KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 71 **2022**
Numer 3 **(336)**
Strony **203-213**

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

BARTŁOMIEJ IWAŃSKI, MARIOLA ANDREJKO

Katedra Immunobiologii, Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: iwanski.bartlomiej11@wp.pl
mariola.andrejko@mail.umcs.pl

BARCIAK WIĘKSZY (*Galleria mellonella*) JAKO ORGANIZM MODELOWY W BADANIACH BIOMEDYCZNYCH

WSTĘP

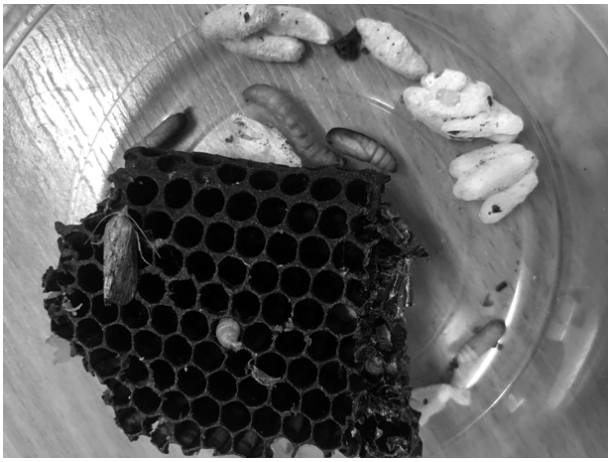
Wybór odpowiedniego organizmu modelowego jest niezwykle ważny podczas planowania doświadczeń mających na celu analizę mechanizmów patogenezy drobnoustrojów. Organizm taki musi zapewnić warunki jak najbardziej zbliżone do obserwowanych podczas infekcji człowieka, czyli konieczny jest etap kolonizacji oraz odpowiedź układu odpornościowego gospodarza. Ze względu na podobieństwo immunologiczne i anatomiczne, do tego rodzaju badań wykorzystuje się z reguły modele ssacze. Testy z użyciem ssaków są niestety czasochłonne, pracochłonne i kosztowne. Ponadto budzą spore kontrowersje etyczne.

Gąsienice barciaka większego (*Galleria mellonella*) są powszechnie wykorzystywanym organizmem modelowym w badaniach interakcji gospodarz-patogen oraz do testowania skuteczności substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost różnorodności badanych drobnoustrojów w układzie *G. mellonella*-patogen, a uzyskane wyniki wniosły nieoceniony wkład w badania nad wirulencją ludzkich patogenów. Zastosowanie owadów zgodnie z zasadą „3R" (ang. replacement, reduction, refinement) pozwala na stopniowe zastępowanie ssaczych organizmów modelowych w badaniach – jako bezkręgowce gąsienice barciaka nie są objęte przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt i wytycznymi Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Jako główny zarzut do stosowania tego rodzaju modeli podaje się m.in. brak wystandaryzowanych procedur hodowli owada, co utrudnia porównywanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach (MIKULAK i współaut. 2018).

BARCIAK WIĘKSZY – ORGANIZM MODELOWY

Barciak większy (*G. mellonella*) jest przedstawicielem rzędu Lepidoptera, należy do rodziny omacnicowatych (Pyralidae). W naturalnych warunkach jest szkodnikiem pasiek, dlatego jego występowanie jest skorelowane z występowaniem pszczoły miodnej (Ryc. 1). Do zalet gatunku jako organizmu modelowego można zaliczyć kosmopolityczność, relatywnie niski koszt hodowli, krótki cykl życiowy i możliwość łatwego pozyskiwania dużej liczby osobników. Stosunkowo duży rozmiar gąsienic (10–20 mm) ułatwia manipulacje laboratoryjne i znacząco upraszcza pobieranie tkanek do analiz (m.in. hemolimfy, ciała tłuszczowego, hemocytów). Gąsienice można zakażać miejscowo, poprzez podanie drobnoustroju drogą pokarmową, lub przez bezpośrednie wprowadzenie patogenu do hemocelu, a iniekcja umożliwia podanie dokładnej liczby badanych mikroorganizmów. Gąsienice mogą być bezpiecznie inkubowane w 37°C, temperaturze koniecznej do właściwej syntezy i działania wielu czynników wirulencji, produkowanych przez badane patogeny chorobotwórcze dla człowieka (JUNQUEIRA 2012, TSAI i współaut. 2016). Głównym powodem sukcesu *G. mello-*

Słowa kluczowe: *Candida albicans*, *Galleria mellonella*, organizm modelowy, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*



Ryc. 1. Barciak większy (*Galleria mellonella*).

nella jako organizmu modelowego jest fakt, że reakcje immunologiczne owadów zachowały w toku ewolucji znaczne podobieństwa do odpowiedzi wrodzonej ssaków. Na podstawie porównania genomów stwierdzono istnienie wielu owadzich homologów ludzkich genów kodujących białka, które mogą być zaangażowane zarówno w rozpoznanie mikroorganizmów, jak i w proces transdukcji sygnału (VOGEL i współaut. 2011). Dlatego poznanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie układu immunologicznego owadów może dostarczyć cennych informacji na temat wrodzonego układu odpornościowego ssaków (LIONAKIS 2011). Gąsienice barciaka wykorzystywane są przede wszystkim w badaniach interakcji patogenów z mechanizmami odporności wrodzonej gospodarza, do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka oraz do oceny skuteczności leków przeciwdrobnoustrojowych (RAMARAO i współaut. 2012, CHAMPION i współaut. 2016, WOJDA i współaut. 2020).

UKŁAD ODPORNOŚCIOWY OWADÓW

W przypadku prowadzenia badań immunologicznych istotna jest znajomość funkcjonowania układu odpornościowego organizmu modelowego. Na odpowiedź odpornościową barciaka *G. mellonella* składają się wzajemnie powiązane ze sobą zewnętrzne bariery ochronne oraz wewnętrzne mechanizmy odporności wrodzonej – odpowiedź komórkowa i humoralna. Po sforsowaniu bariery anatomiczno-fizjologicznej przez mikroorganizm następuje jego rozpoznanie przez układ odpornościowy owada. W identyfikowaniu struktur charakterystycznych dla patogenów PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterrns), takich jak lipopolisacharyd (LPS), kwasy lipotejchojowe (LTA), peptydoglikan (PG) i -1-3-glukan, lub cząsteczek będących efektem uszkodzenia komórek DAMPs (ang. danger-associated molecular patterns) biorą udział białka receptorowe określane jako PRR (ang. pattern recognition receptors) (STOKES i współaut. 2015, LANGE i współaut. 2018). Ponadto, detekcja mikroorganizmów wspomagana jest przez hemolinę i apolipoforynę III (apoLp-III). Hemolina jest indukowalnym białkiem zbudowanym z czterech domen immunoglobulinowych D1-D4 tworzących strukturę podkowy. Występuje w formie wolnej lub związanej z błoną komórkową hemocytów. Ma zdolność wiązania się do powierzchni komórek drożdży, LPS bakterii Gram-ujemnych i LTA bakterii Gram-dodatnich (TSAI i współaut. 2016). ApoLp-III jest konstytutywnie wydzielana do hemolimfy, wchodzi w skład mobilnego kompleksu lipoforyn, który odpowiada za transport lipidów i zaopatrzenie energetyczne mięśni owada (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2015). Ponadto wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jak również oddziałuje synergistycznie z lizozymem (ZDYBICKA-BARABAS i współaut. 2013) oraz cekropiną (BOLOURI MOGHADDAM i współaut. 2016, STĄCZEK i współaut. 2018) wzmagając ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Natychmiast po wniknięciu patogenu do organizmu owada uruchamiana jest odpowiedź komórkowa, która związana jest z upostaciowanymi składnikami hemolimfy – hemocytami, komórkami wykazującymi analogię do ssaczych fagocytów. U barciaka wyróżnia się 5 rodzajów hemocytów: prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, sferulocyty i enocytoidy. Granulocyty i plazmatocyty, obecne w hemolimfie w największej liczbie, są komórkami zdolnymi do adhezji do obcych powierzchni, dlatego są odpowiedzialne m.in. za fagocytozę i tworzenie otoczek wokół ciał obcych (nodulacja i inkapsulacja). Główną funkcją sferulocytów jest transport metabolitów, natomiast enocytoidy syntetyzują składniki układu oksydazy fenolowej. Liczba hemocytów w hemolimfie zmienia się w trakcie życia owada, jak również w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne i zakażenie (LAVINE i STRAND 2002, BROWNE i współaut. 2013, BINDER i współaut. 2016, WU i współaut. 2016).

