MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2015, 67: 133 - 139

Owady - jako organizmy modelowe w badaniach nad patogenezą infekcji grzybiczych i w ocenie potencjalnych antymikotyków

Insects as model organisms to study the pathogenesis of fungal infections and evaluation of potential antimycotics

Katarzyna Niedźwiecka, Mariusz Dyląg

Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

W przeciągu ostatnich trzech dekad obserwuje się znaczący wzrost zagrażających życiu inwazyjnych infekcji grzybiczych. Potrzeba poznania mechanizmów rozwoju patogenezy oraz poszukiwania nowych potencjalnych fungicydów wiąże się z koniecznością przeprowadzenia badań *in vivo*. Gryzonie to nieodzowne organizmy modelowe do tego typu badań. Niestety, masowe ich użycie oznacza duże nakłady finansowe, a także problemy natury logistycznej i etycznej. Niniejsza praca przedstawia propozycje wykorzystania owadów, jako organizmów modelowych do badań rozwoju grzybic układowych i analiz działania leków przeciwgrzybiczych.

Słowa kluczowe: *bezkręgowce, grzybica, oporność, patogenność, wirulencja*

ABSTRACT

Systemic fungal infections are becoming an increasingly important problem. Exploring the development of mechanisms of pathogenesis, immune response of the human organism and the search for new potential antifungal agents requires *in vivo* testing. Mice, rats and rabbits are indispensable model organisms for this type of study. Unfortunately, such a kinds of studies carried out on a large scale are associated with high costs as well as with logistical and ethical problems. This paper reports proposal for the use of insects as model organisms to study the development of systemic fungal infections and analysis of biological activities of antifungal agents.

Key words: *immunity, invertebrates, mycoses, pathogenicity, virulence*

WSTĘP

Poziom wrażliwości *in vitro* komórek danego szczepu grzyba na potencjalny lek przeciwgrzybiczy rzadko pokrywa się z tym obserwowanym w badaniach *in vivo*. W codziennej praktyce klinicznej często można spotkać się z opornymi na leczenie infekcjami grzybiczymi przy równoczesnej wrażliwości *in vitro* izolowanych szczepów. Z tego też względu istotne są badania prowadzone na różnych modelach zwierzęcych w celu określenia skutecznych stężeń związku dających gwarancję eradykacji komórek patogennego grzyba z badanego organizmu. Ponadto, badania *in vivo* mogą dostarczyć cennych informacji o profilu bezpieczeństwa badanego związku w stosunku do komórek zwierzęcych. Badania prowadzone na tym poziomie pozwalają nie tylko śledzić rozwój eksperymentalnie indukowanej infekcji grzybiczej w czasie, ale dają też możliwość oceny wymiernych efektów terapii z wykorzystaniem nowych, potencjalnych fungicydów. Ponadto, eksperymenty na modelach zwierzęcych pozwalają na opracowanie optymalnej, przydatnej w aspekcie aplikacyjnym kompozycji przeciwgrzybiczej. Idealny organizm modelowy przewidziany do badań nad patogenezą infekcji grzybiczych powinien stwarzać możliwość uzyskania obrazu zbliżonego do tego przypominającego rozwój choroby w organizmie ludzkim. Odtworzone powinny być procesy począwszy od etapu kolonizacji aż do reakcji obronnej organizmu. Myszy, szczury i króliki stanowią więc nieoceniony model w tego typu badaniach ze względu na ich podobieństwo anatomiczne i immunologiczne do człowieka. Niestety, wykorzystanie dużej liczby ssaków w doświadczeniach jest trudne z powodów logistycznych, ekonomicznych oraz etycznych. W takich przypadkach niezwykle pomocne okazują się organizmy bezkręgowe (15, 17). Potwierdzają to między innymi wyniki uzyskane z badań porównawczych prowadzonych na modelu *Mus musculus* i *Galleria mellonella*. W badaniach tych oceniano stopień wirulencji takich gatunków jak *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* i *C. krusei* względem komórek mysich i larw *G. mellonella*. Uzyskane dla obydwu modeli podobne wyniki, potwierdziły, że największą wirulencją odznaczają się *C. albicans* i *C. tropicalis*, a zarazem stanowią dowód na to, że bezkręgowce takie jak *G. mellonella* mogą stanowić równie dobry model do badań nad patogenezą infekcji grzybiczych (17, 22). W licznych badaniach wykazano, że wiele grzybów patogennych dla ludzi jest w stanie wywołać infekcje letalne u bezkręgowych organizmów modelowych (6, 9). Bezkręgowce wykazują szereg cech ułatwiających obserwowanie rozwoju infekcji grzybiczych, takich jak: niskie koszty badań, łatwość prowadzenia hodowli, brak dylematów natury etyczno-moralnej oraz wysoką rozrodczość. Ponadto, ważnym czynnikiem jest możliwość kontroli rozwoju zakażenia w czasie, co pozwala na analizę interakcji gospodarz-patogen. Takie modele badawcze, jako filogenetycznie starsze, dysponują wyłącznie mechanizmami odporności wrodzonej, jednak wiele ważnych jej aspektów zostało zachowanych w organizmach kręgowych. Badania porównawcze genomów pokazują, że u różnych bezkręgowców znajdziemy liczne homologi ludzkich genów kodujących białka zaangażowane w rozpoznanie patogenów lub transdukcję sygnału ekspresji. Dzięki tym cechom, zwierzęta bezkręgowe takie jak *Drosophila melanogaster* czy *Galleria mellonella* są często wykorzystywane w badaniach wirulencji mikroorganizmów, odporności gospodarza lub też w ocenie skuteczności *in vivo* różnych fungicydów (6, 24). Owady mają wykształcone mechanizmy odporności, które zapewniają skuteczną obronę przed rozwojem infekcji grzybiczej. Do konstytutywnej linii obrony należą fizyczne bariery takie jak kutykula, która dodatkowo zawiera związki przeciwdrobnoustrojowe zapobiegające

