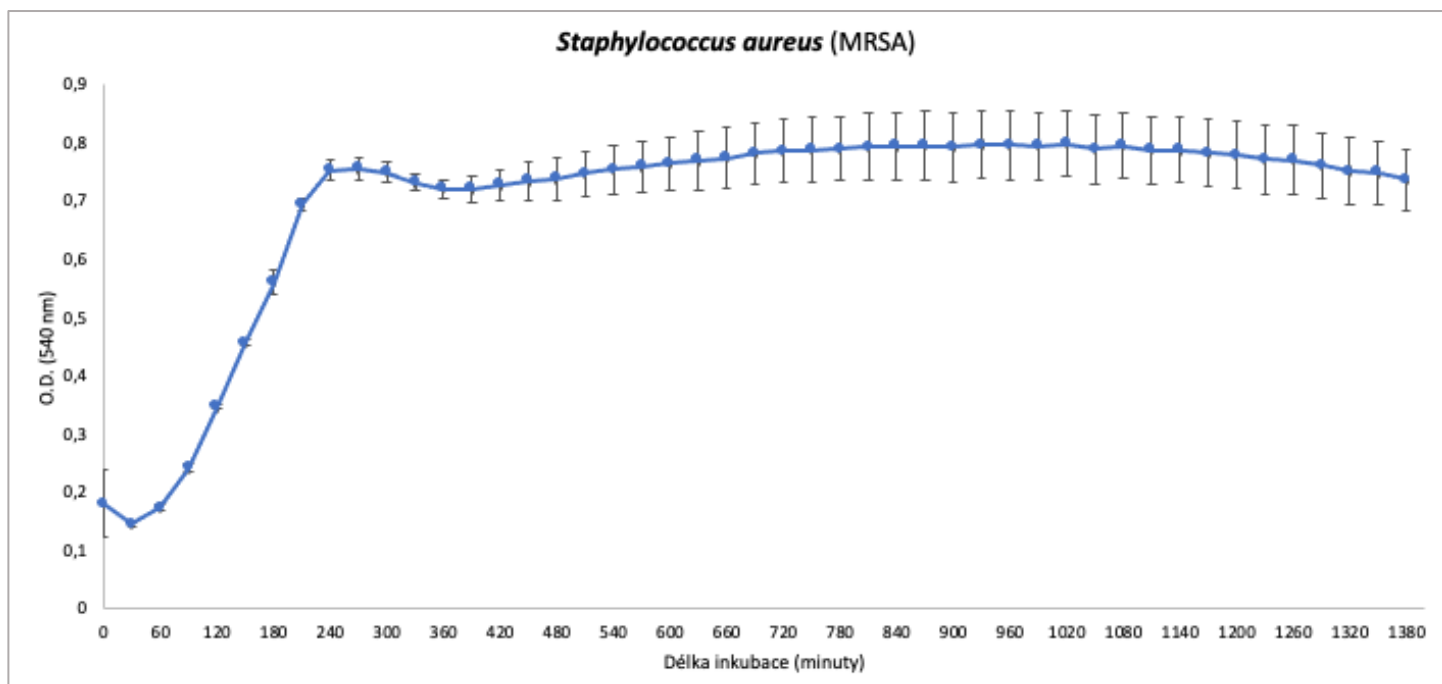
Tímto krokem, tedy určením, kdy je mikroorganismus v exponenciální fázi růstu, bylo zajištěno, že v následujících experimentech bylo použito infekční inokulum v plné kondici.

Z grafů níže lze vyčíst, že u kvasinky *Candida albicans* v Soyabean mediu, při počáteční densitě inokula odpovídající 0.5 McFarland dochází k nejvyššímu nárůstu optické density (která reflektuje přírůstek buněk v suspenzi) v časovém intervalu mezi 60 až 240 minutou od počátku inkubace při 36.8°C (Graf 1), pro *Staphylococcus aureus* MRSA se pak jedná o časový údaj 180 minut od počátku inkubace (Graf 2).

Následující experimenty již byly prováděny pouze s mikroorganismem *Candida albicans*, který byl zvolen pro následující experimenty. V budoucnosti je pak zamýšleno provádět obdobný výzkum i v rámci bakteriálního mikroorganismu *Staphylococcus aureus*, MRSA.



Graf 1: Mapování růstu kvasinky *Candida albicans* v Soyabean mediu. Počáteční hodnota inokula odpovídala zákalu 0,5 dle McFarlandovy stupnice. O.D. – optická densita.



Graf 2: Mapování růstu bakterie *Staphylococcus aureus* (MRSA). Počáteční hodnota inokula odpovídala zákalu 0,5 dle McFarlandovy stupnice. O.D. – optická densita.

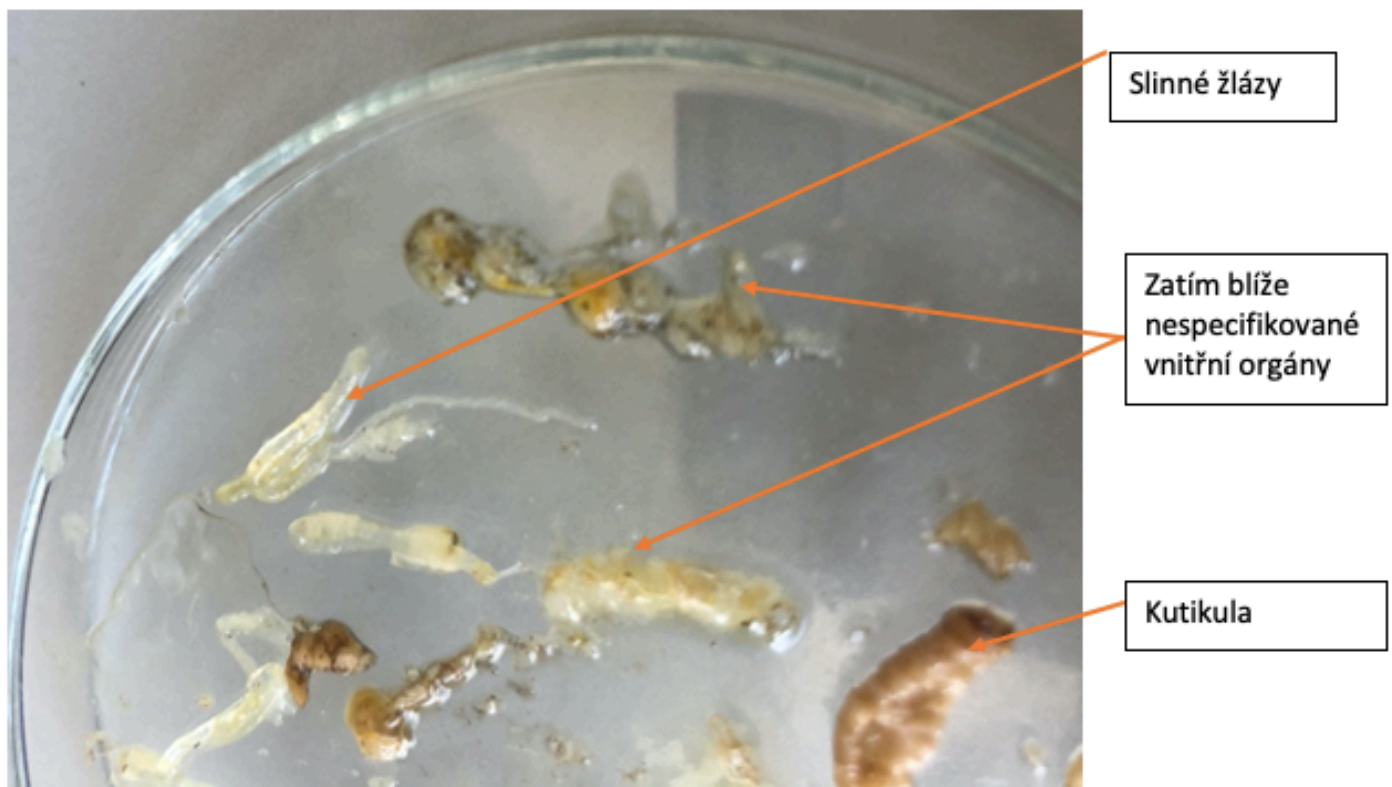
4.3 Optimalizace přístupu vedoucího k odstranění trávicí trubice a vnitřních tělesných kompartmentů larvy *Galleria mellonella*

4.3.1 Pracovní hypotéza

Pro přípravu tkáňových explantů kutikuly larev je více než žádoucí přistupovat k věci tak, aby bylo maximálně zamezeno kontaminaci explantů mikrobiálním agens. V experimentech bylo zcela zásadní pracovat co nejvíce za aseptických podmínek. S ohledem na to, že trávicí trubice je hojně osídlena střevní mikrobiotou, která by mohla být výrazným zdrojem kontaminace, bylo během experimentu maximální snahou vyhnout se trávicí trubici, aby nedošlo ke kontaminaci právě uvolněním obsahu trávicí trubice.

Předběžné šetření – pitva larvy usmrčené dekapitací přinesla poznatek, že trávicí trubice však při vyjmutí orgánů z larvy na první pohled není snadno odlišitelná – viz Obr. 15. Z tohoto důvodu byla per orálně aplikována kontrastní látka, vodný roztok metylenové modři, metodu takzvaného nuceného krmení – „*force feeding method*“ (Obr. 16), aby mohlo dojít k přesné lokalizaci trávicího traktu larvy.

V rámci tohoto experimentu byly užity larvy odchované v biologické laboratoři, Katedry biologických a lékařských věd, Faf UK HK. Pro odchov byl volen termobox se stabilní teplotou 29°C. Larvy byly zakrmovány dietou připravenou dle Haydaka, tato dieta je podrobně popsána v diplomové práci *Galleria mellonella in vivo model pro studium interakce antimikrobiální látka vs. Patogen* (Polová, 2019).



Obr.15: Preparace larvy *Galleria mellonella* na Petriho misce. S jistotou bylo možné z tohoto šetření vnitřních orgánů určit pouze slinné žlázy.

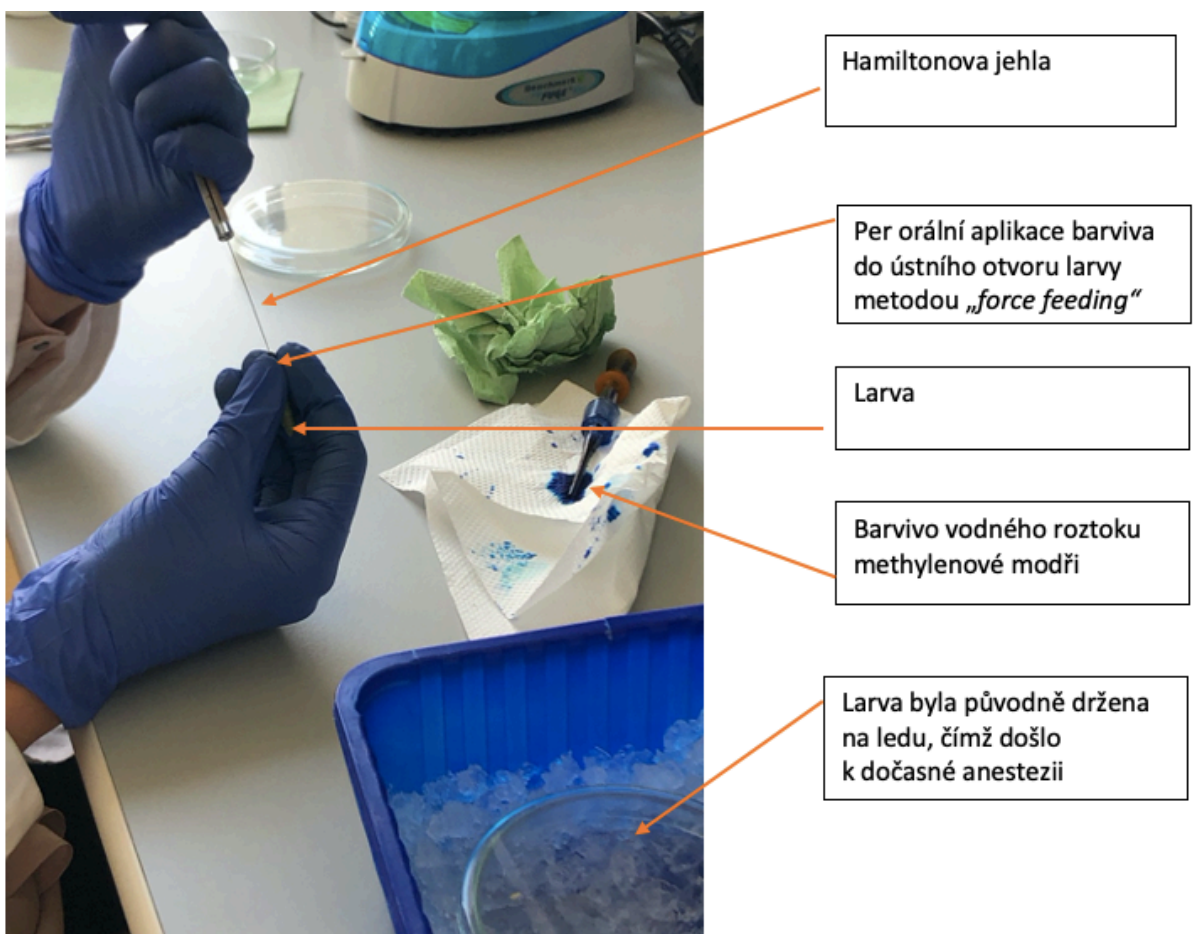
4.3.2 Postup

- provedla se chladová anestezie larvy – larva byla držena na ledu do okamžiku, než se přestala pohybovat
- do Hamilton jehly se natáhlo po 20 μ l vodného roztoku methylenové modři
- larva se opatrně uchopila (nutné pracovat rychle, larva se zahřátím mezi prsty brzy probouzí) a v dalším kroku byla provedena per orální administrace „force – feeding“ larvy vodným roztokem barviva methylenové modři
- vyčkalo se po dobu cca dvou minut, než došlo k prostoupení barviva celým trávicím traktem larvy (prostup barviva je makroskopicky pozorovatelný skrze kutikulu larvy)
- provedla se rychlá dekapitace larvy a následně se provedlo vyjmutí trávicí trubice

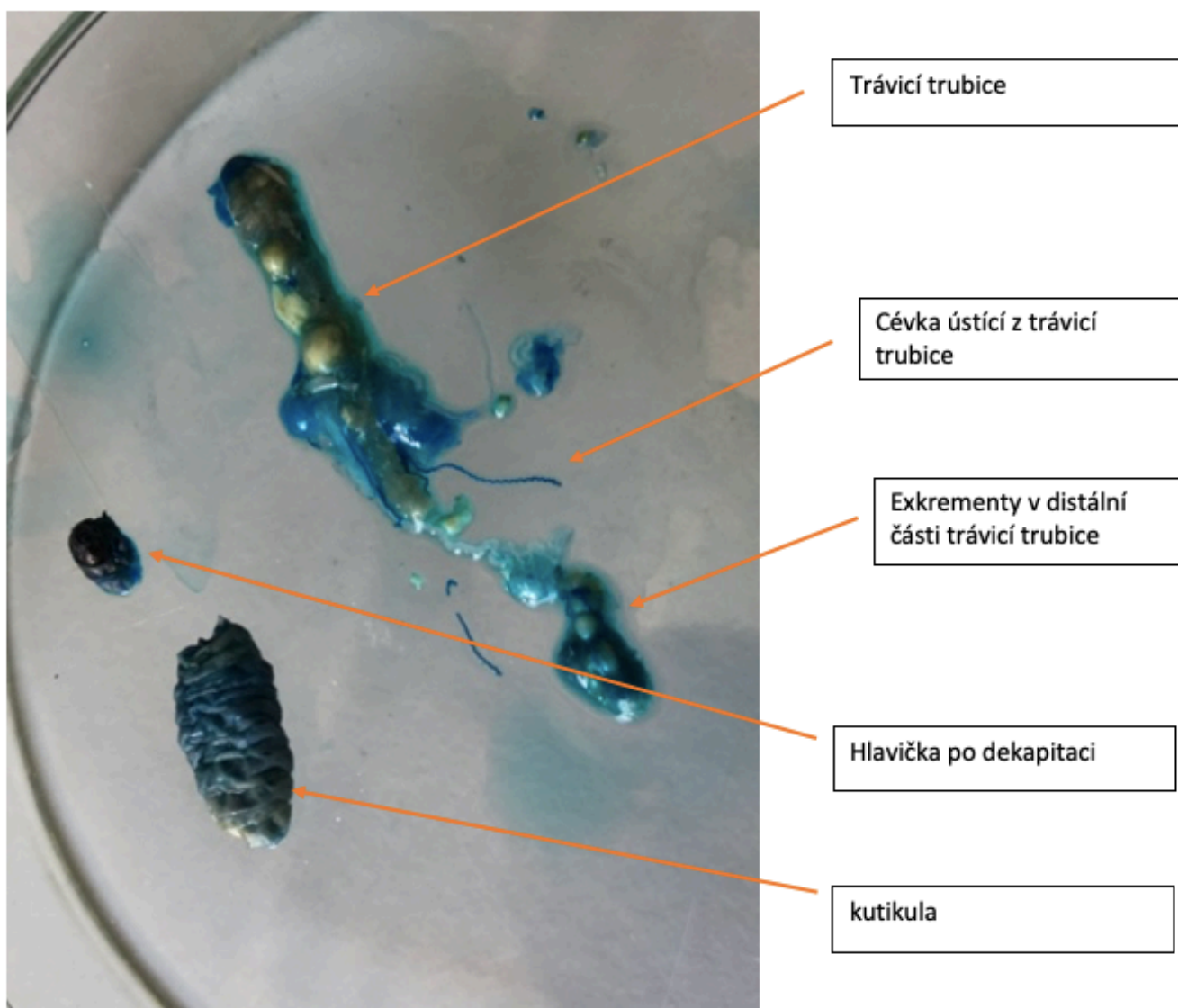
4.3.3 Hodnocení a výsledky

S jistotou lze konstatovat, že se povedlo lokalizovat trávicí trubici, a to i díky tomu, že po vyjmutí trávicí trubice byly v jejím distálním konci patrné drobné kulovité útvary, což jsou exkrementy larvy.

Během této části experimentu bylo zároveň zjištěno, že barvivo prostupuje nejen do trávicí trubice, ale postupně i do ostatních částí organismu. Na preparátu (Obr. 17) jsou pozorovatelné obarvené drobné útvary vypadající jako „cévky“, které obklopují trávicí trubici. S jistotou ale nelze přesně specifikovat o jaké tělní útvary se jedná, jelikož dle morfologického popisu by larva měla mít pouze jednu velkou cévu.



Obr 16: Per orální administrace barviva pomocí Hamiltonovi jehly metodou „force – feeding“ larvy *Galleria mellonella*.



Obr. 17: Preparace larvy *Galleria mellonella* po podání kontrastní látky, methylenové modři metodou „force – feeding“.