Odpowiedź humoralna owada obejmuje m.in. proces krzepnięcia hemolimfy i gojenia ran, aktywację układu oksydazy fenolowej (ang. phenoloxidase, PO), prowadzącą do melanizacji, jak również indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) (CYTRYŃSKA 2009, BOLOURI MOGHADDAM i współaut. 2016). Produkcja melaniny jest katalizowana przez PO, enzym magazynowany głównie w enocytoidach, w postaci nieaktywnego zymogenu, który

nazwano profenolooksydazą (ang. prophenoloxidase, proPO). W wyniku działania kaskady proteaz serynowych proPO przekształcana jest w formę aktywną PO na drodze ograniczonej proteolizy. Enzym ten katalizuje oksydację fenoli do chinonów, które spontanicznie polimeryzując, tworzą melaninę i otaczają rozpoznane patogeny (Kavanagh i Reeves 2004, Pereira i współaut. 2020). Proces ten jest ściśle kontrolowany przez inhibitory proteaz serynowych, ze względu na fakt, że produkty pośrednie reakcji katalizowanych przez PO są wysoce reaktywne i mogą powodować uszkodzenia komórek gospodarza (Zdybicka-Barabas i współaut. 2014).

W odpowiedzi na zakażenie, po rozpoznaniu determinantów mikroorganizmów przez układ odpornościowy owada, w ciele tłuszczowym i w hemocytach syntetyzowane są peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Szlaki aktywujące ekspresję genów peptydów odpornościowych, głównie Toll i Imd, aktywowane są odpowiednio przez bakterie Gram-dodatnie i grzyby oraz bakterie Gram-ujemne. Owadzie szlaki Toll i Imd regulują aktywność czynników transkrypcyjnych, odpowiednio Dif (szlak Toll) i Relish (szlak Imd), które są homologami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego NF- B (Stokes i współaut. 2015). Peptydy odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi humoralnej ze względu na właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec szerokiego spektrum patogenów. U *G. mellonella* poznano dotąd kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Są wśród nich peptydy -helikalne (cekropiny A i D, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), peptydy bogate w prolinę, w glicynę (gloweryny), a także peptydy anionowe (Cytryńska i współaut. 2007, Li i współaut. 2012). AMPs owadzie wykazują duże podobieństwo do peptydów syntetyzowanych przez organizmy ssacze, w tym do peptydów ludzkich. Dotychczasowe badania wykazały, że ich produkcja jest regulowana niekodującym, niskocząsteczkowym RNA (miRNA), tak jak ma to miejsce w organizmach ssaków, natomiast profil syntetyzowanych AMPs jest skorelowany z rodzajem zidentyfikowanego patogenu (Mukherjee i współaut. 2020). Różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie *G. mellonella* obserwowano po zakażeniu owadów różnymi bakteriami i grzybami (Mak i współaut. 2010, Andrejko i współaut. 2021). Należy zaznaczyć, że badania sugerują możliwość funkcjonowania pamięci immunologicznej u owadów i innych bezkręgowców, ale z udziałem innych mechanizmów niż występujące u kręgowców (Wojda 2017, Zdybicka-Barabas i współaut. 2017).

WYKORZYSTANIE BARCIAKA WIĘKSZEGO W BADANIACH INTERAKCJI PATOGEN-GOSPODARZ

W dotychczasowych badaniach z powodzeniem wykorzystywano gąsienice *G. mellonella* do testowania wielu drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka, w tym patogennych bakterii, takich jak *Francisella tularensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida i Cryptococcus* oraz grzybów strzępkowych *Aspergillus fumigatus* i *A. flavus* (Pereira i współaut. 2020). Wykazano analogię między wirulencją m. in. bakterii *P. aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* oraz grzybów *C. albicans* i *A. fumigatus* w stosunku do myszy i gąsienic *G. mellonella* (Browne i współaut. 2013, Binder i współaut. 2016, Tsai i współaut. 2016). Poniżej przedstawione zostały wybrane wyniki badań mechanizmów patogenezy oraz roli czynników wirulencji groźnych ludzkich patogenów, takich jak Gram-dodatnia bakteria *S. aureus,* Gram-ujemna pałeczka *P. aeruginosa* i drożdżak *C. albicans*.

GRONKOWIEC ZŁOCISTY
Staphylococcus aureus

Gram-dodatnia bakteria *S. aureus* została sklasyfikowana przez WHO jako jeden z najgroźniejszych patogenów, a badania nad nowymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi zwalczającymi tę bakterię uznano za priorytetowe. Cechą charakterystyczną bakterii jest zdolność do produkcji szerokiego spektrum czynników wirulencji wywołujących zróżnicowane schorzenia, m.in. zespół wstrząsu toksycznego, sepsę, zapalenie wsierdzia, zatrucia pokarmowe, infekcje skóry i tkanek miękkich (Taylor i Unakal 2022). Najczęściej badanymi czynnikami wirulencji tej bakterii są białka umożliwiające adhezję komórek patogenu, takie jak czynniki adhezyjne A i B (ClfA i ClfB), białka wiążące fibronektynę (FnBPs), adhezyny wiążące kolagen (Cna) i elastynę (Ebps) oraz białka umożliwiające agregację i tworzenie biofilmów (Laabei i współaut. 2015, Ma i współaut. 2019). Kolejną grupą czynników są toksyny (hemolizyny, leukotoksyny), których główną rolą jest osłabianie reakcji obronnych gospodarza przez modulację mechanizmów wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej. Bakteria *S. aureus* produkuje również liczne enzymy odpowiedzialne za pozyskanie składników odżywczych (koagulaza, stafylokinaza, nukleazy, proteazy serynowe i cysteinowe, metaloproteazy, lipazy) (Oliveira i współaut. 2018, Tam i Torres 2019).