lub opóźniające wtargnięcie patogenu do hemocelu gospodarza. W przypadku przełamania pierwszej linii obrony gospodarza aktywowana zostaje komórkowa i humoralna odpowiedź immunologiczna organizmu (4). W komórkowej odpowiedzi immunologicznej uczestniczą komórki hemolimfy, które mogą fagocytować komórki grzyba lub tworzyć wokół nich otoczkę. Te ostatnie formowane są wskutek agregacji hemocytów, co zatrzymuje patogen w macierzy pozakomórkowej. W przypadku tworzenia wielowarstwowej otoczki wokół tworzących agregaty komórek grzyba mówimy o nodulacji, natomiast w przypadku większych fragmentów grzybni - inkapsulacji. Struktury te mogą następnie podlegać melanizacji, co zabija uwięzione wewnątrz komórki grzyba (20).

Humoralna odpowiedź immunologiczna opiera się głównie na procesie krzepnięcia hemolimfy, aktywacji kaskady enzymów proteolitycznych i syntezie peptydów mających związek z odpornością. Peptydy odpornościowe mają zdolność oddziaływania z błoną komórkową drobnoustrojów prowadząc do jej depolaryzacji, formowania kanałów, a nawet fragmentacji. Ponadto, mogą one wnikać do komórki i wpływać negatywnie na proces transkrypcji, replikacji oraz syntezy białek (5, 23, 26).

Drosophila melanogaster

Do najlepiej poznanych organizmów modelowych w obrębie gromady *Insecta* należy z pewnością *D. melanogaster (*order: *Diptera)*. Znajomość sekwencji genomu i łatwość manipulacji genetycznych sprawiły, że jest to idealny organizm do badań nad patogenezą różnego typu infekcji (15). Muszka owocowa wytwarza co najmniej 20 różnych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ich synteza w ciele tłuszczowym kontrolowana jest przez 2 szlaki sygnałowe- Toll/Dif i Imd/Relish. Dzięki temu muszka owocowa skutecznie unika ogólnoustrojowych infekcji takich jak kryptokokoza. Wykazano, że już po 4 dniach od wprowadzenia do hemolimfy larw *D. melanogaster* zawiesiny komórek *Cryptococcus neoformans* ($4x10^2$ komórek na larwę) nie dochodzi do rozwoju infekcji. Mutacje w genach kodujących białka ze szlaku Toll skutkują utratą odporności na infekcje powodowane przez *C. neoformans* i inne grzybicze infekcje systemiczne (2, 15). W przypadku gdyby komórki tego grzyba dostały się do organizmu droga pokarmową, szlak Toll nie jest zaangażowany w odpowiedź immunologiczną na infekcję *C. neoformans*. Sugeruje to, że ten patogen jest w stanie blokować szlak Toll w przewodzie pokarmowym *D. melanogaster* lub szlak ten jest niefunkcjonalny w komórkach układu pokarmowego (1, 2, 3, 16, 21). Warto zaznaczyć, że peptydy odpornościowe utrzymują się w hemolimfie zaledwie do kilku dni od momentu zakażenia. Tym bardziej interesujące są wyniki badań świadczące o swoistej pamięci immunologicznej owadów. Podanie muszce owocowej subletalnej dawki żywych komórek *C. neoformans*, chroni ją przed rozwojem tego typu infekcji w przyszłości, nawet po wprowadzeniu dawki letalnej. Reakcja ta jest specyficzna w zależności od gatunku grzyba i utrzymuje się przez całe życie owada (28).