4.4 Získávání explantů kutikuly larvy *Galleria mellonella* a následná indukce popáleniny

4.4.1 Pracovní hypotéza

Příprava explantů kutikuly larvy *Galleria mellonella* pro zavedení *ex vivo* biofilmového modelu. Během celého procesu byla maximální snaha vyhnout se především trávicí trubici, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci explantů.

Po získání tkáňového explantu kutikuly došlo k vytvoření popáleninového zranění, tedy tzv. „burn- wound“.

V rámci optimalizace metodiky byly voleny larvy ve stejném vývojovém stádiu. Užity byly larvy v posledním vývojovém stádiu, snahou bylo volit larvy cca stejné velikosti. Larvy byly získány z komerčně dostupného chovu, jelikož larvy odchované v laboratoři v době experimentu nedosahovaly dostatečného vývojového stádia.

Tabulka 2: Hmotnosti jednotlivých larev *Galleria mellonella* užitých v rámci uvedeného experimentu

Larva <i>G. mellonella</i>	Hmotnost
Č. 1	0,3870 g
Č. 2	0,4100 g
Č. 3	0,4250 g
Č. 4	0,3389 g
Č. 5	0,3800 g
Č. 6	0,3130 g

4.4.2 Postup

Den 1

- provedla se řádná desinfekce celého těla larvy pomocí buničiny navlhčené 70% alkoholem
- larva se usmrtila dekapitací
- izolovala se kutikula pomocí skalpelu, maximální snaha o aseptický přístup, snaha vyhnout se trávicí trubici, která je velmi obtížně pozorovatelná
- po získání explantu se provedla indukce popáleniny („*burn-wound*“, viz. Obr. 18) – pomocí pozinkovaného hřebíku uchopeného v pinzetě nahřátého nad kahanem a přitisknutého na několik sekund k explantu kutikuly



Obr. 18: Tkáňové explanty kutikuly larvy *Galleria mellonella*. Jedná se o explanty na kterých již byla indukována popálenina. Průměr vzniklé rány popálením je 3,5 mm.

- V rámci pilotního experimentu byly testovány dva přístupy pro získání explantu
 - Přístup A: dekapitace, okamžité provedení „*burn-wound*“, následně boční řez a příprava tkáňového explantu
 - Přístup B: (Obr. 19) dekapitace, oddělení distální části larvy, snaha vyjmout ven celou trávicí trubici v celku, boční řez kutikuly, příprava tkáňového explantu, nakonec provedení „*burn-wound*“

- Pro snížení rizika mikrobiální kontaminace explantů a pro šetření případné mikrobiální kontaminace explantů byly vedeny následující kroky:
 - tkáňové řezy se přenesly do zkumavek s 1 ml fyziologického roztoku
 - provedl se řádný vortex za účelem přenesení případných mikrobiálních entit ulpělých na explantech do fyziologického roztoku/ Soyabean media (případné mikroorganismy by měly být tímto krokem odplaveny)
 - provedl se výsev po 25 μ l reprezentativních aliquotů z fyziologického roztoku/Soyabean media (v triplicátech) na Müller-Hintonův agar, rozetření L-hokejkou

Den 2, 3

- Zhodnocení nárustu mikroorganismů na plotnách s Müller-Hintonovým agarem a Sabouradovým agarem po 24 a 48 hodinách inkubace

4.4.3 Hodnocení a výsledky

V první fázi toho experimentu bylo cílem získat tkáňové explanty. Bylo očekáváno, že bude veden plynulý řez kutikulou larvy a následně bude opatrně sejmuta kutikula, aby nedošlo ke kontaminaci preparátu obsahem trávicí trubice. Kutikula larvy byla oproti našemu očekávání pevnější a vedení plynulého řezu tak nebylo možné. Osvědčilo se nám řez provádět nikoli plynulým tahem skalpelu, ale kývavým pohybem skalpelu.

Po 24 a 48 hodinách bylo provedeno hodnocení výsevů na živných médiích. Proveden byl výsev pro obě metody získávání explantů. Tímto krokem bylo ověřeno,

kteřá z metod je vhodnějši z pohledu nižšihó rizika pŕiřadně mikrobiální kontaminace. Výsledky výsevu potvrdily, že metoda A je nevhodná, protože již po 24 hodinách došlo na Sabouradově i Müller Hintonově agaru k masivnímu nárůstu nepočitatelného množství kolonií. V pŕiřadě vzorku získaného odběrovou metodou B po 24 hodinách došlo na Müller Hintonově agaru k nárůstu 20 a 12 kolonií a v pŕiřadě Sabouradova agaru došlo k nárůstu deseti kolonií v obou duplikátech. Popis makromorfologických znaků jednotlivých kolonií, je uveden v následující Tabulce 4. Získávání explantů metodou B se tedy jeví jako značně efektivnějši. Postup této metody je znázorněn na Obr. 19.

Tabulka 4: Výsledky výsevu metodou B na jednotlivá živná média

Kolonie	Živné médium	Průměr [mm]	Tvar	Vzhled
Č. 1	Müller Hintonův agar	4	Plochá	Nažloutlá, lesklá
Č. 2	Müller Hintonův agar	3	Lehce vypouklá	Bílá, matná
Č. 3	Müller Hintonův agar	1-2	Lehce vypouklá	Žlutošedá, lesklá
Č. 4	Sabouradův agar	2-3	Výrazně vypouklá	Bílá, texturovitá

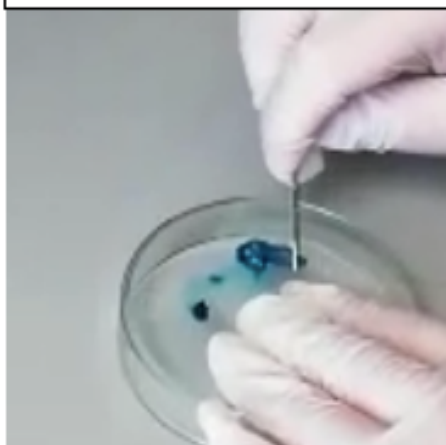
1 Larva *Galleria mellonella*



2 Dekapitujeme larvu



3 Odstraníme distální část larvy



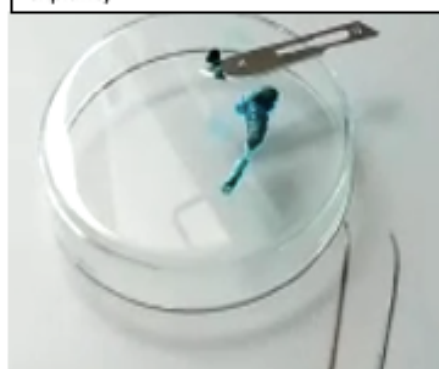
4 Následně pracujeme jen s tělem larvy



5 Opatrně pomocí pinzety vytáhneme distálním koncem trávicí trubici



6 Vytažením trávicí trubice jsme získali samostatnou kutikulu, z té připravíme explanty



Obr. 19: Znárodnění postupu, který vedl k žádoucímu odstranění trávicí trubice, aniž by došlo k výrazné mikrobiální kontaminaci kutikuly a následně i připravených explantů. Pro lepší rozlišení jednotlivých tělních kompartmentů larvy *Galleria mellonella* bylo v rámci optimalizace přístupu voleno per orální podání kontrastní látky, methylenové modři.

4.5 Využití diagnostického barvení dle Grama pro přibližné zařazení mikrobiálních kontaminantů do taxonů

4.5.1 Pracovní hypotéza

Diagnostické barvení dle Grama a následné mikroskopické pozorování umožnilo přibližnou kategorizaci a zařazení do taxonů mikrobiálních agens, rostoucích na kultivačních půdách.

4.5.2 Postup

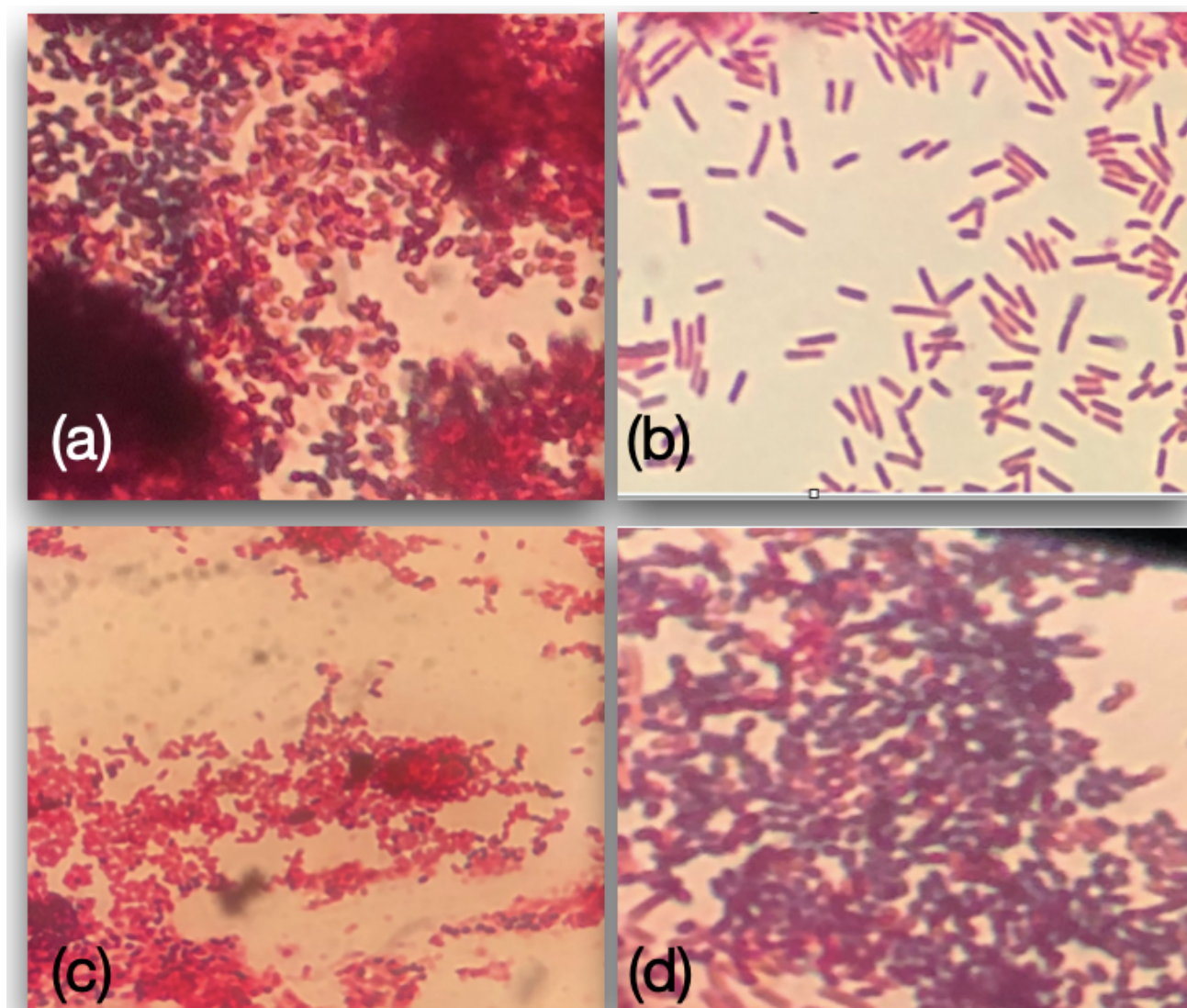
- na podložní sklíčko se odebral pomocí kličky vzorek z kolonie, který se rozetřel na sklíčku
- provedla se fixace plamenem
- preparát se převrstvil roztokem krystalové violeti, nechal se působit 60 sekund
- následně se preparát převrstvil Lugolovým roztokem, nechal se působit 60 sekund, poté se barvivo slilo, a preparát se opláchl vodou
- k odbarvení se užil alkohol, po odbarvení se provedlo opláchnutí preparátu vodou
- preparát se převrstvil roztokem safraninu, nechal se působit 60 sekund a poté se provedlo opláchnutí vodou
- po vysušení preparátu následovalo mikroskopické hodnocení (využití školního mikroskopu, pozorování pod imerzním systémem)

4.5.3 Hodnocení a výsledky

Během tohoto šetření byly pod mikroskopem pozorovatelné čtyři mikroskopicky odlišné mikroorganismy. Jednalo se o mikroorganismy jak bakteriálního, tak i mykotického původu.

Tabulka 5: Výsledné nálezy v jednotlivých preparátech

Kolonie	Barvení dle Grama	Tvar
Č. 1	G/G-	koky
Č. 2	G+/G-	tyče
Č. 3	G-	koky
Č. 4	G+	kulovité velké útvary - kvasinky



Obr. 20: Snímky obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie. Na snímcích (a) – (d) jsou zachyceny mikroorganismy popsané v Tabulce č. 5. (a) kolonie č. 1 (b) kolonie č. 2 (c) kolonie č. 3 (d) kolonie č. 4 Pozorování probíhalo pomocí školního mikroskopu při celkovém zvětšení 1000×.

4.6 Infekce indukovaných popáleninových ran na tkáňových explantech udržovaných ve hmyzím fyziologickém roztoku suplementovaným hemolymfou larev *Galleria mellonella*

4.6.1 Pracovní hypotéza

Příprava explantů z kutikuly pro zavedení *ex vivo* biofilmového modelu, modelace kvasinkové infekce v popáleninové ráně. Pro navození kumulace exudátu v ráně při tvorbě popáleninového zranění u živých experimentálních zvířat (zohlednění role imunokompetentních buněk v rámci interakce hostitel-patogen) byl fyziologický roztok suplementován hemolymfou.

4.6.2 Postup

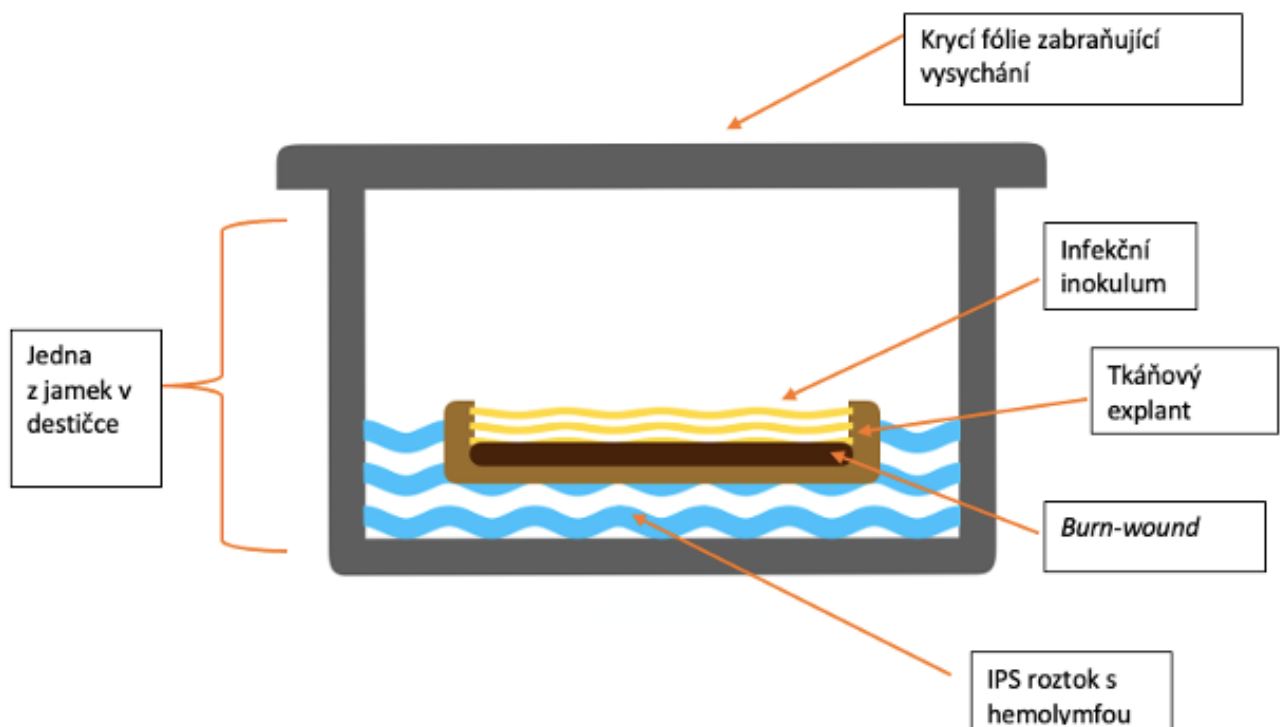
Den č. 1

- naočkovaly se plotny se Sabouraudovým agarem kmenem kvasinky *Candida albicans* ATCC 90028 (CCM 8261)
- 24hodinová inkubace v termostatu při teplotě 37 °C

Den č. 2

- vytvořila se suspenze s O.D. 0.5 McFarland, suspenze se převedla do Falcon tub
- provedla se inkubace kvasinek do exponenciální růstové fáze v termostatu za stálého míchání (ideální časové rozmezí je okolo dvou hodin od počátku inkubace, viz. Kapitola 4.2., Graf č. 1)
- centrifugace kvasinkových suspenzí při 10 000 × g, po dobu 5 minut, při 24-26 °C
- vytvořila se kvasinková suspenze o cílové O.D. 0.1 a 1 McFarland v Soyabean mediu
- odebrala se hemolymfa z larev
 - hemolymfa se získala pomocí Hamiltonovy jehly, larva se opatrně napíchlá v oblasti za hlavovou částí a pomocí pipety se provedl šetrný odběr malého množství hemolymfy

- hemolymfa byla držena na ledu, aby se předešlo melanizaci, následně byla ředěna pomocí IPS pufru, tak aby vznikl 20% roztok hemolymfy
- příprava explantů a provedení „*burn wound*“ dle postupu popsáno v kapitole 4.4.
- vytvořené explanty byly vneseny do 24 jamkového panelu – pouze vlhčené jamky, následně se provedla infekce popáleninové rány přenesením inokula o objemu 5 μ l (nesmí se dostat mimo indukovanou ránu!), následovala inkubace po dobu 1–1.5 hodiny pro adhezenci kvasinkových buněk
- po inkubaci se odpipetovalo neadherované inokulum
- tkáňové explanty byly následně obklopeny IPS puftrem suplementovaným hemolymfou, došlo k vytvoření tzv. „*air-liquid interface*“ v jamkách (obr. 21)
- destičky se překryly folií, aby nedocházelo k odpařování kapaliny
- kvasinky v ráně se inkubovaly po dobu 24/48 hodin při teplotě 37°C v termostatu