Wyniki licznych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem gąsienic *G. mellonella* pozwoliły lepiej zrozumieć rolę biofilmu wytwarzanego

w procesie patogenezy przez badaną bakterię. Na przykład w doświadczeniach opisanych przez GRAF i współaut. (2019) owady stosowano do ustalenia roli czynników wirulencji wyizolowanych metodą multiomiczną z macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmów *S. aureus*. Bezkomórkowy supernatant biofilmu, zawierający zidentyfikowane czynniki (białka otoczki, hemolizyny, leukotoksyny i lipazy), wstrzykiwano do hemocelu gąsienic *G. mellonella.* Na podstawie uzyskanych wyników wykazano wyraźną korelację pomiędzy zjadliwością szczepów a wytwarzaniem biofilmu.

Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych przez ZHAO i współaut. (2019) wykazały, że zjadliwość *S. aureus* jest bezpośrednio związana z profilem egzoproteomu bakterii, a dzięki analizie przeżywalności *G. mellonella* możliwe było dokładne rozróżnienie tych profili. Obecność białek takich jak: IsaA (ang. immunodominant staphylococcal antigen A), IsdA, IsdB, IsdE, IsdH (ang. iron-regulated surface determinants A, B, E, H) i chitynazy B, skutkowała zwiększoną śmiertelnością larw, z kolei gąsienice zakażone mutantami delecyjnymi niezdolnymi do syntezy tych białek cechowały się zwiększoną przeżywalnością. Ponadto bakteria *S. aureus* indukowała syntezę peptydów odpornościowych w hemolimfie *G. mellonella*, takich jak gloweryny, peptyd cekropino-D-podobny czy peptyd morycynopodobny, a także tworzenie guzków podobnych pod względem budowy i funkcji do ropni powszechnie występujących podczas infekcji skóry i tkanek miękkich u ludzi (SHEEHAN i współaut. 2019). Uzyskane wyniki dowiodły, że czynniki wirulencji *S. aureus* są rozpoznawane przez układ odpornościowy gąsienic, a ich eliminacja następuje poprzez mechanizmy podobne do występujących u naturalnych (ludzkich) gospodarzy. Innym przykładem zastosowania gąsienic *G. mellonella* do analizy procesów patogenezy *S. aureus* są badania przeprowadzone przez MÉNARD i współaut. (2021). Udowodniono, że stopień zjadliwości danego szczepu gronkowca jest regulowany przez ekspresję określonych fragmentów sRNA. Wykorzystując *G. mellonella* jako model infekcji zaobserwowano, że szczepy zdolne do ekspresji fragmentu *spr d*sRNA są bardziej zjadliwe, niż pozostałe badane szczepy. Stwierdzono, że ten model owadzi zapewnia szybką i łatwą metodę monitorowania udziału sRNA w patogenezie *S. aureus* i może być również stosowany do innych ludzkich patogenów bakteryjnych.

Gąsienice *G. mellonella* wykorzystano również do oceny różnic w zjadliwości pomiędzy testowanymi szczepami *S. aureus* opornymi na rymfapicynę o fenotypie SCV (ang. Small Colony Variants) a odpowiadającymi im szczepami rodzicielskimi. Wykazano, że zmianie fenotypu towarzyszyły zmiany w zjadliwości, a śmiertelność gąsienic zakażonych *S. aureus* SCV była niższa niż w przypadku odpowiednich szczepów rodzicielskich (ZHENG i współaut. 2021).

Ponadto gąsienice barciaka były z powodzeniem stosowane w poszukiwaniach nowych związków bioaktywnych chroniących przed infekcją *S. aureus.* SILVA i współaut. (2017) wykazali, że zastosowanie mirycetyny, roślinnego flawonoidu, stymuluje przeżywalność larw *G. mellonella* zainfekowanych gronkowcem, jak również hamuje syntezę czynników wirulencji tego patogenu, zmniejszając jego zdolności do adhezji i formowania biofilmu. Natomiast GIBREEL i UPTON (2013) wykazali, że syntetyczny peptyd epidermycyna, chronił owady przed zakażeniem zarówno szczepami podatnymi na metycylinę, jak i opornymi na ten antybiotyk (ang. methicyllin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA). Ciekawym wynikiem badań przeprowadzonych przez HESKETH-BEST i współaut. (2021) było wykazanie, że po infekcji gąsienic *G. mellonella* bakterią *S. aureus* oporną na metycylinę nastąpił spadek masy lipidów w organizmie owadów, co uznano za nowy parametr odpowiedzi immunologicznej. Innym przykładem może być wykorzystanie gąsienic barciaka do oceny skuteczności inhibitorów sortazy (SrtA). Ta związana z błoną transpeptydaza cysteinowa jest odpowiedzialna za kotwiczenie białek powierzchniowych do peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. GUAN i współaut. (2022) wykazali, że ML346 (związek kwasu barbiturowego i aldehydu cynamonowego) jest w pełni bezpieczny i nietoksyczny dla gąsienic *G. mellonella*, jak również skutecznie chroni je przed zakażeniem *S. aureus* poprzez nieodwracalną inhibicję SrtA.

PAŁECZKA ROPY BŁĘKITNEJ
Pseudomonas aeruginosa

Gram-ujemna pałeczka *P. aeruginosa*, powszechnie występująca w środowisku, jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. U ludzi z odpornością upośledzoną z różnych przyczyn wywołuje zakażenia m. in. układu oddechowego, skóry i tkanek miękkich, układu moczowego i krwionośnego (URBANOWICZ i GNIADKOWSKI 2017). Zagrożenie dotyczy również osób starszych, szczególnie hospitalizowanych wielokrotnie lub długo, pacjentów po zabiegach inwazyjnych, z ranami oparzeniowymi lub odleżynami. Inną grupę podwyższonego ryzyka stanowią chorzy na mukowiscydozę. Patogen ten jest jednym z najgroźniejszych drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne, których leczenie jest trudne ze względu na oporność bakterii *Pseudomonas* na liczne antybiotyki stosowane w terapii oraz niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezyn-

fekcyjne (Gellatly i Hancoock 2013, Urbanowicz i Gniadkowski 2017).

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* charakteryzują się szeregiem mechanizmów i czynników warunkujących zjadliwość tego organizmu. Można je podzielić na: związane ze ścianą komórkową, tj. LPS, rzęski i pile, oraz na substancje wydzielane pozakomórkowo, takie jak egzotoksyny, hemolizyny, barwniki (piowerdyna i piocyjanina) i proteazy. Pile typu IV biorą udział w adhezji do komórek gospodarza, a także odpowiadają za tropizm tkankowy. Z kolei LPS uczestniczy w inicjacji oraz modulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, stanowi także czynnik etiologiczny stanów zapalnych. Najczęściej badaną grupą czynników wirulencji *P. aeruginosa* są cytotoksyny (egzotoksyny). Ich rolą jest modulacja odpowiedzi odpornościowej gospodarza, m.in. przez reorganizację cytoszkieletu komórki eukariotycznej (egzotoksyna Y), cytotoksyczność względem komórek nabłonka i makrofagów (egzotoksyna U), spowalnianie procesu fagocytozy (egzotoksyna T), zaburzanie procesu transkrypcji (egzotoksyna S) oraz hamowanie syntezy białek (egzotoksyna A) (Urbanowicz i Gniadkowski 2017).