W warunkach laboratoryjnych *D. melanogaster* może być zakażana patogenem grzybiczym na kilka sposobów. Najbardziej precyzyjnym jest mikroiniekcja wystandaryzowanego inokulum bezpośrednio do jamy ciała. Inne metody to bezpośrednia inokulacja grzbietowej części tułowia igłą preparacyjną, napylanie spor bezpośrednio na egzoszkielet imago lub zakażanie drogą pokarmową. Z pośród wymienionych najczęściej stosowaną metodą jest nakłuwanie tułowia igłą (średnica około 0,25 mm) uprzednio zanurzoną w gęstej zawiesinie komórek. W przypadku grzybów drożdżopodobnych stężenie inokulum powinno wynosić

$1x10^7$-$1x10^{10}$ komórek na mililitr. W przypadku zakażania drogą pokarmową, muchy umieszcza się na 48 godzin w kolbie z pożywką zawierającą pełne podłoże agarowe zaszczepione konkretnym szczepem drożdżowym. Do badań przebiegu patogenez grzybiczych wykorzystuje się najczęściej 2-4 dniowe samice much, które po inokulacji bądź inkubacji w obecności patogenu przenoszone są do kolb ze standardową pożywką (7, 13, 23).

Galleria mellonella

G. mellonella (order: *Lepidoptera*) jest coraz częściej wykorzystywana, jako organizm modelowy do badań nad patogenezą infekcji grzybiczych. Wynika to z faktu, że larwy Barciaka większego w odróżnieniu od innych owadów, jak chociażby omawianej już *D. melanogaster* mogą się rozwijać nawet w temperaturze 37ºC. Ponadto, duży rozmiar larw (osiągają do 25mm długości) ułatwia aplikację patogenu lub potencjalnego fungicydu czy też umożliwia pobór większej ilości próbek hemocelu i tkanek niezbędnych do dalszych analiz. Układ odpornościowy larw wykazuje duże podobieństwo funkcjonalne i strukturalne do układu immunologicznego kręgowców (17, 22). System odporności komórkowej *Galleria mellonella* związany jest z występowaniem 6 typów hemocytów odpowiedzialnych za fagocytozę, nodulację oraz inkapsulację. Niektóre są zdolne do produkcji reaktywnych form tlenu w sposób podobny do ludzkich neutrofili. Ilość hemocytów w hemolimfie odzwierciedla poziom wirulencji komórek infekującego grzyba. Larwy zakażane niepatogennym gatunkiem grzyba wykazują takie samo zagęszczenie hemocytów jak u osobników niezainfekowanych. Istotnym mechanizmem obronnym organizmu *G. mellonella* jest również odpowiedź humoralna, która warunkuje krzepnięcie hemolimfy, melanizację oraz syntezę licznych peptydów odpornościowych (8, 18).

Istnieją różne techniki infekowania larw patogenem. Do najefektywniejszych należy bezpośrednia iniekcja do hemocelu. W tym celu najczęściej używa się strzykawek insulinowych o pojemności do 300 µl i igle o grubości do 26G. Nakłucie wykonuje się przez posuwki pamiętając, aby w przypadku wielokrotnych iniekcji wybierać za każdym razem inną posuwkę. Taką samą drogą możliwe jest również aplikowanie ściśle określonych dawek potencjalnych antymikotyków. Bezpieczna objętość wstrzykiwanego jednorazowo ksenobiotyku nie powinna przekraczać 20 µl. Należy pamiętać, że osobniki wybierane do doświadczenia powinny znajdować się w trzecim, ostatnim stadium larwalnym, które osiąga masę ciała 250-350 mg (14).