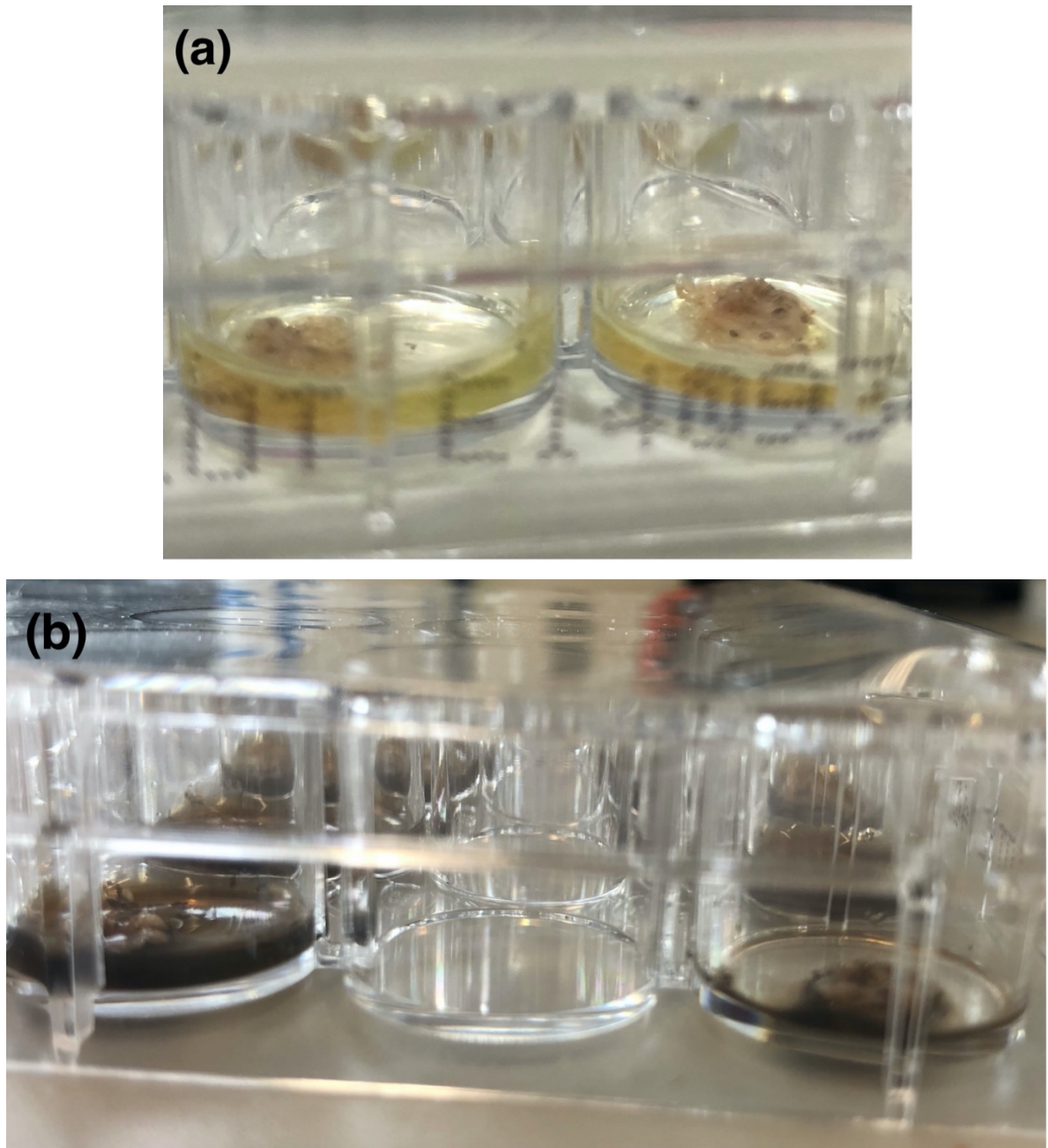


Obr. 21: Schématické znázornění explantu kutikuly získaného z *Galleria mellonella* umístěného v „air-liquid“ fázi.

4.6.3 Hodnocení a výsledky

Vzorky po 24hodinové inkubaci byly makroskopicky bez výrazných změn, ovšem po 48hodinové inkubaci došlo u vzorků k výrazné barevné změně, důsledkem melanizace (tento proces je blíže popsán v kapitole 3.1.5.5.).

Vybrané tkáňové explanty (Obr. 22) byly následně využity k homogenizaci (popsáno v následující kapitole)



Obr. 22: Porovnání explantů po 24hodinové inkubaci (a) a po 48hodinové inkubaci (b).

4.7 Hodnocení tvorby kvasinkového biofilmu v indukované popálenině tkáňových explantů tvořených z komerčně dostupných larev

4.7.1 Pracovní hypotéza

Kvasinka *Candida albicans* je schopná, jak vytvářet biofilmová společenství, tak i invadovat do tkání svého hostitele. Prvotním cílem tedy bylo určit, v jaké míře dochází k tvorbě kvasinkového biofilmového společenství v indukované ráně explantu. V rámci tohoto a předchozích experimentů (popsaných od kapitoly 4.4) byly užity larvy z komerčně dostupných chovů, jelikož larvy odchované v laboratoři v době experimentů nedosahovaly dostatečného vývojového stádia. Tedy i explanty hodnocené v tomto kroku experimentu a hemolymfa pro suplementaci byly získány ze zakoupených larev.

Indukovaná popáleninová rána by měla být vhodnou „živnou půdou“ pro kvasinku *Candida albicans*. Kvasinky jsou agens schopné vytvářet biofilmová společenství jak na neživých, tak i na živých površích. Pomocí fluorescenční mikroskopie lze studovat, zda společenství mikrobů v ráně vykazují vlastnosti, které jsou typické pro biofilmová společenství. Pomocí vhodných barvicích technik lze sledovat jak samotné mikrobiální buňky biofilmů, tak i přítomnost matrice, která stojí za „přidanou“ rezistencí biofilm-formujících agens. Lze také pozorovat viabilitu buněk biofilmu.

4.7.2 Postup

- po 24hodinové inkubaci kvasinek, které tvořily infekci v ráně, byl z indukovaných popáleninových ran proveden seškrab biofilmů pomocí skalpelu, či očkovací kličky
- odebraný materiál byl přenesen do mikroskopické kádinky
- připravil se barvicí roztok na barvení biofilmu – volené cílové koncentrace fluorescenčních barviv vycházely z podkladů uvedených v rámci dokumentu LIVE/ DEAD BacLight Viability Kit (Invitrogen, USA. Zde jsou uvedeny cílové koncentrace: $c_{(SYTO)} = 5, 1 \mu\text{M}$ a $c_{(PI)} = 30 \mu\text{M}$)

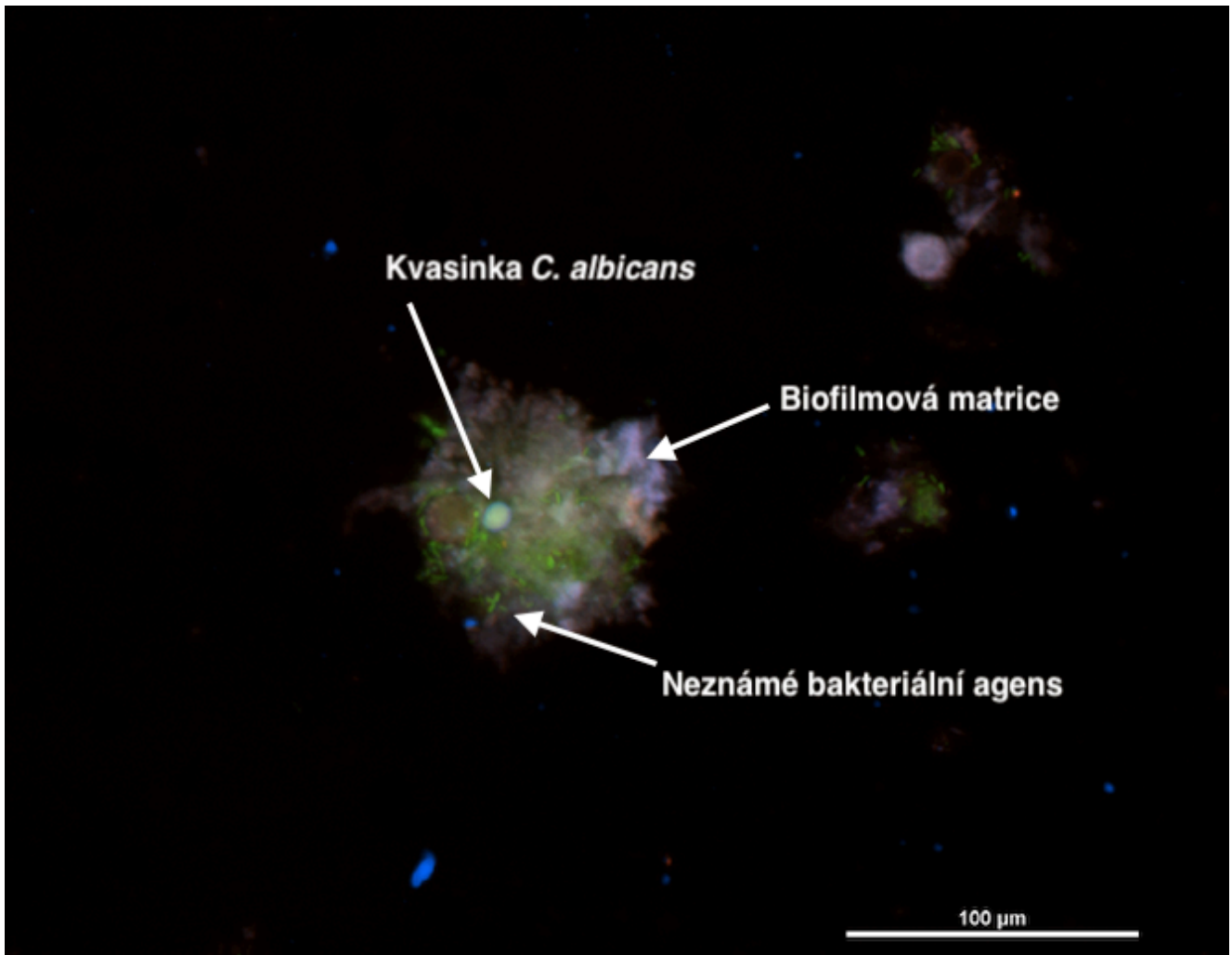
- do mikrozkušavky Eppendorf se přidala směs fluorescenčních barviv Syto9/PI o cca dvojnásobném objemu, než byl objem biofilmové biomasy
- barvení probíhalo po dobu alespoň 25 minut ve tmě za stálého kývání
- před přenesením vzorku na sklíčko se provedla centrifugace při 23 - 25 °C, 7500 x g po dobu 5 minut
- po centrifugaci se získala peleta, která se přenesla o objemu 5 µl na sklíčko
- na sklíčko se přidalo 2,5 µl barviva kalkofluorové běloby
- preparát byl pozorován pomocí fluorescenčního mikroskopu

4.7.3 Hodnocení a výsledky

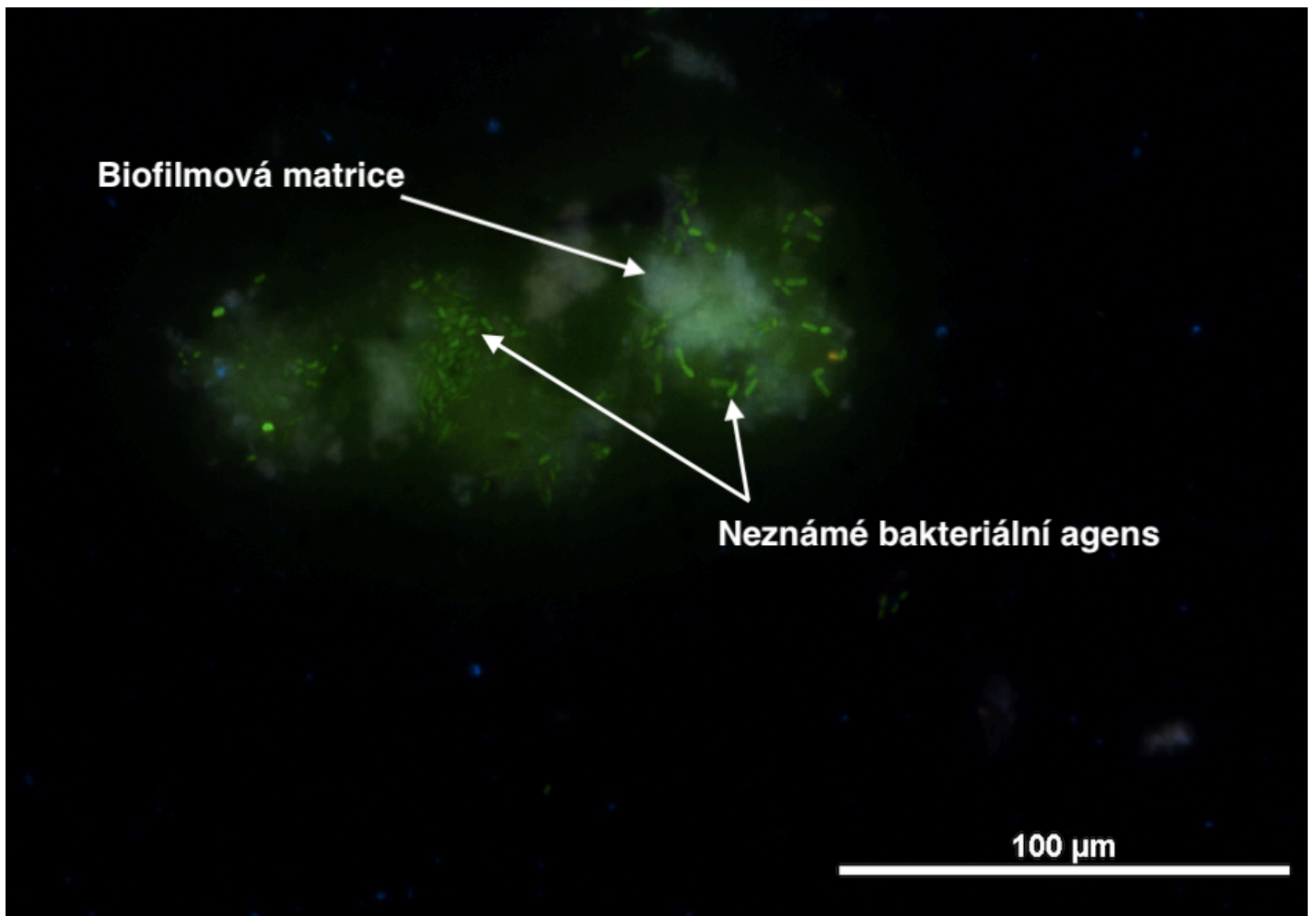
Fluorescenční barvivo Syto9 má schopnost difundovat přes buněčné membrány. Váže se na DNA jak živých, tak i neživých buněk a barví je zeleně. Genetická informace je i součástí EPS, barvení barvivem Syto 9 tudíž poskytuje informaci o celkovém množství zformovaného biofilmu. Pro určení životaschopnosti bakterií se barvivo Syto 9 používá v kombinaci s propidium jodidem (PI, propidium iodide). Fluorescenční barvivo PI proniká pouze do buněk, jež mají poškozenou buněčnou membránu, jedná se tedy o buňky neživé a ty pak barví červeně. Jak vyplývá z předchozího textu do mrtvých buněk vstupuje jak zelené fluorescenční barvivo Syto 9 tak i červené fluorescenční barvivo PI. Barvivo PI má ale silnější afinitu k DNA, proto jsou neživé buňky během fluorescenční mikroskopie zbarveny červeně (Stiefel *et al.* 2015, Stocks 2004). Kalkofluorová běloba je pak modré barvivo, které se, jak na svých stránkách uvádí přímo výrobce, nespécificky váže na polysacharidy, které jsou součástí buněčných stěn kvasinek, ale zároveň jsou polysacharidy významnou složkou biofilmů. Jedná se tedy o barvivo, které se váže jak na kvasinky, tak na komponenty EPS.

V rámci mikroskopického šetření bylo v indukované ráně infikované kvasinkovou suspenzí o O.D. 1 McFarland již po 24hodinové inkubaci prokázáno biofilmové společenství mikroorganismů s převládajícím zastoupením neznámého bakteriálního agens, ojediněle pak s přítomnou kvasinkou *Candida albicans*. V případě infekce kvasinkovou suspenzí o O.D. 0.1 McFarland byla ve vyšetřovaném vzorku

zaznamenána pouze přítomnost neznámého bakteriálního agens. Svoji roli mohlo sehrát i malé množství infekčního inokula v ráně.



Obr. 23: Mikrobiální společenství tvořené v indukované popáleninové ráně v explantu kutikuly larvy *Galleria melonella*. Velikost infekčního inokula – 5 μ l, optická densita 1 McFarland. Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. Preparát barven pomocí Syto 9/ PI/ kalkofluorová běloba.



Obr. 24: Mikrobiální společenství tvořené v indukované popáleninové ráně v explantu kutikuly larvy *Galleria melonella*. Velikost infekčního inokula – 5 μ l, optická densita 0.1 McFarland. Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. Preparát barven pomocí Syto 9/ PI/ kalkofluorová běloba.

Jak je tedy zjevné z mikroskopických snímků, biofilm, který se vytvořil v ráně nelze považovat za monodruhový kvasinkový biofilm. Zjevně došlo ke kontaminaci explantu jiným mikrobiálním agens. Na základě tohoto zjištění byl dále studován potenciální zdroj této kontaminace.

4.8 Šetření mikrobiálního zatížení hemolymfy komerčně dostupných larev

4.8.1 Pracovní hypotéza

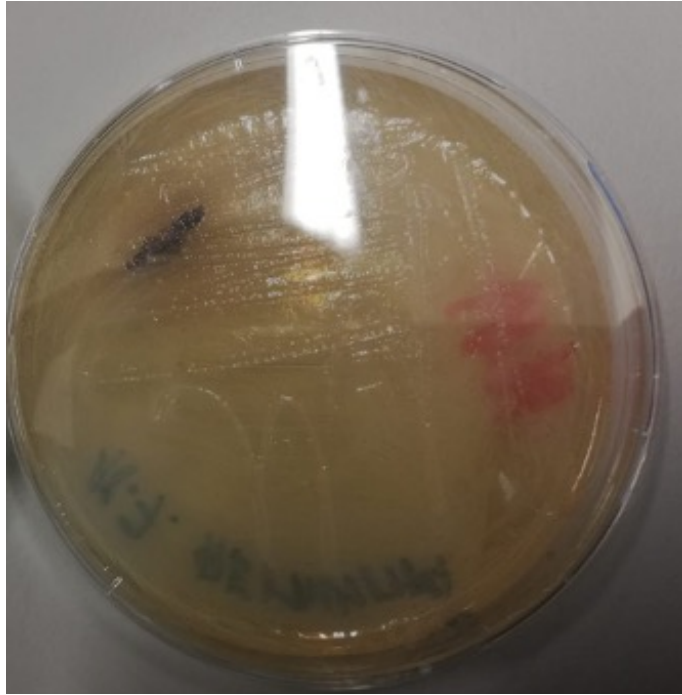
Larvy získané z komerčního chovu zjevně nevykazovaly známky optimální kondice srovnatelné s larvami odchovanými v laboratoři. Zakoupené larvy měly výrazně nižší pohyblivost, jejich barva byla oproti laboratorním larvám tmavší. Lze se tedy domnívat, že imunitní stav larev nebyl optimální a tento fakt mohl mít vliv i na výsledky samotného experimentu.