Innymi czynnikami wirulencji bakterii znajdującymi się w centrum zainteresowania naukowców są enzymy proteolityczne, takie jak proteaza IV, proteaza alkaliczna oraz elastazy A i B. Ich zadaniem, oprócz przełamywania odpowiedzi odpornościowej gospodarza, jest dostarczanie substancji odżywczych komórkom patogenu. Szczególne znaczenie mają elastazy zdolne do lizy białek strukturalnych: laminin i kolagenów. Biorą one również udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywują immunologicznie kompetentne cząsteczki, takie jak ludzki inhibitor proteinaz -1 oraz immunoglobuliny IgG i IgA (Morihara i Homma 2018).

Do czynników wirulencji *P. aeruginosa* możemy też zaliczyć systemy sekrecyjne, odpowiedzialne za wydzielanie określonych białek efektorowych bezpośrednio do wnętrza komórek eukariotycznych lub do przestrzeni międzykomórkowych, oraz wydzielany zewnątrzkomórkowo polisacharyd alginian, stanowiący jeden z głównych składników struktury biofilmów. Produkcja wielu czynników zjadliwości bakterii zależna jest od mechanizmu wyczuwania obecności (ang. quorum sensing, QS), pełniącego istotną rolę w kontroli ekspresji wielu genów. Mechanizmy działania większości czynników wirulencji bakterii są dość dokładnie poznane, jednak badania te prowadzono głównie z wykorzystaniem linii komórkowych. Dokładna rola tych substancji w patogenezie u ludzi często nie jest do końca wyjaśniona (D'Agata 2015).

Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu gąsienic *G. mellonella* w badaniach patogenezy oraz czynników wirulencji *P. aeruginosa* zostały opublikowane ponad 60 lat temu (Lysenko1963, Chadwick i Vilk 1969). Barciak większy jest owadem bardzo wrażliwym na zakażenie bakterią *P. aeruginosa* inokulowaną do hemolimfy; średnia dawka śmiertelna (LD_{50}) wynosi mniej niż 10 komórek. W jednym z pierwszych badań Madziara-Borusewicz i Lysenko (1971) zaobserwowali niszczenie hemocytów w hemolimfie barciaka przez proteazę *P. aeruginosa.* Ponadto zaobserwowano zdolność układu odpornościowego owada do wykrywania różnic w patogenności mutantów LPS *P. aeruginosa* (Dunphy i współaut. 1986). Gąsienice *G. mellonella* okazały się dobrym modelem w badaniach mających na celu wyjaśnienie mechanizmów działania i roli systemu sekrecji typu III (SS3) w patogenezie *P. aeruginosa.* Stwierdzono m.in. że mutanty z nieaktywnym SS3 są znacznie mniej zjadliwe niż ich odpowiedniki z aktywnym systemem ekspresji (Miyata i współaut. 2003).

Barciak większy został uznany za alternatywny model organizmu-gospodarza do analizy interakcji enzymów proteolitycznych bakterii *P. aeruginosa* z elementami układu odpornościowego owada. Wykazano, że proteazy powodują degradację białek/peptydów odpornościowych w hemolimfie *G. mellonella*: serynowa proteaza IV degradowała apoLp-III, białko homologiczne względem ludzkiej apolipoproteiny E w warunkach *in vitro* (Andrejko i współaut. 2005) i *in vivo* (Andrejko i współaut. 2008). Natomiast indukowane peptydy przeciwdrobnoustrojowe były degradowane przez elastazę B i alkaliczną proteazę. Zaobserwowano również, że proteazy *P. aeruginosa* podane owadom w dawce subletalnej są odpowiedzialne za aktywację układu odpornościowego gospodarza (Andrejko i współaut. 2009, Andrejko i Siemińska 2016). Warto wspomnieć, że obserwowano zmiany jakościowe i ilościowe w profilu produkowanych przez owady AMPs w odpowiedzi na infekcję szczepami *P. aeruginosa* produkującymi odmienny zestaw enzymów proteolitycznych (Andrejko i współaut. 2021). Ponadto stwierdzono odmienny wpływ izolatów klinicznych pałeczki ropy błękitnej na reakcje odpornościowe *G. mellonella,* co wskazuje, że owad ten może być z powodzeniem wykorzystywany do analizy czynników wirulencji różnych szczepów *P. aeruginosa* (Andrejko i współaut. 2014).

Z kolei w innych badaniach udowodniono, że wytwarzające biofilm szczepy *P. aeruginosa* są znacznie bardziej podatne na działanie antybiotyków w warunkach *in vivo*, przeprowadzonych z wykorzystaniem *G. mellonella*, niż podczas testów *in vitro*. Wyniki tych analiz

pozwoliły lepiej zrozumieć zarówno proces tworzenia biofilmu, jak i interakcje zachodzące pomiędzy patogenem, elementami wrodzonego układu odpornościowego oraz antybiotykami podczas infekcji bakterią *P. aeruginosa* (BENTHALL i współaut. 2015).

W przypadku pałeczki ropy błękitnej gąsienice *G. mellonella* znalazły również zastosowanie do testowania substancji aktywnych mających zwalczać zakażenia tym patogenem. THOMAZ i współaut. (2020) wykazali, że podanie gąsienicom nanocząsteczek srebra znacząco zwiększa przeżywalność owadów zakażonych *P. aeruginosa*, jak i stymuluje parametry ich odpowiedzi odpornościowej. Podobne rezultaty uzyskano wykorzystując kombinacje antybiotyku levofloksacyny i roślinnych alkaloidów. Badane owady charakteryzowały się większą przeżywalnością, nawet po zakażeniu wielolekoopornymi szczepami *P. aeruginosa* (SIRIYONG i współaut. (2018).

DROŻDŻAK *Candida albicans*

Oprócz badań nad patogennością bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, gąsienice *G. mellonella* są z powodzeniem wykorzystywane także jako organizm modelowy w badaniach dotyczących grzybów. Najczęściej badanym, a jednocześnie zdecydowanie najbardziej rozpowszechnionym grzybem chorobotwórczym u ludzi, jest *C. albicans*, który może powodować szerokie spektrum schorzeń (kandydozy), w tym choroby skóry, błon śluzowych, zakażenia układowe i ogólnoustrojowe (MAYER i współaut. 2013). Ten oportunistyczny patogen jest szczególnie niebezpieczny w środowiskach szpitalnych, gdzie kolonizuje powierzchnie narzędzi chirurgicznych, aparatury medycznej i wyposażenia sal operacyjnych poprzez formowanie biofilmu. Do najważniejszych czynników wirulencji *C. albicans* można zaliczyć białka adhezyjne, proteazy, fosfolipazy i hemolizyny (NOBILE i współaut. 2015, STANISZEWSKA i współaut. 2015).