Niezwykle ważna jest cecha przeżywalności larw *Galleria mellonella* w temperaturze 37°C (22). Dzięki temu możemy stworzyć warunki rozwoju grzybic układowych podobne do tych panujących w organizmie człowieka. Ponadto, proliferacja w przypadku wielu gatunków patogennych grzybów, w tym *C. neoformans* przebiega szczególnie dobrze w tej właśnie temperaturze. Larwy zainfekowane taką samą standardową zawiesiną komórek *C. neoformans* inkubowane w temp. 30°C cechowała wyraźnie większa przeżywalność w porównaniu do tych hodowanych w temp. 37°C. Odsetek przypadków śmiertelnych zależny jest również od komórek wielkości inokulum użytego do infekowania larw. Opisywane w literaturze mechanizmy wirulencji *C. neoformans* warunkujące rozwój kryptokokozy u ssaków odgrywają równie ważną rolę w rozwoju infekcji u larw *Galleria mellonella* (11, 25).

Komórki hemocytów *G. mellonella* charakteryzuje różna zdolność do fagocytozy w zależności od gatunku grzyba powodującego infekcję. Wiele gatunków grzybów chorobotwórczych dla ludzi wykształciło mechanizmy umożliwiające ucieczkę z komórek

fagocytujących. Te same mechanizmy pozwalają komórkom tych grzybów na ucieczkę z hemocytów *G. mellonella*. Najlepiej widać to na przykładzie *C. albicans*, której komórki są zdolne do transformacji morfologicznej. W tym przypadku przejście w formę mycelialną skutecznie zapobiega fagocytozie lub też pozwala uwolnić się z fagocytów. Podobne badania na larwach *G. mellonella* wykazały, że fagocytowane konidia *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus flavus* już po jednej dobie od iniekcji „kiełkują" prowadząc do perforacji hemocytów. W rezultacie obrona komórkowa organizmu larwy okazuje się niewystarczająca i dochodzi do rozwoju śmiertelnej w skutkach infekcji (4, 12, 14, 29).

Blattella germanica

Karaczan prusak (order: *Blattodea*), jako organizm modelowy wielokrotnie był wykorzystywany w badaniach nad patogenezą aspergilozy, której czynnikiem etiologicznym był *Aspergillus flavus*. W warunkach naturalnych do zakażenia dochodzi przez powłoki ciała, wskutek mechanicznego urazu lub enzymatycznego rozkładu chityny. W warunkach laboratoryjnych dokonuje się iniekcji zawiesiny zarodników konidialnych do hemocelu przez błonę między segmentami ciała. Badania prowadzone na osobnikach dorosłych zakażonych *A. flavus* wykazały śmiertelność na poziomie około 100% już po 48-72 godzinach infekcji (dawka $6{,}2x10^7$ CFU na osobnika). Warto podkreślić, że w przypadku któregokolwiek z badanych osobników nie stwierdzono żadnych zewnętrznych zmian chorobowych ani przebarwień ciała. Badania mikroskopowe pozwoliły zaobserwować 2 typy odpowiedzi komórkowej: fagocytozę i inkapsulację fragmentów grzybni. Wykazano, że infekcja *A. flavus* prowadzi do rozległych zmian w obrębie organów wewnętrznych *B. germanica* (19, 27).

Culex quinquefasciatus

Próby wywołania letalnej infekcji grzybiczej były prowadzone również na modelu *Culex quinquefasciatus* (order: *Diptera*). Komary, jako wektory wielu mikroorganizmów wykształciły jednocześnie efektywny system obronny zapobiegający infekcjom. Laboratoryjne próby infekowania dorosłych samic *C. quinquefasciatus Candida albicans* skutkowały szybką reakcją obronną organizmu owada. Komórki grzyba już po 24 godzinach od momentu iniekcji były niemalże całkowicie zneutralizowane dzięki efektywnym procesom fagocytozy i nodulacji (10).

PODSUMOWANIE

Bezkręgowce, jako organizmy modelowe nigdy nie zastąpią kręgowców w badaniach patogenez grzybiczych pomimo wielu podobieństw we wrodzonej reakcji układu immunologicznego ssaków i owadów. Owadzi model nie dostarczy danych na temat roli układu odpornościowego ssaka w zwalczaniu patogenu w ssaczych tkankach, ale pozwali na pierwszą analizę względnej wirulencji mikroorganizmów chorobotwórczych. Wykorzystanie owadów do analizy dużej liczby patogenów lub potencjalnych terapeutyków w krótkim czasie skutkuje niższymi kosztami oraz mniejszym nakładem pracy w porównaniu do badań z wykorzystaniem kręgowców. Model ten powinien być, zatem standardowo wykorzystywany w początkowej analizie poprzedzającej konwencjonalne testy *in vivo* oraz dla zminimalizowania potrzeby rutynowych testów na ssakach.