4.8.2 Postup:

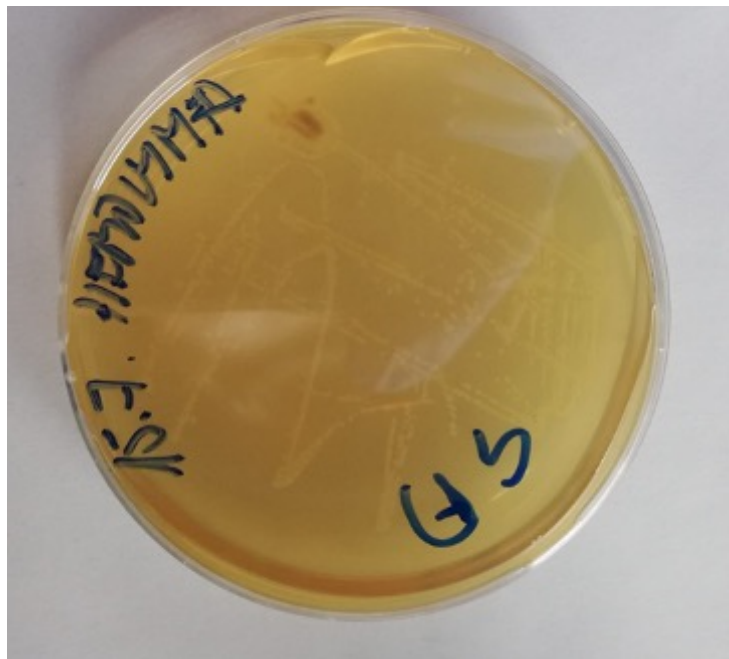
- proveden odběr hemolymfy ze tří komerčně dostupných larev (po cca 20 μ l hemolymfy na larvu do jedné eppendorf tuby)
- vortex vzorku
- reprezentativní vzorek o objemu 25 μ l byl přenesen na Müller Hintonův (Obr. 25) a Sabouradův agar (Obr. 26)
- proběhla inkubace po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v termostatu
- Po 24hodinové inkubaci byl hodnocen mikrobiální nárůst na Müller Hintonově a Sabouraudově agaru

Tabulka 6: Makroskopické znaky kolonií a mikroskopické nálezy v pozorovaných preparátech

Vzorek	Makroskopický popis kolonie	Mikroskopický popis kolonie
Č. 1: Müller-Hintonův agar	Hladká, světlá až průhledná, lesklá, mírně vypouklá	kokobacil
Č. 2: Sabouradův agar	Vypouklá texturovitá, bílá barva, matná	kokobacil, G-tyče (dominují)



Obr. 25: Nárůst mikroorganismů po 24hodinové kultivaci při teplotě 37 °C v reprezentativním vzorku hemolymfy (25 μ l), získaného z komerčně dostupných larev *Galleria mellonella* na Müller-Hintonově agaru.



Obr. 26: Nárůst mikroorganismů po 24hodinové kultivaci při teplotě 37 °C v reprezentativním vzorku hemolymfy (25 μ l), získaného z komerčně dostupných larev *Galleria mellonella* na Sabouradově agaru.



Obr. 27: Snímek obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie. Na snímku jsou zachyceny gram-negativní mikroorganismy tyčovitého tvaru. Pozorování probíhalo pomocí školního mikroskopu při celkovém zvětšení 1000×.

4.8.3 Závěr

Larvy z komerčně dostupného chovu se měly oproti larvám odchovaným v laboratoři viditelně horší kondici, jak je již zmíněno v úvodu této kapitoly. Lze se tedy domnívat, že imunitní stav larev nebyl optimální a tento fakt mohl mít vliv i na výsledky samotného experimentu. Důvodem šetření hemolymfy zakoupených larev bylo podezření, že hemolymfa samotná může být zdrojem mikrobiální kontaminace. Mikrobiální zátěž hemolymfy následně skutečně byla kultivačně i mikroskopicky prokázána. Na mikroskopickém snímku (Obr. 27) jsou patrné gram-negativní mikroorganismy, které ve vzorku rozhodně nebyly v zanedbatelném množství.

4.9 Hodnocení tvorby biofilmového společenství tvořeného kvasinkou *Candida albicans* v popáleninové ráně explantu kutikuly larvy *Galleria mellonella* z vlastního chovu

S ohledem na předchozí výsledky byly v rámci tohoto experimentu využity larvy z vlastního chovu. Médium, ve kterém byly explanty po dobu inkubace uchovávány, nebylo suplementováno hemolymfou. Pro infekci indukovaných ran bylo voleno inokulum o O.D. 0,5 a 0,5/ 10 McFarland.

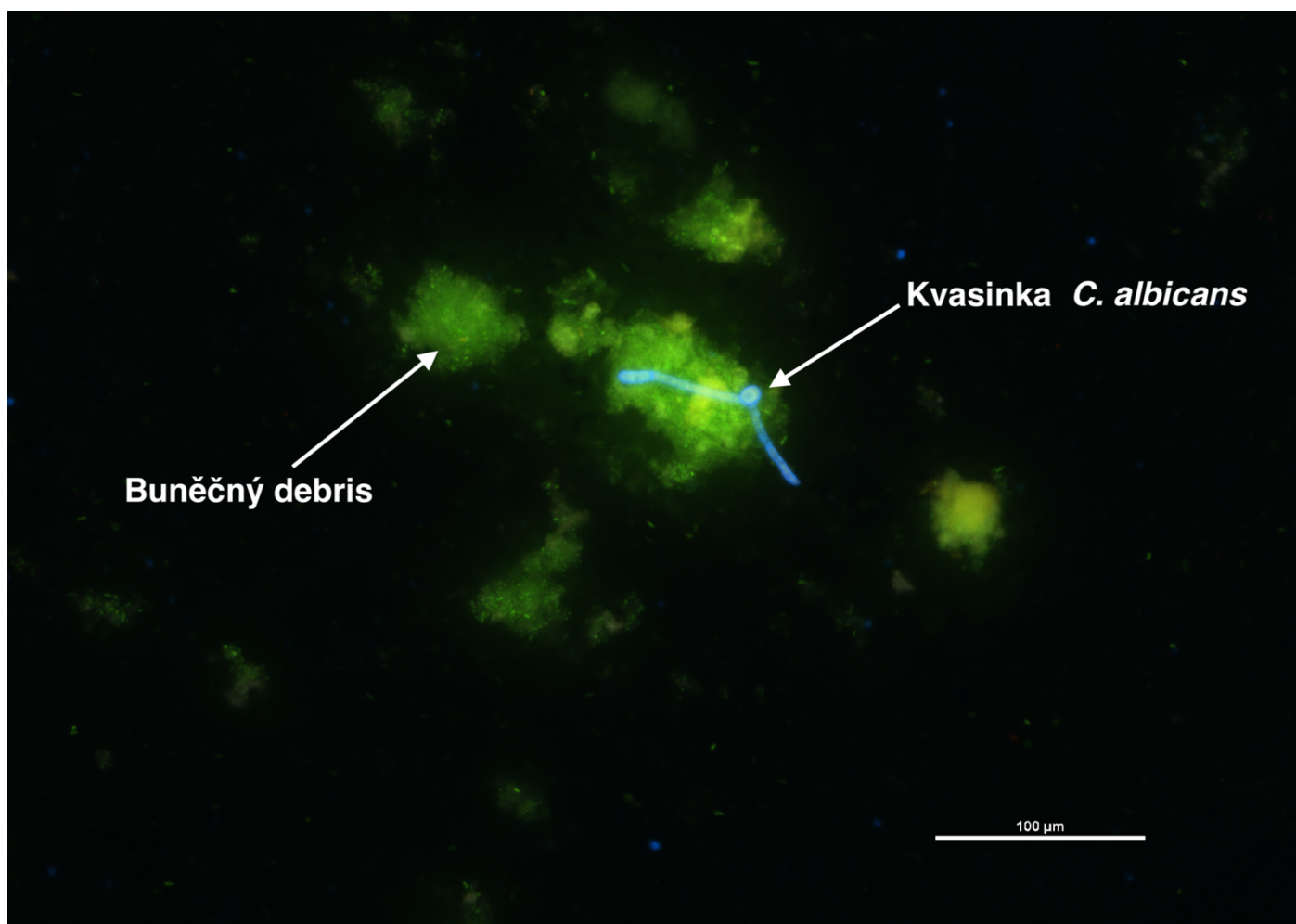
4.9.1 Postup

- bylo získáno 6 explantů ze dvou larev odchovaných v laboratorních podmínkách, explanty byly připraveny dle postupu viz. Kapitola 4.4. (Obr. 19)
- explanty byly drženy v „*air – liquid*“ fázi tvořené IPS médiem, inkubace probíhala po dobu 24/48 hodin
- po inkubaci byl proveden seškrab vzorku skalpelem do eppendorf tuby
- vzorek byl obarven dle postupu uvedeného v kapitole 4.7.2
- vzorek byl podroben mikroskopickému šetření viz. kapitola 4.7.2

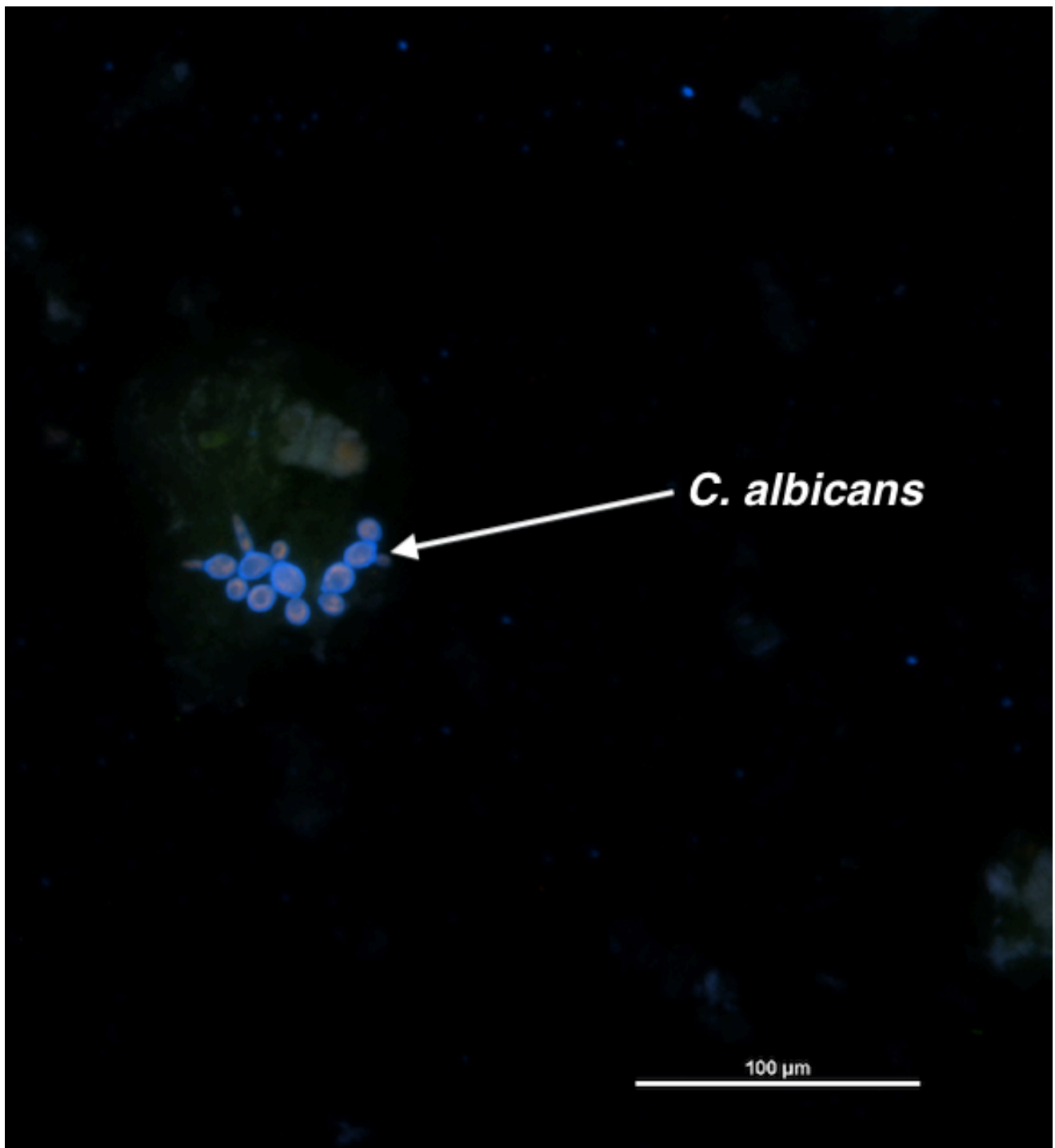
4.9.2 Hodnocení a výsledky

Zatímco v předchozím experimentu (formování biofilmového společenství v indukované ráně v tkáňových explantech získaných z komerčně dostupných larev) došlo k tvorbě pouhým okem pozorovatelné slizovité vrstvy, která by mohla vypovídat o tvorbě biofilmu, v tomto případě nebyla tvorba slizovité vrstvy evidentní.

V rámci mikroskopického šetření došlo pouze k nahodilému zaznamenání kvasinkových buněk. Jak je patrné z mikroskopických snímků, nedošlo k formování kvasinkového biofilmu. Na druhou stranu, pomocí mikroskopie nebyla zaznamenána mikrobiální kontaminace indukované rány.



Obr. 28: Mikroskopické šetření seškrabu z indukované popáleninové rány v explantu kutikuly larvy *Galleria melonella* vlastního chovu. Velikost infekčního inokula – 5 μ l, optická densita 0.5/10 McFarland, inkubace po dobu 24 hodin, při teplotě 37 °C. Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. Preparát barven pomocí Syto 9/ PI/ kalkofluorová běloba.



Obr. 29: Mikroskopické šetření seškrabu z indukované popáleninové rány v explantu kutikuly larvy *Galleria melonella* vlastního chovu. Velikost infekčního inokula – 5 μ l, optická densita 0.5 McFarland, inkubace po dobu 48 hodin, při teplotě 37 °C. Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. Preparát barven pomocí Syto 9/ PI/ kalkofluorová běloba.

4.10 Infekce indukovaných ran tkáňových explantů kvasinkou

Candida albicans - udržování explantů v médiu

suplementovaném glukózou

4.10.1 Pracovní hypotéza

V předešlém experimentu (kapitola 4.7.) bylo zjištěno, že suplementace média pro udržování explantů hemolymfou je nežádoucí, protože hemolymfa není oproti původnímu předpokladu sterilním biologickým materiálem. V navazujícím experimentu (kapitola 4.9) bylo zjištěno, že podmínky pro tvorbu kvasinkového biofilmu nejsou optimální. Nebyla zaznamenána tvorba biofilmu, proto proběhla v dalším kroku příprava explantů s následnou indukcí a infekcí popáleninových ran, s držením těchto explantů v IPS médiu suplementovaném glukózou.

K inserci explantů do média s obsahem glukózy bylo přistoupeno na základě poznatků, které ve svém textu zmiňují autoři Ende *et al.* 2019. V textu konkrétně popisují důležitost cukru pro kvasinky. Podle jejich poznatků má mít přítomnost cukru vliv na řadu atributů virulence, včetně adheze, odolnosti vůči oxidativnímu stresu, tvorby biofilmu, morfogeneze, invaze a tolerance k antifungálním lékům.

V tomto experimentu byly užity larvy odchované v rámci biologické laboratoře, Katedry biologických a lékařských věd.

Tabulka 3: Hmotnosti jednotlivých larev užitých v rámci experimentu

Larva. <i>G. mellonella</i>	Hmotnost
Č. 1	0, 580 g
Č. 2	0, 590 g
Č. 3	0, 600 g

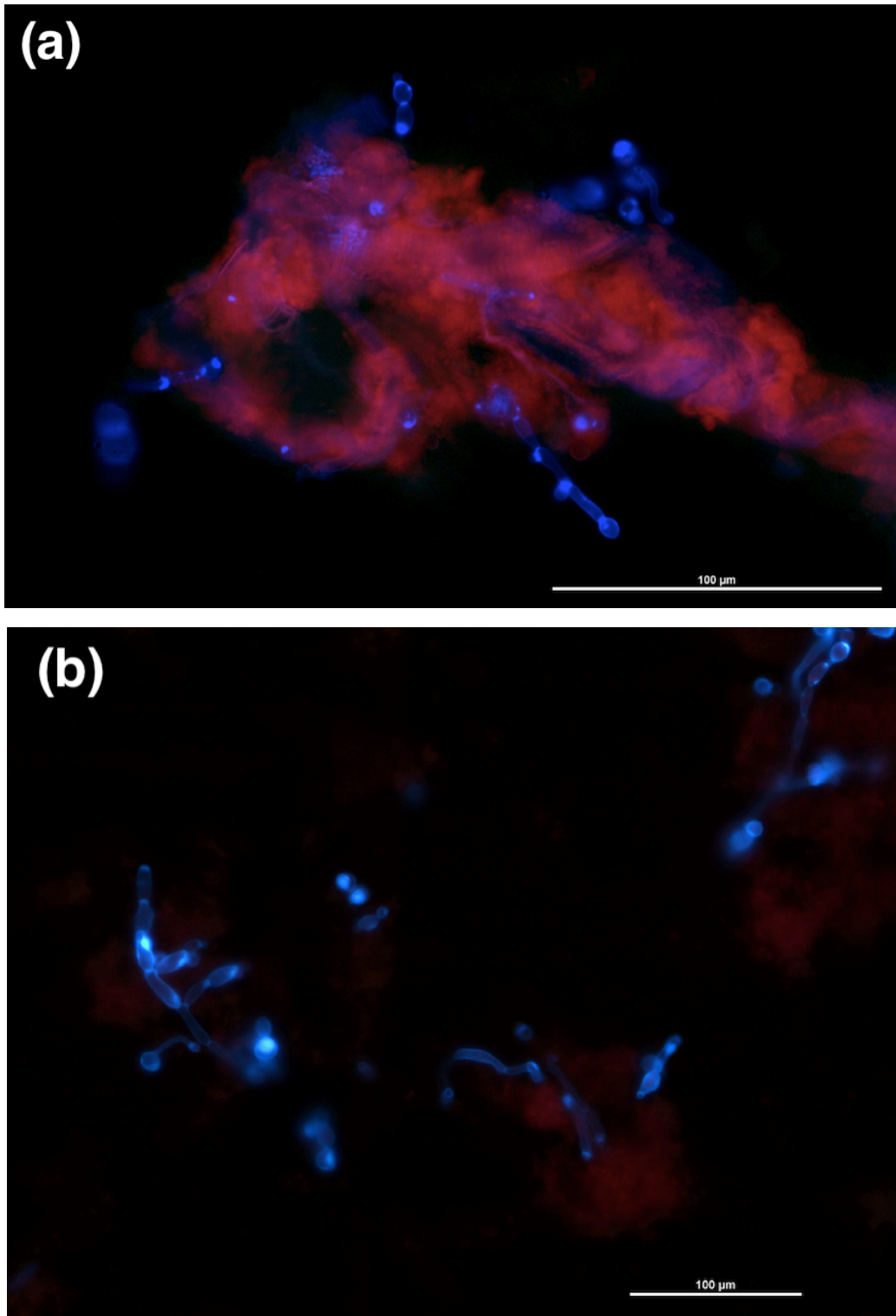
4.10.2 Postup

- explanty byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.
- infekce indukované rány – nanášeno infekční inokulum o objemu 5 μ l
- inkubace probíhala po dobu 96 hodin
- explanty byly kultivovány v „*air-liquid*“ interface (viz. kapitola 4.6.2) v médiu suplementovaném glukózou o cílové koncentraci 0, 1 mM a v IPS mediu bez suplementace
- po 24, 48 a 96hodinové inkubaci byl proveden seškrab a mikroskopické šetření, viz kapitola 4.7.2
- po 96hodinové inkubaci byly explanty kultivované v médiu bez glukózy (kontrolní explanty) a s glukózou homogenizovány:
 - homogenizace tkáňovým homogenizátorem, za přidání 1 ml fyziologického roztoku
 - následně byl proveden řádný vortex a byla provedena centrifugace pro odstranění tkáňového debrisu, a to při 200 \times g po dobu 2 minut, při 24°C
 - pro stanovení počtu mikrorganismů přítomných ve tkáňovém explantu bylo odebráno po 25 μ l supernatantu, ten se doplnil do objemu 1000 μ l fyziologickým roztokem, provedlo se ředění přenesením 100 μ l vzniklé suspenze do 900 μ l fyziologického roztoku
 - provedl se výsev po 50 μ l na příslušná media (Sabouradův a Müller-Hintonův agar) pomocí L-hokejky, výsev se provedl v duplikátu
 - následovalo mikroskopické pozorování, viz. Kapitola 4.7.2
- dále bylo provedeno šetření explantu inkubovaného 96 hodin v IPS suplementovaném glukózou světelnou mikroskopií, pro šetření byla volena metoda SSSB (*Standardized skin surface biopsy*)
 - explant byl vysušen na vzduchu
 - poté byla do indukované rány aplikována kapka kyanoakrylátu (sekundové lepidlo) a na explant se přiložilo podložní sklíčko
 - po jedné minutě se sklíčko strhlo a provedlo se mikroskopické šetření