Powszechne występowanie i ciężki przebieg infekcji wywoływanych przez *C. albicans* wskazują na konieczność opracowania nowych metod terapii oraz szczegółowego poznania procesu patogenezy, a także mechanizmów działania poszczególnych czynników wirulencji. W tym przypadku gąsienice barciaka większego *G. mellonella* znalazły zastosowanie jako organizm modelowy i są z powodzeniem wykorzystywane m.in. w badaniach enzymów proteolitycznych produkowanych przez *C. albicans*, takich jak proteazy aspartanowe (SAP). Ich główną rolą podczas zakażenia jest uszkadzanie tkanek, modulowanie odpowiedzi odpornościowej i udział w formowaniu biofilmu. Zaobserwowano, że liczba i rodzaj wytwarzanych proteaz ma duży wpływ na zjadliwość szczepu oraz przebieg infekcji (ROSSONI i współaut. 2013, SHEEHAN i współaut. 2019).

Inną grupę czynników wirulencji syntetyzowanych przez *C. albicans* stanowią fosfolipazy. Ich głównym zadaniem jest dostarczanie komórkom substancji odżywczych, formowanie biofilmu, inicjacja procesów zapalnych poprzez modulowanie funkcjonowania komórek odpornościowych gospodarza oraz liza konkurencyjnej mikroflory, co zapewnia przewagę komórkom patogenu (HÖFS i współaut. 2016). Owady z powodzeniem wykorzystano też do opracowania nowych, szybkich metod identyfikacji gatunków *Candida* spp. na podstawie różnic w przeżywalności zainfekowanych owadów (ROSSONI i współaut. 2013). Pamiętać należy, że badane gatunki grzybów wytwarzają odmienny profil czynników wirulencji podczas infekcji (GAGO i współaut. 2014).

SOWA-JASIEK i współaut. (2016) badali wpływ lizozymu na komórki *C. albicans*, wykorzystując larwy *G. mellonella* jako organizm modelowy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że komórki patogenu są podatne na działanie lizozymu, zarówno ssaczego, jak i obecnego w hemolimfie barciaka większego. Badania przeprowadzone przez RAJENDRAN i współaut. (2015) wykazały, iż podanie acetylocholiny chroni gąsienice *G. mellonella* przed zakażeniem tym patogennym grzybem poprzez hamowanie powstawania biofilmu, jak również stymuluje mechanizmy komórkowej odpowiedzi odpornościowej owadów. VILELA i współaut. (2015) osiągnęli podobne rezultaty poprzez koinfekcję gąsienic *G. mellonella* bakteriami *Lactobacillus acidophilus* i patogenem *C. albicans*.

Innej grupie badaczy udało się wykazać, że infekcje wywołane przez *C. albicans* mają o wiele łagodniejszy przebieg, jeżeli organizm miał wcześniej kontakt z innymi gatunkami *Candida* spp. Zaobserwowano znaczny wzrost przeżywalności gąsienic *G. mellonella* zakażonych grzybem w grupie immunizowanej wcześniej subletalnymi dawkami *C. glabrata.* Wyniki te pozwoliły wyjaśnić różnice w przebiegu infekcji *C. albicans* oraz mogą przyczynić się do opracowania nowych środków zapobiegania infekcji tym groźnym patogenem (HUANG i współaut. 2020).

WYKORZYSTANIE BARCIAKA WIĘKSZEGO DO TESTOWANIA SUBSTANCJI CZYNNYCH

Oprócz badań podstawowych mających na celu szczegółową analizę mechanizmów interakcji gospodarz-patogen, gąsienice barciaka większego są również intensywnie wykorzystywane w biotechnologii i farmakologii jako organizmy testowe dla nowych antybiotyków, chemoterapeutyków i w terapiach alternatyw-

nych. Zakażenia wywołane przez oporne na antybiotyki mikroorganizmy stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Wykorzystanie *G. mellonella* jako organizmu modelowego oraz wyniki badań podstawowych ułatwiły zarówno projektowanie nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jak i usprawniły proces ich wdrożenia do powszechnego użytku.

Hill i współaut. (2014) wykorzystali w swoich badaniach gąsienice *G. mellonella* do określenia skuteczności antybiotyków takich jak: cefotaxim (CTX), pipeacylina (PIP), meropenem (MEM), amikacyna (AMK), levofloksacyna (LVX), kolastyna (CST), ich kinetyki oraz stopnia, w jakim badane czynniki obciążają organizm podczas infekcji *P. aeruginosa*. Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano kombinację dwóch antybiotyków (CTX+PIP), która okazała się najbardziej skuteczna w zwalczaniu bakterii *P. aeruginosa w* porównaniu z innymi badanymi wariantami.

Podobne doświadczenia zostały przeprowadzone przez Krezdorn i współaut. (2014). Ich celem było opracowanie kombinacji antybiotyków o zwiększonej efektywności przeciwko wielolekoopornym szczepom *P. aeruginosa*, głównie przeciw izolatom klinicznym odpowiedzialnym za najcięższe infekcje. Testy przeprowadzone z użyciem gąsienic *G. mellonella* pozwoliły opracować terapię opartą o kombinację 3 antybiotyków (cefotaxim, pipeacylina, meropenem) wykazującą bardzo dużą skuteczność biobójczą.

Innym przykładem jest wykorzystanie larw *G. mellonella* do testowania synergistycznego działania substancji biologicznie aktywnych zwalczających *S. aureus*. Z grupy 15 testowanych związków podanie czynników z grupy pleuromutylin skutkowało wzrostem przeżywalności owadów. Umożliwiło to opracowanie i wdrożenie nowej terapii zwalczającej infekcje wywołane przez szczepy *S. aureus*, w tym przez szczególnie niebezpieczne szczepy wielolekooporne (Dong i współaut. 2017).

Jednym z bardziej atrakcyjnych rozwiązań problemu antybiotykooporności są alternatywne metody terapii zakażeń, np. oparte na wykorzystaniu wirusów prokariotycznych – bakteriofagów (Golkar i współaut. 2014). Badania nad ich zastosowaniem trwają na całym świecie, jednak zanim bakteriofagi będą mogły zostać wdrożone do powszechnego użytku, konieczna jest ocena ich skuteczności i dokładne poznanie interakcji zachodzących w układzie gospodarz-patogen-bakteriofag. W tej dziedzinie barciak większy również znalazł zastosowanie zarówno jako model do oceny skuteczności preparatów fagowych, jak i w badaniach podstawowych nad interakcjami gospodarz-patogen-wirus zachodzącymi po zaaplikowaniu preparatu do organizmu.

Manohar i współaut. (2018) wykorzystali gąsienice *G. mellonella* do oceny skuteczności trzech preparatów fagowych w zwalczaniu zakażeń bakteriami *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Wyniki badań wykazały znaczący wzrost przeżywalności owadów po aplikacji bakteriofagów, nawet w przypadku infekcji wywołanych przez wielolekooporne szczepy *K. pneumoniae*. Thiry i współaut. (2019) uzyskali podobne wyniki izolując bakteriofagi bezpośrednio ze środowiska szpitalnego oraz testując ich skuteczność na szerokiej gamie szczepów *K. pneumoniae z* wykorzystaniem larw *G. mellonella*. Wykazano 70% spadek śmiertelności owadów po podaniu preparatów zawierających wyizolowane wirusy prokariotyczne.