Podziękowania: Autorzy pracy dziękują za wsparcie z projektu finansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aggarwal K, Silverman N*. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. BMB Reports 2008; 41: 267-77.
2. *Alarco AM, Marcil A, Chen J* i inni. Immune-Deficient *Drosophila melanogaster*: A Model for the Innate Immune Response to Human Fungal Pathogens. J Immunol 2004; 172: 5622-8.
3. *Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J* i inni. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and Role of the Innate Immune Response. Eukaryotic Cell 2004; 3: 413-9.
4. *Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K*. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 34: 153-7.
5. *Bulet P, Stöcklin R*. Insect antimicrobial Peptides: Structure, Properties and Gene Regulation. Protein Pept Lett 2005; 12: 2-11.
6. *Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP*. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. Lancet Infect Dis 2007; 7: 42-55.
7. *Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE* i inni. *Drosophila melanogaster* as a Facil Model for Large-Scale Studies of Virulence Mechanisms and Antifungal Drug Efficacy in *Candida* Species. J Infect Dis 2006; 193: 1014-22.
8. *Cook SM, McArthur JD*. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Virulence 2013; 4: 350-3.
9. *Cotter G, Doyle S, Kavanagh K*. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeast. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 163-9.
10. *Da Silva JB, Da Albuquerque CMR, Da Araújo EC* i inni. Immune Defence Mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (*Diptera: Culicidae*) against *Candida albicans* Infection. J Invertevr Pathol 2000; 76: 257-62.
11. *Dyląg M*. Determinanty wirulencji czynników etiologicznych kryptokokozy. Mikol Lek 2012; 19: 119-23.
12. *Fallon JP, Troy N, Kavanagh K*. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humor al immune responses. Virulence 2011; 2: 413-21.
13. *Fuchs BB, Mylonakis E*. Useing non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 346-51.
14. *Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E*. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence 2010; 1: 475-82.
15. *Harwood CG, Reeta CR*. Host Pathogen Relations: Exploring Animal Models for Fungal Pathogens. Pathogens 2014; 3: 549-62.
16. *Irving P, Troxler L, Heuer TS* i inni. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 15119-24.
17. *Jacobsen ID. Galleria mellonella* as a model host to study virulence of Candida. Virulence 2014; 5: 237-9.
18. *Junqueira JC*: *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Virulence 2012; 3: 474-6.
19. *Kulshrestha V, Pathak SC*. Aspergillosis in German cockroach *Blattella germanica* (L.) (*Blattoidea: Blattellidae*). Mycopathologia 1997; 139: 75-8.
20. *Lavine MD. Strand MR*. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochm Mol Biol 2002; 32: 1295-309.

21. *Lazzaro BP*. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. Curr Opin Microbiol 2008; 11: 284-9.
22. *Muñoz-Gómez A, Corredor M, Benítez-Páez A* i inni. Development of quantitative proteomics using iTRAQ based on the immunological response of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Fusarium oxysporum* microconidia. PLoS ONE 2014; 9: e112179.
23. *Mylonakis E, Aballay A*. Warms and Flies as Genetically Tractable Animal Model To Study Host-Pathogen Interactions. Infect Immun 2005; 73: 3833-41.
24. *Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM*. Exploiting Amoeboid and Non-Vertebrate Animal Model Systems to Study the Virulence of Human Pathogenic Fungi. PLoS Pathog 2007; 3: e101.
25. *Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB* i inni. *Galleria mellonella* as a Model System To Study Cryptococcus neoformans Pathogenesis. Infect Immun 2005; 73: 3842-50.
26. *Otvos L*. The short proline-rich antibacterial peptide family. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1138-50.
27. *Pathak SC, Kulshrestha V.* Experimental aspergillosis in the German cockroach *Blattella germanica*: a histopathological study. Mycopathologia 1998; 143: 13-6.
28. *Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS*. A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependet On Phagocytes. PloS Pathog 2007; 3: e26.
29. *St Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B*. Lack of host specjalization in *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 320-4.

Otrzymano: 23 V 2015 r

Adres Autora: 51-148 Wrocław, ul. Przybyszewskiego 63/77, Zakład Genetyki,
Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych,
Uniwersytet Wrocławski