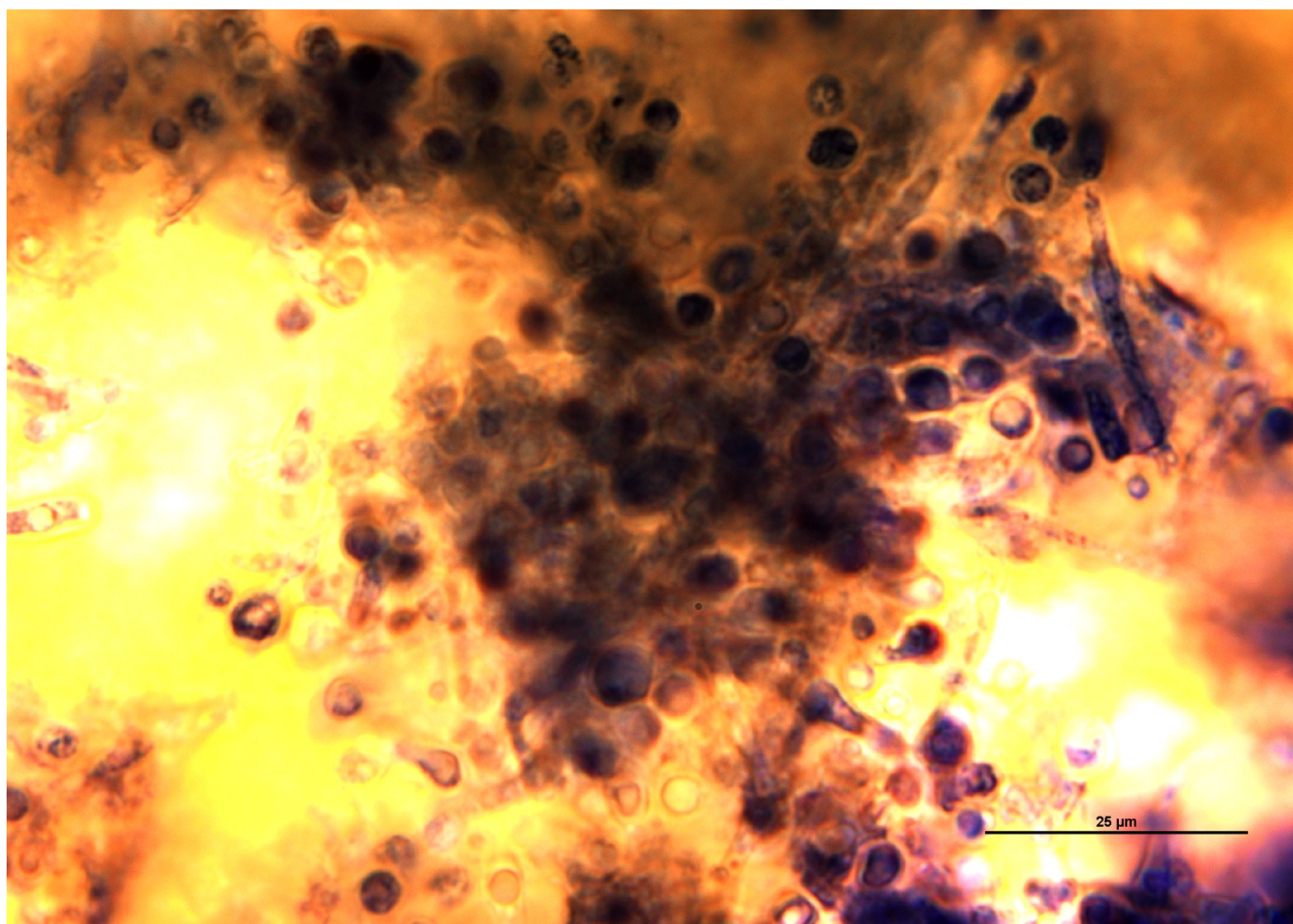
4.10.3 Hodnocení a závěr

Při šetření pouhým zrakem (přítomnost slizovité vrstvy) a mikroskopické šetření seškrabů z indukovaných infikovaných ran získaných po inkubaci 24, 48 a 96 hodin v mediu suplementovaném glukózou nebyla zaznamenána tvorba kvasinkového biofilmu. Ojedinele byly zaznamenány kvasinkové buňky, podobně jak je popsáno v kapitole 4.9. Stejně výsledky byly zaznamenány u kontrolních explantů (kultivace v IPS mediu bez suplementace glukózou).

Po šetření seškrabů byla provedena homogenizace tkáňových explantů a homogenát byl pozorován pomocí mikroskopu (Obr. 30). Při tomto šetření bylo odhaleno, že zatímco kvasinku lze zaznamenat jen zřídka v indukované ráně, v samotné tkáni explantu je robustně zastoupena, a to bez ohledu na to, zda explant byl inkubován v mediu bez či s glukózou. Tedy, na základě tohoto zjištění lze konstatovat, že kvasinka *C. albicans* využila své schopnosti invadovat do tkáně. Došlo k rozvoji invazivní kandidózy (více viz kapitola 3.3.2.1). Toto zjištění bylo podpořeno také šetřením infikovaného explantu s indukovanou popáleninou pomocí metody SSSB (Obr. 31).



Obr. 30: Mikroskopické šetření homogenátu tkáňového explantu s indukovanou popáleninou infikovanou kvasinkou *C. albicans*. Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem. Homogenát explantu kultivovaného v médiu bez suplementace glukózou (a), homogenát explantu kultivovaného v médiu suplementovaném glukózou (b) – kultivace po dobu 96 hodin při teplotě 37°C. Preparát barven Syto 9/ PI/ kalkofluorová běloba.



Obr. 31: Mikroskopické šetření invazivity kvasinky *C. albicans* do tkáňového explantu kutikuly larvy *G. mellonella* s indukovanou popáleninou (inkubace po dobu 96 hodin, při teplotě 37 ° C, v mediu suplementovaném glukózou). Snímek obrazu pořízený světelnou mikroskopií. Preparát byl připraven SSSB metodou.

4.11 Určení mikrobiální zátěže hemolymfy larev *Galleria mellonella* z vlastního odchovu a určení přítomnosti infekčního činitele, *C. albicans* po infekci indukovaných popáleninových ran v explantech larev z komerčního chovu

4.11.1 Pracovní hypotéza

Jak je popsáno v kapitole 3.1.6, ve tkáních larev *G. mellonella* a stejně tak i v hemolymfě je nutné počítat s přítomností mikrobioty. Na základě předchozích výsledků bylo zapotřebí zjistit, do jaké míry je zatížena hemolymfa odchovaných larev mikrobiotou. Dále je žádoucí provést šetření, zda v případě tkáňových explantů získaných z komerčního chovu, infikovaných kvasinkou *Candida albicans* (velikost infekčního inokula O.D. 1 McFarland), je po inkubaci infekční činitel přítomen v explantech.

4.11.2 Postup

Šetření hemolymfy:

- proběhl odběr vzorku hemolymfy od tří zástupců larev *G. mellonella* vlastního odchovu, odebráno po 20 μ l na larvu (viz kapitola 4.8.2)
- provedení výsevu reprezentativního vzorku hemolymfy (20 μ l) na Sabouradův a Müller Hintonův agar – rozetření pomocí L-hokejky
- 24/48hodinová inkubace v termostatu při teplotě 37 °C – makroskopické a mikroskopické hodnocení kolonií (viz kapitola 4.5.2.)

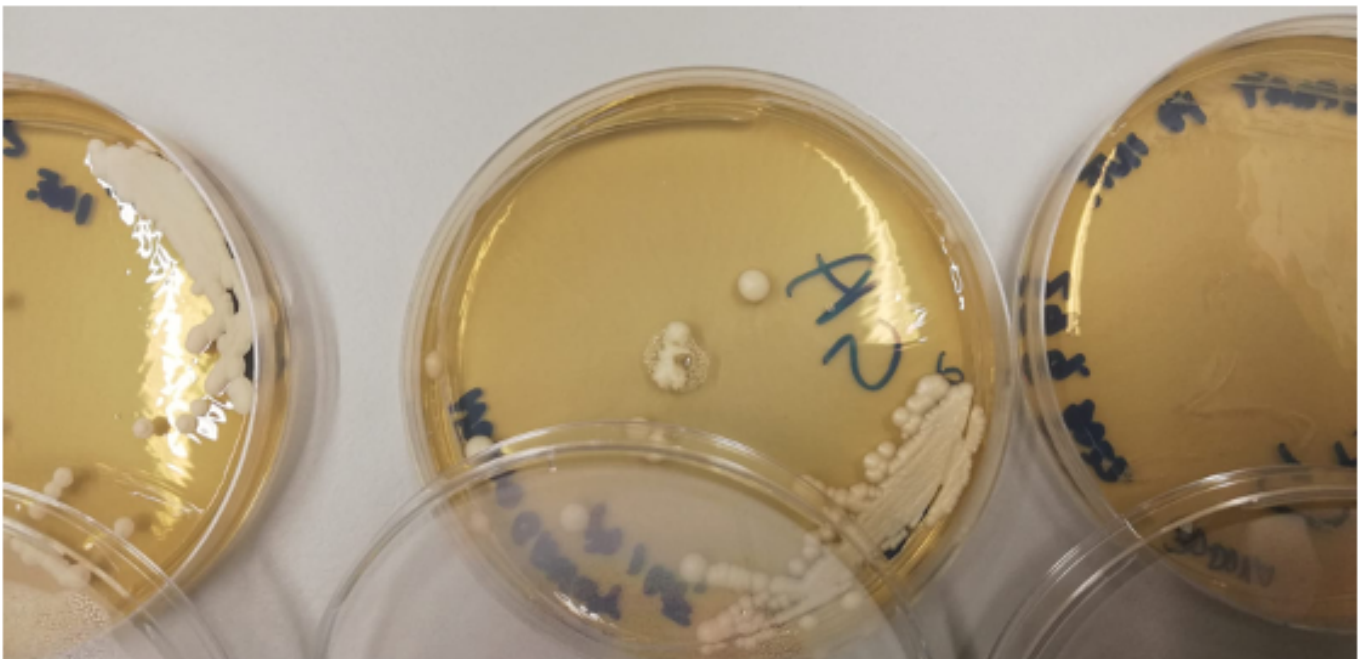
Šetření homogenátu tkáňového explantu:

- proběhla infekce a kultivace tkáňového explantu (viz kapitola 4.6.2)
- následovala příprava homogenátu tkáňového explantu s indukovanou a infikovanou popáleninou (infekce inokulem O.D. 1 McFarland, inkubace po dobu 24 hodin při 37 °C (viz kapitola 4.10.2)
- provedení výsevu reprezentativního vzorku homogenátu (20 μ l) na Sabouradův agar – rozetření pomocí L-hokejky
- inkubace v termostatu při teplotě 37 °C – makroskopické a mikroskopické hodnocení kolonií (viz kapitola 4.5.2)

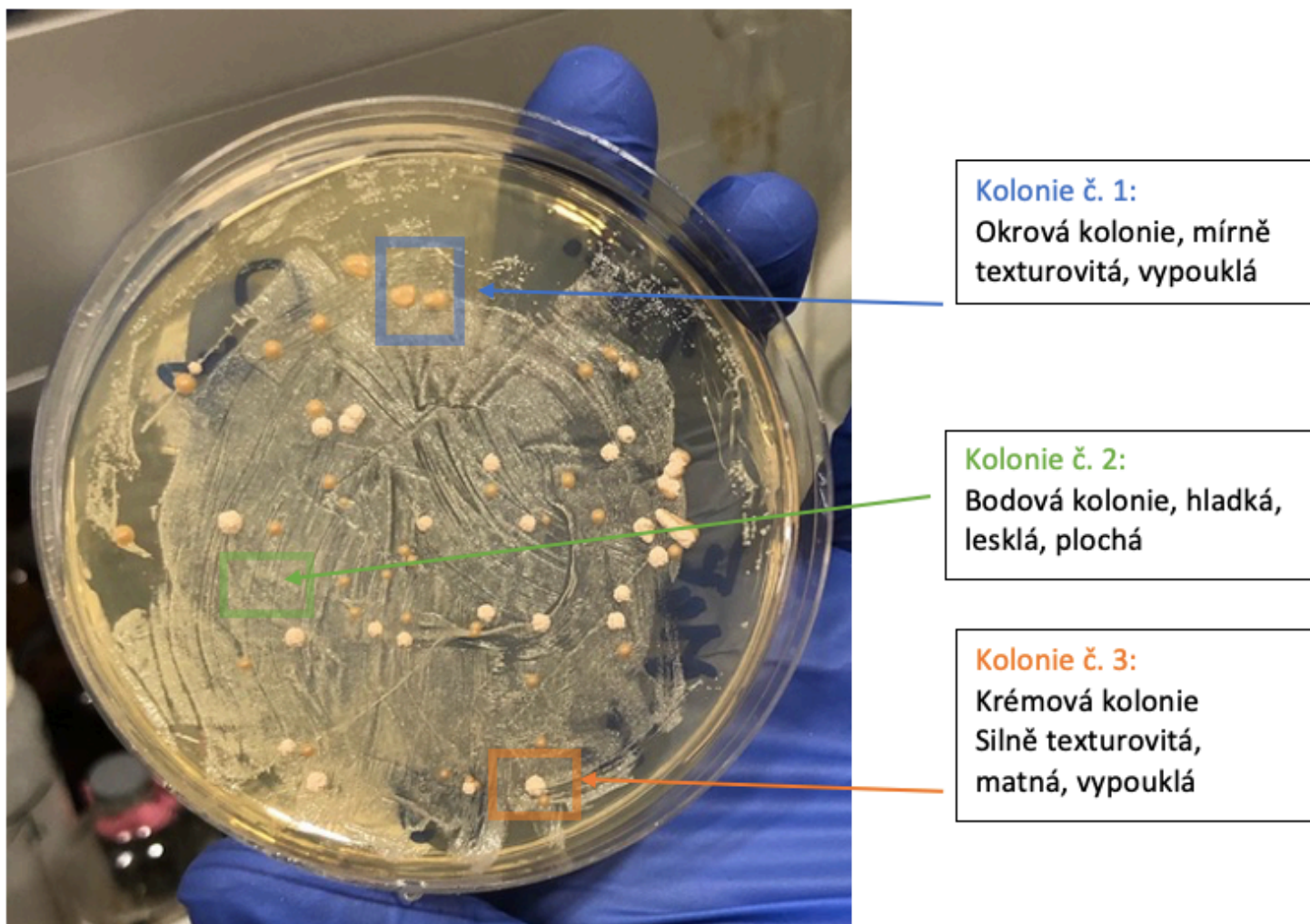
4.11.3 Hodnocení a závěr

V rámci subkultivace se zadařilo vykultivovat a pomnožit mikrobiální agens, zastoupené v rámci primokultivace pouze jednou kolonií. Na základě makromorfologických znaků (Obr. 32) a stejně tak mikroskopického šetření se s největší pravděpodobností jedná o eukaryotický organismus, kvasinku. Závěrem lze dovodit, že mikrobiální zatížení hemolymfy odchovaných larev je relativně zanedbatelné. S ohledem na to, že byl proveden výsev reprezentativního vzorku o objemu 20 μl , což přibližně odpovídá cca 22 % celkového objemu hemolymfy larvy, lze konstatovat, že v celkovém objemu hemolymfy odchované larvy je zastoupení mikrobiálních agens maximálně v desítkových řádech (3 kolonie odpovídají 22 % objemu hemolymfy, 100 % objemu odpovídá cca 14 kolonií), což je neporovnatelně méně, než bylo zaznamenáno u larev komerčně dostupných (viz kapitola 4.8.).