W innych badaniach Wang i współaut. (2020) zastosowali połączenie klasycznej antybiotykoterapii i bakteriofagów, opracowując podstawy projektowania nowych metod zwalczania szczepów *E. coli* wytwarzających biofilm. Użycie gąsienic *G. mellonella* pozwoliło zidentyfikować połączenie ciprofloksacyny i faga WL-3, które okazało się skuteczne w terapii zapaleń sztucznych stawów. Natomiast Forti i współaut. (2018) zaprojektowali 6-fagowy koktajl, który był zdolny do lizy klinicznych szczepów *P. aeruginosa* zarówno w kulturach planktonowych, jak i w biofilmach oraz leczył ostrą infekcję dróg oddechowych u myszy i bakteriemię u *G. mellonella*.

PODSUMOWANIE

Gąsienice barciaka większego (*G. mellonella*) są popularnym organizmem modelowym powszechnie stosowanym w badaniach nad mechanizmami patogenezy, działaniem czynników wirulencji i interakcji gospodarz-patogen. Ze względu na wysoki stopień podobieństwa odpowiedzi odpornościowej owadów do mechanizmów odporności wrodzonej ssaków możliwe jest wykorzystanie *G. mellonella* jako substytutu dla ssaczych organizmów modelowych. Liczne zalety owada przekonały wielu badaczy do wyboru tego organizmu jako modelu również w badaniach biotechnologicznych i farmakologicznych, m. in. do projektowania nowych substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, opracowywania skuteczniejszych terapii klasycznych, jak i pionierskich terapii alternatywnych, mających na celu zastąpienie antybiotyków.

Streszczenie

Barciak większy (*Galleria mellonella*) jest coraz częściej stosowanym owadzim organizmem modelowym. Do zalet gatunku można zaliczyć powszechność występowania, krótki cykl życiowy, oraz stosunkowo duży rozmiar gąsienic, znacznie ułatwiający manipulacje laboratoryjne. Istot-

ne jest to, że owady mogą być inkubowane w temperaturze 37°C, koniecznej w badaniach dotyczących ludzkich patogenów. Warto wspomnieć, że wykazano pozytywną korelację między odpowiedzią gospodarza a wirulencją wielu patogenów w modelach ssaków i owadów. Gąsienice *G. mellonella* z powodzeniem są wykorzystywane w badaniach interakcji patogen-gospodarz, mechanizmów patogenezy i czynników wirulencji drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka, m.in. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Owady okazały się również odpowiednie do testowania skuteczności substancji biologicznie czynnych czy też w terapiach alternatywnych mających na celu zastąpienie antybiotyków.

LITERATURA

ANDREJKO M., SIEMIŃSKA A., 2016. *The role of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease in activation of the antimicrobial activity in Galleria mellonella larvae.* Invertebr. Surviv. J. 13, 269-280.

ANDREJKO M., CYTRYŃSKA M., JAKUBOWICZ T., 2005. *Apolipophorin III is a substrate for protease IV from Pseudomonas aeruginosa.* FEMS Microbiol. Lett. 243, 331-337.

ANDREJKO M., MIZERSKA-DUDKA M., JAKUBOWICZ T., 2008. *Changes in Galleria mellonella apolipophorin III level during Pseudomonas aeruginosa infection.* J. Invertebr. Pathol. 97, 14-19.

ANDREJKO M., MIZERSKA-DUDKA M., JAKUBOWICZ T., 2009. *Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of Galleria mellonella infected with Pseudomonas aeruginosa*. Comp. Biochem. Physiol. B 152, 118-123.

ANDREJKO M., ZDYBICKA-BARABAS A., CYTRYŃSKA M., 2014. *Diverse effects of Galleria mellonella infection with entomopathogenic and clinical strains of Pseudomonas aeruginosa.* J. Invertebr. Pathol. 115, 14-25.

ANDREJKO M., MAK P., SIEMIŃSKA-KUCZER A., IWAŃSKI B., WOJDA I., SUDER P., KULETA P., REGUCKA K., CYTRYŃSKA M., 2021. *A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by Galleria mellonella larvae in response to infection with two Pseudomonas aeruginosa strains differing in the profile of secreted proteases.* J. Insect. Physiol. 131, 104239.

BENTHALL G., TOUZEL R. E., HIND C. K., TITBALL R. W., SUTTON J. M., THOMAS R. J., WAND M. E., 2015. *Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae in Galleria mellonella.* Int. J. Antimicrob. Agents. 46, 538-545.

BINDER U., MAURER E., LASS-FLÖRL C., 2016. *Galleria mellonella: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species*. Fungal Biol. 120, 288-95.

BOLOURI MOGHADDAM M. R., TONK M., SCHREIBER C., SALZIG D., CZERMAK P., VILCINSKAS A., RAHNAMAEIAN M., 2016. *The potential of the Galleria mellonella innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides*. Biol. Chem. 397, 939-945.

BROWNE N., HEELAN M., KAVANAGH K., 2013. *An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes*. Virulence 1, 597-603.

CHADWICK J. S., VILK E., 1969. *Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against Pseudomonas aeruginosa in Galleria mellonella.* J. Invertebr. Pathol. 13, 410-415.

CHAMPION O. L., WAGLEY S., TITBALL R. W., 2016. *Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research.* Virulence 2, 840-845.

CYTRYŃSKA M., 2009. O *odporności bez przeciwciał...* Post. Biol. Komórki 36, 309-324.

CYTRYŃSKA M., MAK P., ZDYBICKA-BARABAS A., SUDER P., JAKUBOWICZ T., 2007. *Purification and characterization of eight peptides from Galleria mellonella immune hemolymph.* Peptides 28, 533-546.

D'AGATA E., 2015. *Pseudomonas aeruginosa and other Pseudomonas species.* [W:] *Principles and practice of infectious diseases.* BENNET J.E., DOLIN R., BLASER M. (red.). Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2518-2532.

DONG C. L., LI L. X., CUI Z. H., CHEN S. W., XIONG Y. Q., LU J. Q., LIAO X. P, GAO Y., SUN J., LIU Y. H., 2017. *Synergistic effect of pleuromutilins with other antimicrobial agents against Staphylococcus aureus in vitro and in an experimental Galleria mellonella model.* Front. Pharmacol. 8, 553.

DUNPHY G. B., MORTON D. B., KROPINSKI A., CHADWICK J. M., 1986. *Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa for larvae of Galleria mellonella: bacterial properties associated with virulence.* J. Invertebr. Pathol. 47, 48-55.

FORTI F., ROACH D. R., CAFORA M., PASINI M. E., HORNER D. S., FISCARELLI E. V., ROSSITTO M., CARIANI L., BRIANI F., DEBARBIEUX L., GHISOTTI D., 2018. *Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces Pseudomonas aeruginosa biofilms and treats acute infections in two animal models*. Antimicrob. Agents Chemother. 25, e02573-17.