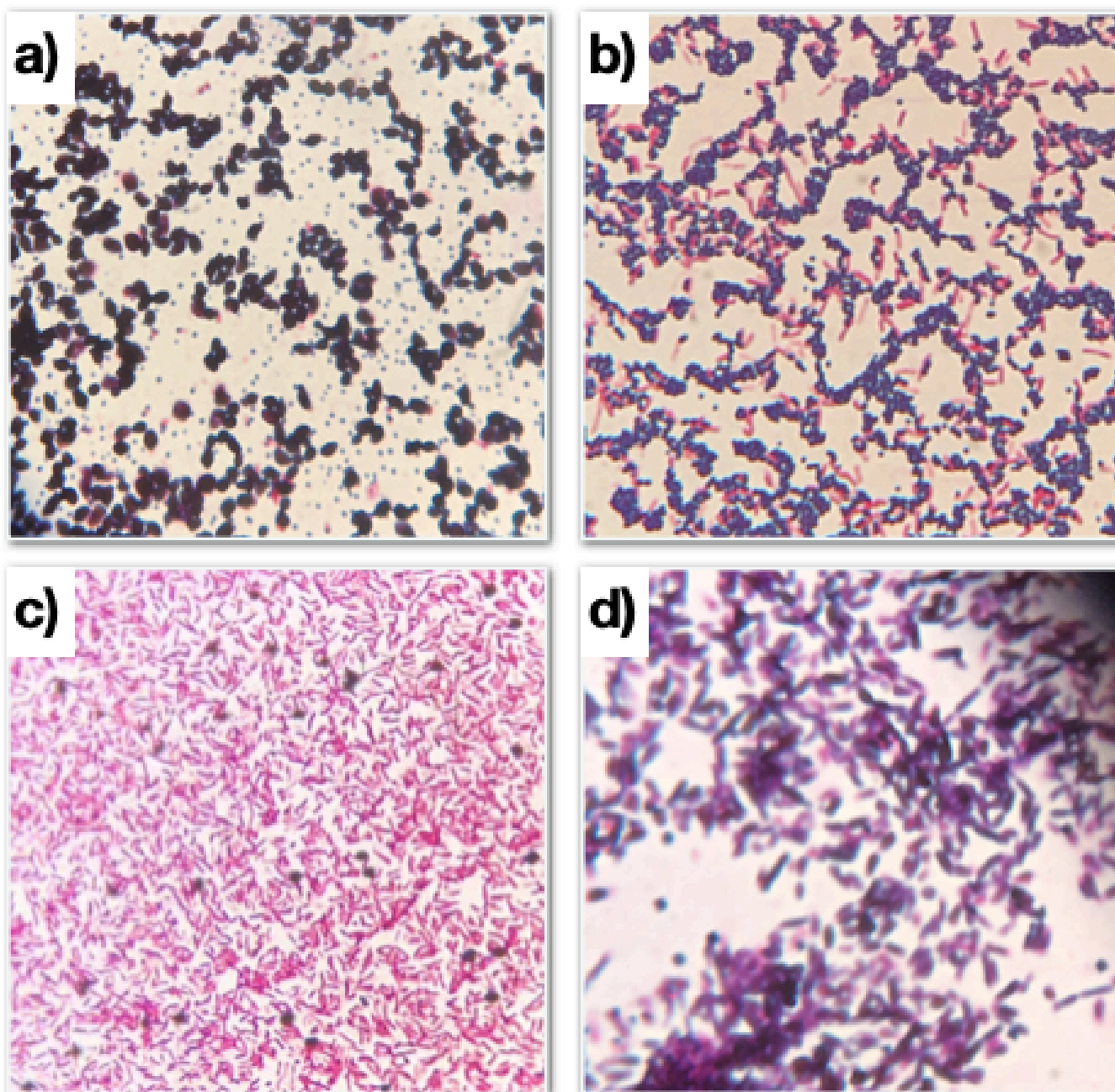
Po kultivaci reprezentativního vzorku získaného homogenizací infikovaného tkáňového explantu na Sabouradově agaru byly na základě makromorfologického šetření pozorovány cca tři různé typy kolonií (Obr. 33).



Obr. 32: Subkultivace mikrobiálního agens na Sabouradově agaru (inkubace 48 hodin při teplotě 37 °C).



Obr. 33: Kultivace mikrobiálních agens přítomných v homogenátu tkáňového explantu kutikuly larvy *G. mellonella* na Sabouraudově agaru (inkubace po dobu 70 hodin).



Obr. 34: Snímky obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie. Na snímku a) je zachycen nález v hemolymfě laboratorně odchované larvy. Další snímky (b-d) pak zachycují mikrobiální agens získané z homogenátu zakoupené larvy a následně kultivované na Sabouradově agaru. Snímek b) odpovídá kolonii č. 2 na Obr. 33, snímek c) odpovídá kolonii č. 1 na Obr. 33 a snímek d) odpovídá kolonii č. 3 na Obr. 33. Pozorování probíhalo pomocí školního mikroskopu při celkovém zvětšení 1000×.

4.12 Biochemické určení mikroorganismů nalezených v homogenátu infikovaných tkáňových explantů získaných z komerčně dostupných larev a hemolymfy odchovaných larev

4.12.1 Pracovní hypotéza

Biochemické testy mohou usnadnit bližší určení neznámého mikrobiálního agens, které je zastoupeno v hemolymfě odchovaných larev, či agens, které bylo přítomno v infikovaném explantu získaném z komerčně dostupných larev.

4.12.2 Postup

Katalázový test

- na podložní sklíčko se nanese kapka 3% peroxidu vodíku
- pomocí kličky se provedl stěr testované kolonie
- mikrobiální inokulum zachycené na kličce se přeneslo na sklíčko vedle peroxidu vodíku
- provedlo se smísení
- pozorovalo se, zda unikají, či neunikají bubliny

KOH test

- na podložní sklíčko se nanese 3% hydroxid draselný
- pomocí kličky se provedl stěr testované kolonie
- klička se ponořila do hydroxidu draselného na podložním sklíčku
- provedl se krouživý pohyb, byla snaha vytáhnout do výšky vlákno táhnoucí se za kličkou

Oxidázový test

- test se provedl pomocí indikačních papírků detekujících tvorbu enzymu cytochromoxidázy
- k vybrané kolonii se přiložil diagnostický proužek
- sledovala se změna zbarvení papírků (výrazně modré zbarvení)

4.12.3 Hodnocení a závěr

Pomocí biochemických testů, kam patří testování průkazu tvorby katalázy, cytochromoxidázy a také testu KOH, byly testovány kolonie získané výsevem homogenátu explantů (kolonie označené čísla 1–3 na Obr. 33) a výsevem hemolymfy.

Katalázový test poukazuje na přítomnost a tvorbu enzymu peroxidázy (katalázy) tvořené bakteriálním agens. V případě, že mikroorganismus tvoří enzym peroxidázu dochází po jeho kontaktu s peroxidem vodíku k uvolnění O₂, což se projevuje vznikem bublinek a je to bráno jako pozitivní výsledek. Kataláza je enzym, který je produkován mikroorganismy žijícími v okysličeném prostředí. Mezi kataláza pozitivní mikroorganismy patří tedy aerobní a fakultativně aerobní bakterie. Pozitivní výsledek poskytují například bakterie rodu *Staphylococcus*. Negativní výsledek poskytují například bakterie rodu *Streptococcus* (Chumchalová *et al.* 2019).

KOH test slouží k rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. U gramnegativních bakterií dochází k narušení tenčí peptidoglykanové vrstvy tvořící buněčnou stěnu. Po narušení buněčné stěny gramnegativních bakterií dochází ke vzniku lyzátu, projevující se jako viskózní suspenze, která se táhne za kličkou. Pozitivní výsledek tedy značí přítomnost gramnegativní bakterie (Kopecká *et Rotková* 2017)

Oxidázový test napomáhá identifikovat mikroorganismy, které mají schopnost vytvořit enzym cytochromoxidázu. Tento enzym je součástí bakteriálního transportního řetězce elektronů. K reakci se využívá redoxní činidlo tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid (napuštěné v indikátorovém papírku), které se při přechodu oxiduje na indofenoly a tímto přechodem na oxidovanou formu se zbarví modrou barvou. Pozitivní reakci dávají některé gramnegativní bakterie, např. bakterie rodu *Pseudomonas* nebo *Vibrio* (Chumchalová *et al.* 2019).

V následující Tabulce č. 8 jsou shrnuty výsledky jednotlivých testů.

Tabulka 8: Výsledky základních biochemických testů pro zběžné taxonomické zařazení mikrobiálních agens narostlých na Sabouradově agaru po výsevu vzorku homogenátu tkáňového explantu larvy *G. mellonella* a hemolymfy

Kolonie	Katalázový test	KOH test	Oxidázový test
č. 1 (okrová)	Negativní	Negativní	Negativní
č. 2 (bodová)	Negativní	Negativní	Negativní
č. 3 (Krémová)	Negativní	Negativní	Negativní
„hemolymfa“	Pozitivní	Pozitivní	Negativní

Na základě makromorfologických znaků a předešlých mikroskopických výsledků vycházel předpoklad, že kolonie č.1 by mohly být kvasinkou *C. albicans*, která do explantu získaného z komerčních larev po infekci invadovala. Nicméně, tento předpoklad se na základě biochemického testu nepotvrdil. Kvasinka *C. albicans* vykazuje pozitivní výsledek jak z katalázového, tak i oxidázového testu. Svoji roli ovšem mohla hrát i viabilita kvasinek *C. albicans*, k testování byly využity mikroorganismy kultivované po dobu 70 hodin (lze zaznamenat změnu barvy kolonií z původné bílé na okrovou).

Kolonie č. 2 (bodová, Obr. 33) by mohla být pravděpodobně bakterie rodu *Enterococcus*. Jedná se o acidotolerantní bakterie, které mohou růst na Sabouradově médiu, jak uvádí výrobce. Navíc, jak uvádí publikace autorů Johnston *et* Rolff 2015, enterokoky jsou dominantní složkou mikrobioty larev *G. mellonella*. Enterokoky patří mezi kataláza negativní, oxidáza negativní bakterie, což bylo detekováno i u mikrobů tvořících kolonii č. 2. na Obr. 33.

Kolonie č. 3 (krémová, obr. 3) pak by dle zběžného hodnocení mohla být na základě zběžné podobnosti makromorfologických znaků kvasinkou *Candida parapsilosis* nebo *Candida tropicalis*.

4.13 Bližší určení neznámého mikrobiálního agens, které tvoří součást mikrobioty komerčně dostupných larev *Galleria mellonella*

Tento experiment byl proveden bez mé přítomnosti mou školitelkou RNDr. K. Konečnou, Ph.D. a Ing. J. Vackovou. Výsledky však mají význam pro tuto práci, a tak je s jejich laskavým svolením dovoluji zahrnout a děkuji za jejich poskytnutí.

4.13.1 Pracovní hypotéza

V rámci snahy blíže určit mikrobiálního agens, u kterého jsme předpokládaly, zejména na základě výstupů z mikroskopie, že jde o kvasinku (jednalo se o kolonii č. 3, patrnou na Obr. 33) byl do šetření zařazen biochemický test – auxanogram a také kultivace na chromogenní půdě (CandiSelect). Důvodem pozornosti pro toto agens je skutečnost, že doposud v žádné dostupné publikaci se neobjevují informace o fungálních agens, které by mohly tvořit součást mikrobiomu larev *G. mellonella*. Publikovány jsou pouze informace týkající se bakteriálního mikrobiomu larev. Je třeba ale mít na paměti, že přítomnost charakterizovaného fungálního agens může být sdružena pouze s larvami odchovanými v rámci vlastního chovu.

4.13.2 Postup

Postup pro provedení auxanogramu:

- připravila se suspenze testovaného agens ve sterilní vodě o densitě 1,0 dle McFarlanda
- zásobní roztoky (YNB médium) suplementované různými cukry se naředily sterilní vodou v poměru 1:10 (provedla Ing. J. Vacková)
- z každého ředěného roztoku bylo odebráno po 0,9 ml a přidáno po 0,1 ml suspenze testovaného agens
- inkubace probíhala 24 a 48 h při 37 °C
- vyhodnotilo se, zda došlo k asimilaci příslušného cukru, hledala se shoda v interpretačních tabulkách.



Obr. 35: Vyhodnocení auxanogramu po 48 hodinách. Zaočkován byl neznámý mikrobiální kmen předpokládaného kvasinkového agens, získaný výsevem vzorku homogenátu z infikovaného explantu na Sabouradův agar. Hodnocen byl mikroorganismus, který vytvořil kolonie pod označením č. 3 na Obr. 33 Pomocí tohoto biochemického testu byla sledována asimilace cukrů, jmenovitě zleva: glukózy, laktózy, sacharózy, trehalózy, rhamnózy, xylózy, maltózy, galaktózy, arabinózy.

Fotografii poskytla RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Tabulka 9: Interpretace výsledků získaných z auxanogramu

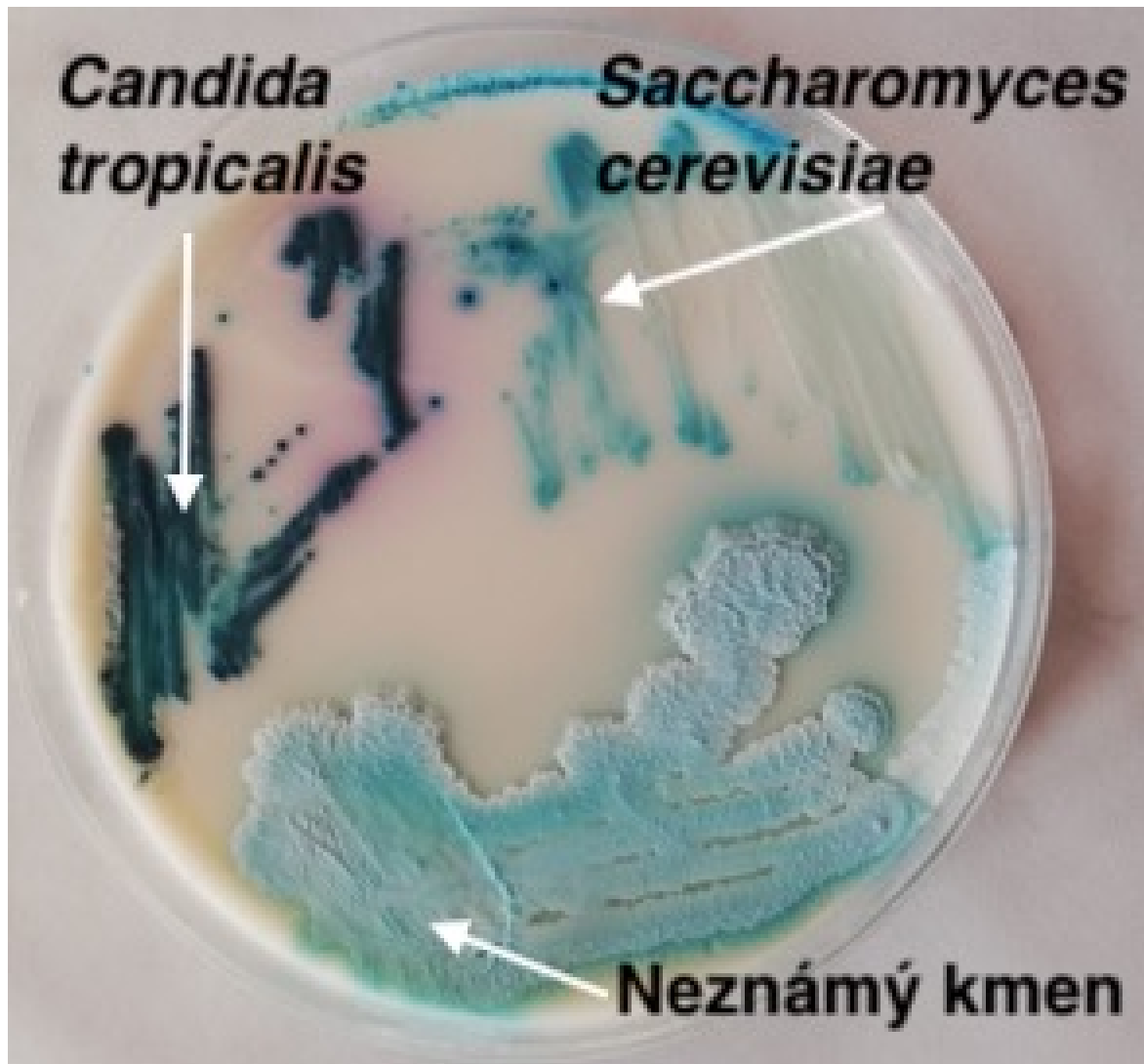
čas	Glu	Lak	Sach	Thrl	Rha	Xyl	Mal	Gal	Arb
24h	+	-	+	-	-	-	-	+	-
48h	+	-	+	+	-	-	-	+	-

Legenda: Glukóza (Glu), Laktózy (Lak), Sacharóza (Sach), Trehalóza (Thrl), Rhamnóza (Rha), Xylóza (Xyl), Maltóza (Mal), Galaktóza (Gal), Arabinóza (Arb); znaménko „+“ značí pozitivní nález, znaménko „-“ značí negativní nález

K interpretaci výsledků byla užita rovněž v tabulka komerčně dostupného kitu Api 20C, viz. <https://www.biomerieux.cz/produkty/apir>

Postup provedení kultivace na chromogenním médiu

- přeočkovala se testovaná kolonie na chromogenní médium CandiSelect
- přeočkoval se kmen *Candida tropicalis* a *Saccharomyces cerevisiae* na chromogenní medium CandiSelect (kontrolní kmeny)
- kultivovalo se při 37 °C po dobu 24 a 48 h, poté se provedlo pozorování makroskopických znaků a barvy kolonií



Obr. 36: Kultivace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *C. tropicalis* a neznámého agens na chromogenní půdě CandiSelect. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin při teplotě 37°C.

Fotografii poskytla RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

4.13.3 Hodnocení a závěr

Na základě biochemického testu – auxanogramu, dle interpretační tabulky asimilačního testu cukrů (Api C20) by se mohlo jednat o kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, či o agens *Prothotheca wickerhamii*. Nicméně, makromorfologické znaky kolonií neznámého testovaného agens na Sabouraudově médiu (květákovité kolonie) neodpovídají makromorfologickým znakům kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (hladké kolonie). Šetřením kultivací na chromogenní půdě bylo vyloučeno, že se jedná o kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, či kvasinku *C. tropicalis*, která vykazuje podobné makromorfologické znaky na Sabouradově agaru jako neznámý testovaný kmen.

Dle rešerše dostupné literatury makromorfologických znaků, kterých bylo dosaženo u našeho neznámého testovaného kmene tj, výrazně květákovitých útvarů (Obr. 33, kolonie č. 3) lze zaznamenat i při kultivaci řasy *Prototheca* spp. (Obr. 37). *Prototheca* spp. je eukaryotní, všudypřítomný mikroorganismus patřící mezi řasy čeledi *Chlorellaceae*. Jedná se o druh řasy, která žije převážně ve vodném prostředí a někteří její zástupci jsou spojováni s onemocněními vyvolanými u lidí i zvířat. U krav může tento mikroorganismus vyvolávat mastitidy, právě s tímto onemocněním skotu je spojována *Prototheca zopfii*. V současné době pro toto onemocnění není stanovena žádná účinná strategie léčby. Onemocnění se velmi často dostává do chronické formy s periodickým uvolňováním infekčních mikroorganismů a jediným řešením je pak utracení zvířat (Cremonesi *et al* 2022). U člověka se infekce mikroorganismem *Prototheca* spp. nevyskytuje příliš často. Jsou ale zaznamenány případy prototekózy získané v nemoci během chirurgických ortopedických zákroků. Infekce může nastat kontaminovanou vodou průnikem agens skrz poraněnou kožní bariéru. Byly již zaznamenány případy, kdy *Prototheca* spp. kolonizovala lidskou kůži, nehty, dýchací cesty a trávicí systém. Obecně lze říci, že k prototekálním infekcím jsou náchylnější imunosuprimovaní pacienti (Lass-Flörl *et* Mayr 2007).