GAGO S., GARCÍA-RODAS R., CUESTA I., MELLADO E., ALASTRUEY-IZQUIERDO A., 2014. *Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis virulence in the non-conventional host Galleria mellonella.* Virulence 5, 278-285.

GELLATLY S. L., HANCOCK R. E., 2013. *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses.* Pathog. Dis. 67, 159-173.

GIBREEL T. M., UPTON M., 2013. *Synthetic epidermicin NI01 can protect Galleria mellonella larvae from infection with Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2269-2273.

GOLKAR Z., BAGASRA O., PACE DG., 2014. *Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis*. J. Infect. Dev. Ctries 13, 129-136.

GRAF A. C., LEONARD A., SCHÄUBLE M., RIECKMANN L. M., HOYER J., MAASS S., LALK M., BECHER D., PANÉ-FARRÉ J., RIEDEL K., 2019. *Virulence factors produced by Staphylococcus aureus biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity.* Mol. Cell Proteomics. 18, 1036-1053.

GUAN X. N., ZHANG T., YANG T., DONG Z., YANG S., LAN L., YANG C. G., 2022. *Covalent sortase A inhibitor ML346 prevents Staphylococcus aureus infection of Galleria mellonella.* RSC Med. Chem. 13, 138-149.

HESKETH-BEST P. J., MOURITZEN M. V., SHANDLEY-EDWARDS K., BILLINGTON R. A., UPTON M., 2021. *Galleria mellonella larvae exhibit a weight-dependent lethal median dose when infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Pathog. Dis. 79, ftab003.

HILL L., VELI N., COOTE P. J., 2014. *Evaluation of Galleria mellonella larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against Pseudomonas aeruginosa infection*. Int. J. Antimicrob. Agents 43, 254-261.

HÖFS S., MOGAVERO S., HUBE B., 2016. *Interaction of Candida albicans with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota*. J. Microbiol. 54, 149-169.

HUANG X. W., XU M. N., ZHENG H. X., WANG M. L., LI L., ZENG K., LI D. D., 2020. *Pre-exposure to Candida glabrata protects Galleria mellonella against subsequent lethal fungal infections*. Virulence 11, 1674-1684.

JUNQUEIRA J. C., 2012. *Galleria mellonella as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives*. Virulence 3, 474-476.

KAVANAGH K., REEVES E. P., 2004. *Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens*. FEMS Microbiol. Rev. 28, 101-112.

KREZDORN J., ADAMS S., COOTE P. J., 2014. *A Galleria mellonella infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 63, 945-955.

LAABEI M., UHLEMANN A. C., LOWY F. D., AUSTIN E. D., YOKOYAMA M., OUADI K., FEIL E., THORPE H. A., WILLIAMS B., PERKINS M., PEACOCK S. J., CLARKE S. R., DORDEL J., HOLDEN M., VOTINTSEVA A. A., BOWDEN R., CROOK D. W., YOUNG B. C., WILSON D. J., RECKER M., MASSEY R. C., 2015. *Evolutionary trade-offs underlie the multi-faceted virulence of Staphylococcus aureus*. PLoS Biol. 13, e1002229.

LANGE A., SCHÄFER A., BENDER A., STEIMLE A., BEIER S., PARUSEL R., FRICK J. S., 2018. *Galleria mellonella: A novel invertebrate model to distinguish intestinal symbionts from pathobionts*. Front Immunol. 9, 211-214.

LAVINE M. D., STRAND M. R., 2002. *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-1309.

LI Y., XIANG Q., ZHANG Q., HUANG Y., SU Z., 2012. *Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application*. Peptides. 37, 207-15.

LIONAKIS M. S., 2011. *Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology*. Virulence 2, 521-527.

LYSENKO O., 1963. *The mechanisms of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula 1. The pathogenicity of strain N-06 for the larvae of the greater wax moth, Galleria mellonella (Linnaeus)*. J. Insect Pathol. 5, 78-82.

MA D., MANDELL J. B., DONEGAN N. P., CHEUNG A. L., MA W., ROTHENBERGER S., SHANKS R. M. Q., RICHARDSON A. R., URISH K. L., 2019. *The toxin--antitoxin MazEF drives Staphylococcus aureus biofilm formation, antibiotic tolerance, and chronic infection*. mBio 10, e01658-19.

MADZIARA-BORUSIEWICZ K., LYSENKO O., 1971. *The mechanism of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa: VII. The influence of toxic proteinase on hemocytes of Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 17, 138-140.

MAK P., ZDYBICKA-BARABAS A., CYTRYŃSKA M., 2010. *A different repertoire of Galleria mellonella antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi*. Dev. Comp. Immunol. 34, 1129-1136.

MANOHAR P., NACHIMUTHU R., LOPES B. S., 2018. *The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using Galleria mellonella infection model*. BMC. Microbiol. 18, 1-11.

MAYER F. L., WILSON D., HUBE B., 2013. *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence 4, 119-128.

MÉNARD G., ROUILLON A., GHUKASYAN G., EMILY M., FELDEN B., DONNIO P. Y., 2021. *Galleria mellonella larvae as an infection model to investigate sRNA-mediated pathogenesis in Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 631710.

MIKULAK E., GLINIEWICZ A., PRZYGODZKA M., SOLECKA J., 2018. *Galleria mellonella L. as model organism used in biomedical and other studies*. Przegl. Epidemiol. 72, 57-73.

MIYATA S., CASEY M., FRANK D. W., AUSUBEL F. M., DRENKARD E., 2003. *Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Infect. Immun. 71, 2404-2413.

MORIHARA K., HOMMA J. Y., 2018. *Pseudomonas proteases*. [W:] *Bacterial enzymes and virulence*. MORIHARA K., HOMMA J. Y. (red.). CRC Press, 41-80.

MUKHERJEE K., AMSEL D., KALSY M., BILLION A., DOBRINDT U., VILCINSKAS A., 2020. *MicroRNAs regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like Escherichia coli infections in the surrogate insect model Galleria mellonella*. Sci. Rep. 10, 1-11.

NOBILE C. J., JOHNSON A. D., 2015. *Candida albicans biofilms and human disease*. Annu. Rev Microbiol. 69, 71-92.

OLIVEIRA D., BORGES A., SIMÕES M., 2018. *Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases*. Toxins (Basel) 10, 252.

PEREIRA M. F., ROSSI C. C., DA SILVA G. C., ROSA J. N., BAZZOLLI D. M. S., 2020. *Galleria mellonella as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application*. Pathog Dis.78, ftaa056.

RAJENDRAN R., BORGHI E., FALLENI M., PERDONI F., TOSI D., LAPPIN D. F., NILE C., 2015. *Acetylcholine protects against Candida albicans infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a Galleria mellonella infection model*. Eukaryot. Cell. 14, 834-844.

RAMARAO N., NIELSEN-LEROUX C., LERECLUS D., 2012. *The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis*. J. Vis. Exp. 70, e4392.

ROSSONI R. D., BARBOSA J. O., VILELA S. F. G., SANTOS J. D. D., JORGE A. O. C., JUNQUEIRA J. C., 2013. *Correlation of phospholipase and proteinase production of Candida with in vivo pathogenicity in Galleria mellonella*. Brazilian J. Oral Sci. 12, 199-204.