Pokud v případě neznámého mikrobiálního kmene, izolovaného z tkáňových explantů larev *Galleria mellonella* jde skutečně o řasu rodu *Prototheca*, pak se jedná o dosud nepublikovaný *poznatek*. Přítomnost této řasy u larev *G. mellonella* v žádné nalezené literatuře není doposud popsána.



Obr. 37: Kolonie *Prototheca* na Sabouraudově agaru (16x). Kolonie po 48-72 hodinách inkubace o průměru 1.5-3 mm, světlé barvy, snadno rozeznatelné od jiných kolonií.

Převzato z Sorin *et al.* 2009 a upraveno

5 DISKUSE

Larva motýla *G. mellonella* je modelový organismus, který je stále častěji využíván v rámci vědecko-výzkumných studií. Důvodů pro využití toho modelu je hned několik. Jedná se například o to, že práce s tímto modelovým organismem nemusí být schvalována etickou komisí. Odchov larvy *G. mellonella* je poměrně nenáročný a ekonomicky není nijak zatěžující (Dinh *et al.* 2021, Pereira *et al.* 2020). V neposlední řadě je pak také značnou výhodou podobnost nespecifické buněčné imunity larvy a savčích modelů (Pereira *et al.* 2020).

Je možné najít řadu vědeckých prací, které se věnují formování *in vivo* biofilmu v rámci modelu larvy *G. mellonella*. Jeden z takových přístupů je popsán například v práci autorů Mannala *et al.* 2020. Jedná se o práci, kde je larvě *G. mellonella* implantován do distální části těla insert, na který byla nanášena bakteriální suspenze *Staphylococcus aureus* a následně bylo sledováno úspěšné formování biofilmu (Mannala *et al.* 2020).

Cílem této diplomové práce bylo formovat kvasinkový biofilm v popáleninové ráně, v tzv. *burn-wound*. V rámci rešerše byly nalezeny dvě práce, které se také zabývaly formováním biofilmu v indukované popáleninové ráně u modelového organismu *G. mellonella*. Obě tyto práce pracovaly v rámci tohoto modelu v režimu *in vivo*. Autory první studie jsou Maslova *et al.* 2020 a účelem jejich výzkumu bylo využití bezobratlého modelu *G. mellonella* namísto myšího modelu pro studium infekce popáleninových zranění. Právě při této studii byl pro výzkum popáleninové infekce poprvé využit bezobratlý modelový organismus, tedy larva *G. mellonella*. Pro infekci popáleninové rány autoři této studie zvolili následující bakteriální agens: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a *Acinetobacter baumannii*. Popáleninové zranění bylo provedeno na živé larvě zhruba ve střední části její dorsální oblasti, tato indukovaná rána byla následně infikována suspenzí zmíněných bakteriálních agens. Larvy byly inkubovány při teplotě 37 °C a monitorovány v čase 72-120 hodin. V průběhu tohoto experimentu se v čase zaznamenávala úmrtnost, byla monitorována melanizace larvy a ztráta hybnosti. V průběhu studie byl kladen důraz i na etické hledisko, larvy vykazující stres byly usmrceny chladem při teplotě -20 °C (Maslova *et al.* 2020).

Druhá studie, jejímiž autory jsou Figueiredo-Godoi *et al.* 2022, probíhala obdobně jako předchozí zmiňovaná studie. Opět byla užita živá larva *G. mellonella*, které bylo indukováno popáleninové zranění v dorzální oblasti, zde ovšem následoval ještě léčebný přístup v podobě ošetření fotosenzitizéry. Opět byl sledován a zaznamenáván stav larev v čase (Figueiredo-Godoi *et al.* 2022).

Obě výše zmíněné práce se zabývaly studiem indukovaných popáleninových zranění stejně jako tato práce. Značný rozdíl je ovšem v tom, že tyto práce volí experimentální režim *in vivo*, zatímco v rámci pilotních experimentů prováděných v této práci byla snaha o *ex vivo* zformování kvasinkového biofilmového společenství. Přístup pro zacházení se zvířecím experimentálním modelem byl tedy poněkud odlišný. Larva *G. mellonella* byla na úplném počátku experimentu usmrcena rychlou dekapitací a popáleninová zranění byla indukována až na explanty získané z kutikuly usmrcené larvy. Za zmínku určitě stojí to, že z jedné usmrcené larvy lze získat až tři explanty. To tedy v podstatě znamená, že namísto tří živých larev užívaných v rámci *in vivo* testování lze během *ex vivo* experimentů využít pouze jednu larvu. Z tohoto hlediska by se tedy *ex vivo* experiment dal vyhodnotit v konečném důsledku jako eticky přijatelnější a více naplňující model 3R. Je ovšem nutné zmínit, že určitým úskalím při práci s explanty a *ex vivo* systémy je jejich omezená viabilita. V případě, že se pracuje s živou larvou, v ráně se přirozeně tvoří exudát, což je fyziologický proces, který nastane ve chvíli, kdy dojde ke vzniku popáleniny. Nicméně na druhou stranu je třeba si uvědomit, že v případě hlubokých a rozsáhlých popálenin dochází rovněž k nekrotizaci tkání, které jsou pak ideální živnou půdou pro mikrobiální agens. Indukce a následná infekce popáleniny na živé larvy rovněž zohledňuje roli imunitního systému zvířete, který obecně často může sehrávat zcela klíčovou roli v interakci mezi hostitelem a patogenem. To ovšem režim *ex vivo* dovoluje jen s velkým omezením. Pro reflektování úlohy složek imunitního systému je třeba nastavit podmínky, které by dostatečně mimikovaly situaci *in vivo* o což se právě tato práce snažila.

Původním cílem tohoto pilotního experimentu mělo být *ex vivo* formování monodruhového biofilmu tvořeného kvasinkou *C. albicans* v indukované popáleninové ráně. K formování takového biofilmu v průběhu experimentů nedošlo. Kvasinka oproti původnímu očekávání volila cestu výrazného pronikání do tkáně v místě indukovaného popáleninového zranění. Došlo tedy k patogenezí, invazivní kandidóze tkáně. Náznaky formování biofilmu bylo možné zaznamenat pouze v okamžiku

kontaminace vzorku dalšími mikroorganismy. V daný okamžik ale nastávalo formování multidruhového biofilmu. Multidruhové biofilmy mají ovšem odlišné chování než monodruhové a jejich výzkum nebyl předmětem této práce. Kontaminace v průběhu experimentu nenastala z důvodu chybného postupu práce. Příčinou bylo, že na počátku se vycházelo z premisy, že hemolymfu larvy *G. mellonella* lze považovat za sterilní prostředí. Hemolymfa larvy *G. mellonella*, ale rozhodně sterilním prostředím není. V průběhu experimentů bylo zjištěno, že larva je osídlena různými mikroorganismy. To, že je vnitřní prostředí larvy osídleno mikrobiotou dokládá například i text autorů Allonius *et al.* 2019. Autoři tohoto textu popisují u larvy přítomnost několika prokaryotních mikroorganismů s dominujícími bakteriemi rodu *Enterococcus*. O tom, že larva *G. mellonella* je osídlena prokaryotní mikrobiotou se ve svém textu zmiňují i další autoři, patří mezi ně například Johnston *et Rolff* 2015, kteří opět zmiňují hlavně prokaryotní enterokoky. V podstatě všechny práce pojednávající o mikrobiotě larvy *G. mellonella*, které byly nalezené během rešerší, se zabývají pouze prokaryotními organismy. O to překvapivější byl v této práci nález buněk, které již dle velikosti patřily mezi eukaryotní organismy. Na počátku panovala domněnka, že by se mohlo jednat o kvasinky rodu *Saccharomyces*, které by mohly pocházet z krmiva larev. To, bylo ale postupně vyloučeno a dle zběžného šetření bylo zjištěno, že se jedná pravděpodobně o eukaryotní mikroorganismus – konkrétněji řasu z rodu *Prototheca*. Tato řasa je globálně rozšířena a žije převážně ve vod prostředí. Jsou ale známé i případy, kdy je původcem různých onemocnění u zvířat i lidí (Cremonesi *et al.* 2022). Jakým způsobem se tento eukaryotní mikroorganismus stal součástí mikrobioty modelové larvy *G. mellonella* není v tuto chvíli jasné, jako jedna z možností se nabízí, že jím mohlo být kontaminováno krmivo larev. Nelze ale vyloučit, že tento mikroorganismus není běžnou součástí mikrobioty larev, ale jde o potencionálně patogenní organismus, který se podílel na neoptimální kondici komerčně dostupných larev.

V podstatě všechny nalezené odborné práce, tedy i ty výše zmíněné, které se zabývají formováním monodruhového biofilmu pracující s larvou *G. mellonella*, jako by bylo jeho vnitřní prostředí sterilní a skutečnost, že tomu tak není je u všech těchto prací naprosto opomíjena. Ve světle aktuálních poznatků se ale modelový organismus *G. mellonella* nejeví v tuto chvíli jako optimální model pro formování monodruhových biofilmů, jelikož v důsledku přítomnosti přirozené mikrobioty v celém larválním těle, a

dokonce i v hemolymfě se nemůže s určitostí počítat se vznikem zamýšleného monodruhového biofilmu. Naskýtá se samozřejmě možnost, že by byly pro experimenty připraveny explanty jež by byly zbaveny veškeré mikrobioty, ale zde by bylo nutné ještě otestovat metodiku přípravy takových explantů, aby je bylo možné s jistotou považovat za sterilní.

6 ZÁVĚR

Tato práce měla na počátku v podstatě dva hlavní cíle. Prvním z nich byla optimalizace přípravy tkáňových explantů. Tyto explanty byly získávány z kutikul modelového organismu *G. mellonella* a sloužily pro následnou indukci popáleninových ran, na kterých měl být prováděn následný výzkum formování biofilmu. Druhým cílem pak bylo nastavení podmínek, při kterých nastane formování monodruhového biofilmu v indukované popáleninové ráně na explantu získaném z kutikuly larvy *G. mellonella*.

První cíl této práce je popsán v kapitole 4.4., kde je podrobně popsána metodika získávání tkáňových explantů (Obr. 19) a následná indukce popáleninových zranění. Povedlo se najít i způsob, jak získaný explant a následně ho uchovat po určitou dobu viabilní díky „*air-liquid*“ fázi (Obr. 21). Za zmínku k této fázi experimentu stojí fakt, že larvy motýla *G. mellonella* odchované v laboratorních podmínkách se jeví jako vhodnější pro přípravu explantů, než larvy zakoupené. Larvy odchované v laboratoři byly v lepší zdravotní kondici, a tudíž dorůstaly větších rozměrů, díky čemuž bylo možné z jedné larvy připravit až tři tkáňové explanty. To znamená, že jedna larva mohla být využita ke třem experimentům, což je v souladu s modelem 3R.

Druhý cíl této práce, tedy zformování monodruhového biofilmu tvořeného kvasinkou *C. albicans* na tkáňovém explantu, naplněn nebyl. Příčinou nezdaru zde byla na počátku chybná premisa, že vnitřní prostředí včetně modelového organismu *G. mellonella* je sterilní. Ukázalo se, že tomu tak není, larva obsahuje mikrobiotu a ta znemožnila kvasince *C. albicans* zformovat monodruhový biofilm. I přes to, že nebyl naplněn původní cíl tohoto pilotního experimentu, byl zjištěn jiný zajímavý poznatek. Tímto poznatkem bylo, že kvasinka *C. albicans* si namísto cesty formování biofilmu na povrchu indukované popáleniny zvolila cestu invazivní kandidózy, tedy cestu prorůstání do nitra tkáňového explantu (Obr. 31). Tato skutečnost by mohla být v budoucnu zohledněna právě při hledání látek, které působí na kvasinku *C. albicans* v případě invazivní kandidózy.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Seznam obrázků

Obr. 1: Jednotlivá vývojová stádia organismu <i>Galleria mellonella</i>	16
Obr. 2: Časová osa vývoje užití <i>G. mellonella</i>	18
Obr. 3: Shrnutí výhod nabízených modelovým organismem <i>Galleria mellonella</i>	19
Obr. 4: Schéma odchovu modelového organismu <i>Galleria mellonella</i>	21
Obr. 5: Analýza histologické sekce larvy <i>Galleria mellonella</i>	22
Obr. 6: Schématické znázornění anatomie larvy <i>Galleria mellonella</i>	23
Obr. 7: Srovnání IMD dráhy u hmyzu TNF- α dráhy u savců	26
Obr. 8: Schéma vzniku mikrobiálního biofilmu	32
Obr. 9: Srovnání vývojového cyklu biofilmového společenství a lišejníku	35
Obr. 10: Přehled možných oblastí projevům infekce vyvolané <i>C. albicans</i>	41
Obr. 11: Dva procesy, které zahrnuje invazivní kandidóza	42
Obr. 12: Schéma formování biofilmu kvasikou <i>Candida albicans</i>	43
Obr. 13: Indukce popáleniny a infekce u larvy <i>G. mellonella</i>	45
Obr. 14: Honeycomb destička	49
Obr. 15: Preparace larvy <i>Galleria mellonella</i>	54
Obr. 16: Per orální administrace barviva metodou „force – feeding“	55
Obr. 17: Preparace larvy <i>Galleria mellonella</i> po podání kontrastní látky	56
Obr. 18: Tkáňové explanty kutikuly larvy <i>Galleria mellonella</i>	58
Obr. 19: Znázornění postupu, který vedl k odstranění trávicí trubice	61
Obr. 20: Snímky obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie	63
Obr. 21: Schématické znázornění explantu umístěného v „air-liquid“ fázi	65

Obr. 22: Porovnání explantů po 24 h inkubaci a po 48 h inkubaci	66
Obr. 23: Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie	69
Obr. 24: Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie	70
Obr. 25: Nárůst mikroorganismů na Müller-Hintonově agaru	72
Obr. 26: Nárůst mikroorganismů na Sabouradově agaru	72
Obr. 27: Snímek obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie	73
Obr. 28: Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie	75
Obr. 29: Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie	76
Obr. 30: Snímek pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie	80
Obr. 31: Snímek obrazu pořízený světelnou mikroskopií (SSSB metoda)	81
Obr. 32: Subkultivace mikrobiálního agens na Sabouradově agaru	83
Obr. 33: Kultivace mikrobiálních agens na Sabouraudově agaru	84
Obr. 34: Snímky obrazu pořízeného pomocí světelné mikroskopie	85
Obr. 35: Vyhodnocení auxanogramu	90
Obr. 36: Kultivace kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na chromogenní půdě	91
Obr. 37: Kolonie <i>Prototheca</i> na Sabouraudově agaru	93

Seznam tabulek

Tabulka 1: Procentuální zastoupení jednotlivých složek biofilmové matrice	35
Tabulka 2: Mikrobiální kmeny užitá k experimentu	50
Tabulka 3: Hmotnosti jednotlivých larev <i>Galleria mellonella</i>	57
Tabulka 4: Výsledky výsevu	60
Tabulka 5: Výsledné nálezy	63
Tabulka 6: Makroskopické znaky kolonií a mikroskopické nálezy	71

Tabulka 7: Hmotnosti jednotlivých larev <i>Galleria mellonella</i>	77
Tabulka 8: Výsledky základních biochemických testů	88
Tabulka 9: Interpretace výsledků získaných z auxanogramu	90

Seznam grafů

Graf 1: Mapování růstu kvasinky <i>Candida albicans</i>	51
Graf 2: Mapování růstu bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	52

8 LITERATURA

ALLONSIUS, Camille Nina; BEECK, Wannes Van; BOECK, Ilke De; WITTOUCK, Stijn a LEBEER, Sarah. The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus*. Online. *Animal Microbiome*. 2019, roč. 1, č. 7. ISSN 2524-4671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0010-6>. [cit. 2023-02-12].

ARMBRUSTER, Catherine R. a PARSEK, Matthew R. New insight into the early stages of biofilm formation. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018, roč. 115, č. 17, s. 4317–4319. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1804084115>. [cit. 2023-02-16].

BALS, Robert, 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Online. *Respiratory Research*. 2000, roč. 1, č. 5. ISSN 1465-993X. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/rr25>. [cit. 2023-04-14].

BANVILLE, Nessa; BROWNE, Niall a KAVANAGH, Kevin, 2012. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. Online. *Virulence*. 2014, roč. 3, č. 6, s. 497-503. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.4161/viru.21972>. [cit. 2023-01-24].

BEDNÁŘ, Marek; FRAŇKOVÁ, Věra; SCHINDLER, Jiří; SOUČEK, Andrej a VÁVRA, Jiří. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996.

BOPARAI, Jaspreet Kaur a SHARMA, Pushpender Kumar. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. Online. *Protein & Peptide Letters*. 2020, roč. 27, č. 1, s. 4-16. ISSN 09298665. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.2174/0929866526666190822165812>. [cit. 2023-02-11].

Calcofluor White Stain. Online. Merck. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/18909>. [cit. 2023-04-12].

CERENIUS, Lage; LEE, Bok Luel a SÖDERHÄLL, Kenneth. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Online. *Trends in Immunology*. 2008, roč. 29, č. 6, s. 263–271. ISSN 14714906. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1016/j.it.2008.02.009>. [cit. 2023-08-12].

CREMONESI, Paola; MONISTERO, Valentina; MORONI, Paolo; BARBERIO, Antonio; ALMEIDA, Raul; LATORRE, Alejandra Andrea a CASTIGLIONI, Bianca. Detection Methods. Online. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2022, s. 457-468. ISBN 978-0-12-818767-8. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22977-6>. [cit. 2023-07-10].

ČEKANOVÁ, Luboslava a KOLÁŘ, Milan. Rezistence komunitních kmenů *Streptococcus agalactiae* k makrolidovým antibiotikům. Online. *Klinická farmakologie a farmacie Olomouc*. 2008, roč. 22, č. 2, s. 55–57. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/02/02.pdf>. [cit. 2023-02-27].

DINH, Hue; SEMENEC, Lucie; KUMAR, Sheemal S; SHORT, Francesca L a CAIN, Amy K.. Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. Online. *Pathogens and Disease*. 2021, roč. 79, č. 2. ISSN 2049-632X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab006>. [cit. 2023-01-22].

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Online. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, roč. 8, č. 9, s. 881-890. ISSN 1080-6040. Dostupné z: <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>. [cit. 2023-08-12].