SHEEHAN G., DIXON A., KAVANAGH K., 2019. *Utilization of Galleria mellonella larvae to characterize the development of Staphylococcus aureus infection*. Microbiology 165, 863-875.

SILVA L. N., DA HORA G. C. A., SOARES T. A., BOJER M. S., INGMER H., MACEDO A. J., TRENTIN D. D. S., 2017. *Myricetin protects Galleria mellonella against Staphylococcus aureus infection and inhibits multiple virulence factors*. Sci. Rep. 7, 1-16.

SIRIYONG T., VORAVUTHIKUNCHAI S. P., COOTE P. J., 2018. *Steroidal alkaloids and conessine from the medicinal plant Holarrhena antidysenterica restore antibiotic efficacy in a Galleria mellonella model of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection*. BMC Complement Altern. Med. 18, 1-10.

SOWA-JASIŁEK A., ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., WYDRYCH J., SKRZYPIEC K., MAK P., DERYŁO K., TCHÓRZEWSKI M., CYTRYŃSKA M., 2016. *Galleria mellonella lysozyme induces apoptotic changes in Candida albicans cells.* Microbiol. Res. 193, 121-131.

STANISZEWSKA M., BONDARYK M., PIŁAT J., SIENNICKA K., MAGDA U., KURZATKOWSKI W., 2015. *Virulence factors of Candida albicans*. Przegl. Epidemiol. 66, 629-633.

STOKES B. A., YADAV S., SHOKAL U., SMITH L. C., ELEFTHERIANOS I., 2015. *Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals*. Front. Microbiol. 6, 1-9.

STĄCZEK S., ZDYBICKA-BARABAS A., MAK P., 2018. *Studies on localization and protein ligands of Galleria mellonella apolipophorin III during immune response against different pathogens*. J. Insect Physiol. 105, 18-27.

TAM K., TORRES V. J., 2019. *Staphylococcus aureus secreted toxins and extracellular enzymes.* Microbiol. Spectr. 7, 10.1128.

TAYLOR T. A., UNAKAL C. G., 2022. *Staphylococcus aureus*. [Updated 2022 Feb 14]. [W]: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

THIRY D., PASSET V., DANIS-WLODARCZYK K., LOOD C., WAGEMANS J., DE SORDI L., VAN NOORT V., DUFOUR N., DEBARBIEUX L., MAINIL J. G., BRISSE S., LAVIGNE R., 2019. *New Bacteriophages against emerging lineages ST23 and ST258 of Klebsiella pneumoniae and efficacy assessment in Galleria mellonella larvae.* Viruses 11, 411.

THOMAZ L., GUSTAVO DE ALMEIDA L., SILVA F. R., CORTEZ M., TABORDA C. P., SPIRA B., 2020. *In vivo activity of silver nanoparticles against Pseudomonas aeruginosa infection in Galleria mellonella*. Front. Microbiol. 11, 582107.

TSAI C. J., LOH J. M., PROFT T., 2016. *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. Virulence 2, 214-229.

URBANOWICZ P., GNIADKOWSKI M., 2017. *„Ciężkozbrojny" Pseudomonas aeruginosa: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne*. Kosmos 66, 11-29.

VILELA S. F., BARBOSA J. O., ROSSONI R. D., SANTOS J. D., PRATA M. C., ANBINDER A. L., JUNQUEIRA J. C., 2015. *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 inhibits biofilm formation by C. albicans and attenuates the experimental candidiasis in Galleria mellonella*. Virulence 6, 29-39.

VOGEL H., ALTINCICEK B., GLÖCKNER G., VILCINSKAS A., 2011. *A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella*. BMC Genom. 12, 308.

WANG L., TKHILAISHVILI T., ANDRES B. B., TRAMPUZ A., MORENO M. G., 2020. *Bacteriophage-antibiotic combinations against ciprofloxacin/ceftriaxone-resistant Escherichia coli in vitro and in an experimental Galleria mellonella model.* Int. J. Antimicrob. Agents 56, 106200.

WOJDA I., 2017. *Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella*. Insect Sci. 24, 342-357.

WOJDA I., STANIEC B., SUŁEK M., KORDACZUK J., 2020. *The greater wax moth Galleria mellonella: biology and use in immune studies*. Pathog. Dis. 78, ftaa057.

WU G., LIU Y., YI Y., 2016. *Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from Galleria mellonella larva:cell types and their role in innate immunity*. Tissue Cell 48, 297-304.

ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., MAK P., SKRZYPIEC K., MENDYK E., CYTRYŃSKA M., 2013. *Synergistic action of Galleria mellonella apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria.* Biochim. Biophys. Acta 1828, 1449-1456.

ZDYBICKA-BARABAS A., MAK P., JAKUBOWICZ T., CYTRYŃSKA M., 2014. *Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in Galleria mellonella*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 87, 1-12.

ZDYBICKA-BARABAS A., SOWA-JASIŁEK A., STĄCZEK S., JAKUBOWICZ T., CYTRYŃSKA M., 2015. *Different forms of apolipophorin III in Galleria mellonella larvae challenged with bacteria and fungi*. Peptides 68, 105-112.

ZDYBICKA-BARABAS A., STĄCZEK S., CYTRYŃSKA M., 2017. *Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców*. Kosmos 66, 563-574.

ZHAO X., PALMA MEDINA L. M., STOBERNACK T., GLASNER C., DE JONG A., UTARI P., SETROIKROMO R., QUAX W. J., OTTO A., BECHER D., BUIST G., VAN DIJL J. M., 2019. *Exoproteome heterogeneity among closely related Staphylococcus aureus t437 isolates and possible implications for virulence*. J. Proteome Res. 18, 2859-2874.

ZHENG X., FANG R., WANG C., TIAN X., LIN J., ZENG W., XU C., 2021. *Resistance profiles and biological characteristics of rifampicin-resistant Staphylococcus aureus Small-Colony Variants*. Infect. Drug Resist. 21, 1527-1536.

KOSMOS Vol. 71, 3, 203-213, 2022

Bartłomiej Iwański, Mariola Andrejko

Department of Immunobiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka Str., 20-033 Lublin, E-mail: iwanski.bartlomiej11@wp.pl, mariola.andrejko@mail.umcs.pl

GREATER WAX MOTH (*Galleria mellonella)* AS A MODEL ORGANISM IN BIOMEDICAL RESEARCH

Summary

The greater wax moth *Galleria mellonella* is widely used as non-vertebrate model host. The advantages of the species include its common occurrence, short development cycle, relatively large size of larvae, which greatly facilitates laboratory manipulations. Importantly, insects can be incubated at 37°C, which is necessary for research on human pathogens. A positive correlation has been shown between the host response and the virulence of many pathogens in mammalian and insect models. *G. mellonella* larvae are successfully used in studies of pathogen-host interactions, mechanisms of pathogenesis and virulence factors of human pathogens e.g. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Insects have also been shown to be suitable for testing the efficacy of biologically active substances or in alternative therapies to replace antibiotics.

Key words: *Candida albicans*, *Galleria mellonella*, model organism, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*