DURIEUX, Marie-Fleur; MELLOUL, Élise; JEMEL, Sana; ROISIN, Lolita; DARDÉ, Marie-Laure; GUILLOT, Jacques; DANNAOUI, Éric a BOTTEREL, Françoise. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. Online. *Virulence*. 2021, roč. 12, č. 1, s. 818-834. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1893945>. [cit. 2023-08-12].

DUSHAY, Mitchell S. Insect hemolymph clotting. Online. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, roč. 66, č. 16, s. 2643–2650. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1007/s00018-009-0036-0>. [cit. 2023-02-04].

EVANS, L.V., 2000. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. Online. London: CRC Press, 2000. ISBN 9780429078743. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781482284157>. [cit. 2023-02-20].

FIGUEIREDO-GODOI, Livia M. A.; GARCIA, Maíra T.; PINTO, Juliana G.; FERREIRA-STRIXINO, Juliana; FAUSTINO, Eliseu Gabriel; PEDROSO, Lara Luise Castro a JUNQUEIRA, Juliana C. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Fotenticine and Methylene Blue on Planktonic Growth, Biofilms, and Burn Infections of *Acinetobacter baumannii*. Online. *Antibiotics*. 2022, roč. 11, č. 5. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050619>. [cit. 2023-03-12].

HALL-STOODLEY, Luanne a STOODLEY, Paul, 2009. Evolving concepts in biofilm infections. Online. *Cellular Microbiology*. 2009, roč. 11, č. 7, s. 1034-1043. ISSN 14625814. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>. [cit. 2023-02-27].

HALL, Clayton W. a MAH, Thien-Fah. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. Online. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017, roč. 41, č. 3, s. 276-301. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>. [cit. 2023-04-14].

HØIBY, Niels; CIOFU, Oana; JOHANSEN, Helle Krogh; SONG, Zhi-jun; MOSER, Claus et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Online. *International Journal of Oral Science*. 2011, roč. 3, č. 2, s. 55-65. ISSN 1674-2818. Dostupné z: <https://doi.org/10.4248/IJOS11026>. [cit. 2023-02-25].

HUSSAIN, Muzaffar; WILCOX, M.H. a WHITE, P.J.. The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. Online. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, roč. 104, č. 3-4, s. 191–208. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05867.x>. [cit. 2023-02-19].

CHAMPION, Olivia L.; WAGLEY, Sariqa a TITBALL, Richard W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. Online. *Virulence*. 2016, roč. 7, č. 7, s. 840-845. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1203486>. [cit. 2023-02-12].

CHUMCHALOVÁ, Jana; KUBAL, Martin a ŠÍR, Marek. *Praktická cvičení z enviromentální mikrobiologie*. Online. 3. rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. Dostupné z: https://uchop.vscht.cz/files/uzel/0011054/0062~~y0IMyk0qKMpPL0rM9fU_ujdAwcj_A0DLeyMDIQMFYT6GsMuXwwrzDawE.pdf?redirected. [cit. 2023-08-12].

IMLER, Jean-Luc a ZHENG, Liangbiao. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. Online. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004, roč. 75, č. 1, s. 18-26. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1189/jlb.0403160>. [cit. 2023-04-14].

INGRAO, F. a BELLI, N.. Il test della *Galleria mellonella* nello studio dell' attività antitubercolare dei tiosemicarbazoni [*Galleria mellonella* test in the study of the antituberculosis activity of thiosemicarbazones]. Online. *Lotta contro la tubercolosi*. 1951, roč. 21, č. 5-6, s. 282–287.

JAMAL, Muhsin; TASNEEM, Ufaq; HUSSAIN, Tahir a ANDLEEB, Saadia, 2015. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. Online. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, roč. 4, č. 3. ISSN 2320–3528. Dostupné z: <https://www.rroj.com/open-access/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections.pdf>. [cit. 2023-08-13].

JÍLEK, Petr, 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4822-1.

JOHNSTON, Paul R. a ROLFF, Jens. Host and Symbiont Jointly Control Gut Microbiota during Complete Metamorphosis. Online. *PLoS Pathogens*. 2015, roč. 11, č. 11. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1005246>. [cit. 2023-04-13].

JORJÃO, Adeline L.; OLIVEIRAA, Luciane D.; SCORZONIA, Liliana; FIGUEIREDO-GODOIA, Lívia Mara A.; PRATA, Marcia Cristina A.; JORGE, Antonio Olavo C. a JUNQUEIRA, Juliana C. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. Online. *Virulence*. 2018, roč. 9, č. 1, s. 383–389. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>. [cit. 2023-04-14].

JUNQUEIRA, Juliana Campos. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Online. *Virulence*. 2012, roč. 3, č. 6, s. 474-476. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/viru.22493>. [cit. 2023-04-14].

KAVANAGH, Kevin a SHEEHAN, Gerard. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. Online. *Journal of Fungi*. 2018, roč. 4, č. 3. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.3390/jof4030113>. [cit. 2023-04-13].

KITTNAR, Otomar, et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s, 2011. 800 s.

KLEINO, Anni a SILVERMAN, Neal. The Drosophila IMD pathway in the activation of the humoral immune response. Online. *Developmental & Comparative Immunology*. 2014, roč. 42, č. 1, s. 25-35. ISSN 0145305X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.014>. [cit. 2023-01-28].

KONEČNÁ, Klára; NĚMEČKOVÁ, Ivana; DIEPOLTOVÁ, Adéla; VEJSOVÁ, Marcela a JANDŮUREK, Ondřej, 2021. The Impact of Cultivation Media on the *In Vitro* Biofilm Biomass Production of *Candida* spp. Online. *Current Microbiology*. 2021, roč. 78, č. 5, s. 2104-2111. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02452-6>. [cit. 2023-02-13].

KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. *Úvod do identifikace bakterií, biochemické testy a standardizované identifikační systémy*. Online. SKRIPTA KE CVIČENÍ z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie – Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/identifikace_bakterii.html. [cit. 2023-06-02].

KWADHA, Charles A.; ONG'AMO, George O.; NDEGWA, Paul N.; RAINA, Suresh K. a FOMBONG, Ayuka T.. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. Online. *Insects*. 2017, roč. 8, č. 2. ISSN 2075-4450. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.3390/insects8020061>. [cit. 2023-01-16].

LASS-FLÖRL, Cornelia a MAYR, Astrid, 2007. Human Protothecosis. Online. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007, roč. 20, č. 2, s. 230-242. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-06>. [cit. 2023-07-10].

LI, Jiahui a ZHAO, Xihong, 2020. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 137. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodres.2020.109742>. [cit. 2023-02-24].

LOPES, José Pedro a LIONAKIS, Michail S., 2022. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. Online. *Virulence*. 2022, roč. 13, č. 1, s. 89-121. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>. [cit. 2023-02-28].

MARÓTI, Gergely; KERESZT, Attila; KONDOROSI, Éva a MERGAERT, Peter. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Online. *Research in Microbiology*. 2011, roč. 162, č. 4, s. 363-374. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1016/j.resmic.2011.02.005>. [cit. 2023-04-14].

MASLOVA, Evgenia; SHI, Yejiao; SJÖBERG, Folke; AZEVEDO, Helena S.; WAREHAM, David W. a MCCARTHY, Ronan R. An Invertebrate Burn Wound Model That Recapitulates the Hallmarks of Burn Trauma and Infection Seen in Mammalian Models. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2020.00998>. [cit. 2023-03-12].

MAYER, François L.; WILSON, Duncan a HUBE, Bernhard, 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Online. *Virulence*. 2013, roč. 4, č. 2, s. 119-128. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.4161/viru.22913>. [cit. 2023-02-28].

MÉNARD, Guillaume; ROUILLON, Astrid; CATTOIR, Vincent a DONNIO, Pierre-Yves, 2021. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, roč. 11. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>. [cit. 2023-01-16].

MIKULAK, Ewa; GLINIEWICZ, Aleksandra; PRYGODZKA, Marta a SOLECKA, Jolanta. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegląd epidemiologiczny*. 2018, roč. 72, č. 1, s. 57–73.

MILLER, Melissa B. a BASSLER, Bonnie L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Online. *Annual Review of Microbiology*. 2011, roč. 55, č. 1, s. 165-199. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>. [cit. 2023-04-13].

MORELLINI, M. a AVEGNO, R. P. Farmaci antimicotici valutati con il test della *Galleria mellonella* [Antimycotic drugs evaluated with the *Galleria mellonella* test]. *Ann Ist Carlo Forlanini*. 1957, roč. 17, č. 2, s. 149–54. Italian. PMID: 13470618.

MUKHERJEE, Sampriti a BASSLER, Bonnie L., 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Online. *Nature Reviews Microbiology*. 2019, roč. 17, č. 6, s. 371-382. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>. [cit. 2023-02-24].

OTTO, Michael, 2013. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. Online. *Annual Review of Medicine*. 2013, roč. 64, č. 1, s. 175-188. ISSN 0066-4219. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>. [cit. 2023-04-14].

PANG, Zheng; RAUDONIS, Renee; GLICK, Bernard R.; LIN, Tong-Jun a CHENG, Zhenyu. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Online. *Biotechnology Advances*. 2019, roč. 37, č. 1, s. 177-192. ISSN 177-192. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>. [cit. 2023-02-27].

PAPPAS, Peter G.; LIONAKIS, Michail S.; ARENDRUP, Maiken Cavling; OSTROSKY-ZEICHNER, Luis a KULLBERG, Bart Jan, 2018. Invasive candidiasis. Online. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018, roč. 4, č. 1. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>. [cit. 2023-02-28].

PARSEK, Matthew R. a GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Online. *Trends in Microbiology*. 2005, roč. 13, č. 1, s. 27-33. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>. [cit. 2023-02-24].

PARSEK, Matthew R. a SINGH, Pradeep K. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. Online. *Annual Review of Microbiology*. 2003, roč. 57, č. 1, s. 677-701. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>. [cit. 2023-02-25].

PARSLOW, Ben Y. a THORNTON, Christopher R., 2022. Continuing Shifts in Epidemiology and Antifungal Susceptibility Highlight the Need for Improved Disease Management of Invasive Candidiasis. Online. *Microorganisms*. 2022, roč. 10, č. 6. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061208>. [cit. 2023-02-28].

PELEG, Anton Y.; JARA, Sebastian; MONGA, Divya; ELIOPOULOS, George M.; MOELLERING, Robert C. a MYLONAKIS, Eleftherios. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009, roč. 53, č. 6, s. 2605-2609. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.01533-08>. [cit. 2023-04-12].

PENESYAN, Anahit; PAULSEN, Ian T.; KJELLEBERG, Staffan a GILLINGS, Michael R.. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. Online. *Npj Biofilms and Microbiomes*. 2021, roč. 7, č. 1. ISSN 2055-5008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2>. [cit. 2023-02-16].

PEREIRA, Monalessa Fábila a ROSSI, Ciro César, 2020. Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. Online. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2020, roč. 128, č. 12, s. 607-620. ISSN 0903-4641. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/apm.13082>. [cit. 2023-02-16].

PEREIRA, Monalessa Fábila; ROSSI, Ciro César; DA SILVA, Giarlã Cunha; ROSA, Jéssica Nogueira a BAZZOLLI, Denise Mara Soares. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. Online. *Pathogens and Disease*. 2020, roč. 78, č. 8. ISSN 2049-632X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa056>. [cit. 2023-02-18].

PEREIRA, R.; SANTOS FONTENELLE, R.O.; BRITO, E.H.S. a MORAIS, S.M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2021, roč. 131, č. 1, s. 11-22. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.14949>. [cit. 2023-02-28].

PIATEK, Magdalena; SHEEHAN, Gerard a KAVANAGH, Kevin. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying *in vivo* activity of conventional and novel antimicrobial agents. Online. *Pathogens and Disease*. 2020, roč. 78, č. 8. ISSN 2049-632X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa059>. [cit. 2023-02-28].

POLOVÁ, Dominika. *Galleria mellonella in vivo* model pro studium interakce antimikrobiální látka vs. Patogen. Hradec Králové 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Klára KONEČNÁ. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/1900/discover>. [cit. 2023-08-14].

POZO, Jose Luis Del. Biofilm-related disease. Online. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2017, roč. 16, č. 1, s. 51-65. ISSN 1478-7210. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>. [cit. 2023-02-24].

RABIN, Nira; ZHENG, Yue; OPOKU-TEMENG, Clement; DU, Yixuan; BONSU, Eric a SINTIM, Herman O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Online. *Future Medicinal Chemistry*. 2015, roč. 7, č. 4, s. 493-512. ISSN 1756-8919. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>. [cit. 2023-02-27].

RAPUNTEAN, Sorin; RAPUNTEAN, Gheorghe; FIT, Nicodim Iosif; CUC, Cosmina a NADAS, George. Morphological and Cultural Characterization of some Strains of Unicellular Algae of the Genus *Prototheca* Sampled from Mastitic Cow Milk. Online. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2009, roč. 37, č. 1, s. 31-40. ISSN 1842-4309. Dostupné z: <https://doi.org/10.15835/nbha3713091>. [cit. 2023-08-13].

RATCLIFFE, N.A. a WALTERS, Julia B., 1983. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: Clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. Online. *Journal of Insect Physiology*. 1983, roč. 29, č. 5, s. 407-415.

ISSN 00221910. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90068-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90068-9). [cit. 2023-08-13].

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep a MANDAL, Manabendra, 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021, roč. 52, č. 4, s. 1701-1718. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>. [cit. 2023-02-15].

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep a MANDAL, Manabendra, 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021, roč. 52, č. 4, s. 1701-1718. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>. [cit. 2023-02-16].

RILEY, P.A. Melanin. Online. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997, roč. 29, č. 11, s. 1235-1239. ISSN 13572725. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7). [cit. 2023-02-06].

RUTHERFORD, S. T. a BASSLER, B. L., 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, roč. 2, č. 11, s. a012427-a012427. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>. [cit. 2023-04-14].

SERRANO, Isa; VERDIAL, Cláudia; TAVARES, Luís a OLIVEIRA, Manuela, 2023. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. Online. *Antibiotics*. 2023, roč. 12, č. 3. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030505>. [cit. 2023-04-14].

SHEEHAN, Gerard; GARVEY, Amy; CROKE, Michael a KAVANAGH, Kevin. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? Online. *Virulence*. 2018, roč. 9, č. 1, s. 1625-1639. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>. [cit. 2023-01-27].

SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4771-2.

SINGKUM, Pantira; SUWANMANEE, San; PUMEEESAT, Potjaman a LUPLERTLOP, Natthanej, 2019. A powerful *in vivo* alternative model in scientific

research: *Galleria mellonella*. Online. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2019, roč. 66, č. 1, s. 31-55. ISSN 1217-8950. Dostupné z: <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>. [cit. 2023-01-22].

SMISSMAN, Edward E.; BECK, Standley D. a BOOTS, Marvin R.. Growth Inhibition of Insects and a Fungus by Indole-3-Acetonitrile. Online. *Science*. 1961, roč. 133, č. 3451, s. 462. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.133.3451.462>. [cit. 2023-02-24].

SMITH, Thomas L. GENETICAL STUDIES ON THE WAX MOTH GALLERIA MELLONELLA LINN. Online. *Genetics*. 1938, roč. 23, č. 1, s. 115-137. ISSN 1943-2631. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/genetics/23.1.115>. [cit. 2023-04-07].

SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite a LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2014, roč. 18, s. 96-104. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>. [cit. 2023-02-24].

STIEFEL, Philipp; SCHMIDT-EMRICH, Sabrina; MANIURA-WEBER, Katharina a REN, Qun. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. Online. *BMC Microbiology*. 2015, roč. 15, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>. [cit. 2023-07-10].

SUTHERLAND, Ian W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Online. *Microbiology*. 2001, roč. 147, č. 1, s. 3-9. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>. [cit. 2023-02-20].

SZOMOLAY, Barbara; KLAPPER, Isaac; DOCKERY, Jack a STEWART, Phil S.. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. Online. *Environmental Microbiology*. 2005, roč. 7, č. 8, s. 1186-1191. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00797.x>. [cit. 2023-02-26].

TOLKER-NIELSEN, Tim; GHANNOUM, Mahmoud; PARSEK, Matthew; WHITELEY, Marvin a MUKHERJEE, Pranab. Biofilm Development. Online. *Microbiology Spectrum*. 2015, roč. 3, č. 2, s. MB-0001-2014. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>. [cit. 2023-02-26].

TSAI, Catherine Jia-Yun; LOH, Jacelyn Mei San a PROFT, Thomas. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Online. *Virulence*. 2016, roč. 7, č. 3, s. 214-229. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>. [cit. 2023-01-30].

TSUI, Christina; KONG, Eric F.; JABRA-RIZK, Mary Ann a MOBLEY, Harry. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. Online. *Pathogens and Disease*. 2016, roč. 74, č. 4. ISSN 2049-632X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>. [cit. 2023-02-28].

VALENTINI, Martina a FILLOUX, Alain. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, roč. 291, č. 24, s. 12547-12555. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>. [cit. 2023-04-14].

VAN ENDE, Mieke; WIJNANTS, Stefanie a VAN DIJCK, Patrick. Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2019, roč. 10. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00099>. [cit. 2023-04-16].

VESTBY, Lene K.; GRØNSETH, Torstein; SIMM, Roger a NESSE, Live L.. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. Online. *Antibiotics*. 2020, roč. 9, č. 2. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>. [cit. 2023-02-24].

VILMOS, Péter a KURUCZ, Éva. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Online. *Immunology Letters*. 1998, roč. 62, č. 2, s. 59-66. ISSN 01652478. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00023-6). [cit. 2023-01-30].

WALL, Gina; MONTELONGO-JAUREGUI, Daniel; VIDAL BONIFACIO, Bruna; LOPEZ-RIBOT, Jose L. a UPPULURI, Priya. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, roč. 52, s. 1-6. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001>. [cit. 2023-02-28].

WOJDA, Iwona, 2017. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Online. *Insect Science*. 2017, roč. 24, č. 3, s. 342-357. ISSN 16729609. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>. [cit. 2023-01-16].

WOJDA, Iwona; STANIEC, Bernard; SUŁEK, Michał a KORDACZUK, Jakub. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. Online. *Pathogens and Disease*. 2020, roč. 78, č. 9. ISSN 2049-632X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa057>. [cit. 2023-01-22].

YANG, De; CHEN, Qian; SCHMIDT, Albert P.; ANDERSON, G. Mark; WANG, Ji Ming; WOOTERS, Joseph; OPPENHEIM, Joost J. a CHERTOV, Oleg. LI-37, the Neutrophil Granule–And Epithelial Cell–Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor–Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. Online. *Journal of Experimental Medicine*. 2000, roč. 192, č. 7, s. 1069-1074. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>. [cit. 2023-04-14].

ZINK, Daniele; CHUAH, Jacqueline Kai Chin a YING, Jackie Y.. Assessing Toxicity with Human Cell-Based *In Vitro* Methods. Online. *Trends in Molecular Medicine*. 2020, roč. 26, č. 6, s. 570-582. ISSN 14714914. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.008>. [cit. 2023-04-12].