

Предпосылки существования вариаций врожденного иммунного ответа *Galleria mellonella*

Н. Д. Шамаев^{1, 2, 3}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанская государственная медицинская академия – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России, Казань, Россия

³ Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Россия

E-mail: nikolay1157@gmail.com

Аннотация. Обилие патогенов или генотипов патогенов может меняться во времени или пространстве, что приводит к колебаниям иммунного ответа. Генетическая изменчивость при наличии биогеографически обусловленного внутривидового разнообразия дает важную информацию о наличии таких колебаний у вида, широко используемого в лабораториях и распространенного по всему миру, что позволяет предположить наличие различного иммунного ответа против патогенов. У беспозвоночных существует балансирующий отбор со специфической коэволюцией в отличие от АМП позвоночных, которые имеют сильный положительный отбор и высокую вероятность коэволюции. Действие балансирующего отбора на отдельные гены АМП беспозвоночных может привести к возникновению полиморфизмов в последовательностях аминокислот, что потенциально приведет к изменению восприимчивости к патогенам, изучение чего имеет высокую научную значимость. **Цель исследования** – изучение потенциального существования расширенного гаплотипа (общего для нескольких особей) или отдельного гаплотипа, кодирующего АМП среди модельных организмов не млекопитающих. **Методы.** Объектом данного исследования был модельный организм (большая восковая моль *Galleria mellonella*). Был проведен анализ геномных сборок *G. mellonella* с использованием 11 ядерных мишеней и 16S участка рибосомальной РНК. **Результаты.** Было обнаружено шесть биогеографически различных экземпляров, полученных как из естественных, так и из искусственных экосистем: либо от имаго, либо от личинок. **Научная новизна.** 11 ядерных мишеней, кодирующих антимикробные пептиды *G. mellonella* и 16S участок рибосомальной РНК, помогли выделить три группы популяций, что потенциально подтверждает гипотезу о существовании варибельного врожденного иммунного ответа у данной лабораторной модели при наличии биогеографически обусловленного внутривидового разнообразия.

Ключевые слова: врожденный иммунный ответ, антимикробные пептиды, *G. mellonella*, биогеография, внутривидовое разнообразие

Для цитирования: Шамаев Н. Д. Предпосылки существования вариаций врожденного иммунного ответа *Galleria mellonella* // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 11. С. 1492–1501. DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-11-1492-1501>.

Дата поступления статьи: 04.07.2024, **дата рецензирования:** 17.09.2024, **дата принятия:** 27.09.2024.

Background to the existence of variation in the innate immune response in *Galleria mellonella*

N. D. Shamaev^{1,2,3}

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical Academy – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education “Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia”, Kazan, Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

E-mail: nikolay1157@gmail.com

Abstract. Pathogen abundance or pathogen genotypes may vary in space or time, resulting in fluctuations in immune responses. Genetic variation in the presence of biogeographically determined intraspecific diversity provides important information about the presence of such variations in a species widely used in laboratories and distributed worldwide, suggesting the presence of different immune responses against pathogens. Invertebrates have balancing selection with specific coevolution, in contrast to vertebrate AMPs, which have strong positive selection and a high probability of coevolution. Balancing selection on individual AMP genes in invertebrates may result in polymorphisms in amino acid sequences, potentially changing susceptibility to pathogens, the study of which is of high scientific significance. **The purpose of the study** was to investigate the potential existence of an extended haplotype (common to several individuals) or a separate haplotype encoding AMP among non-mammalian model organisms. **Methods.** The object of this study was a model organism (the greater wax moth *Galleria mellonella*). The analysis of *G. mellonella* genome assemblies was performed using 11 nuclear targets and the 16S ribosomal RNA region. **Results.** Six biogeographically distinct individuals were identified, obtained from both natural and artificial ecosystems: either from adults or larvae. **Scientific novelty.** The 11 nuclear targets encoding *G. mellonella* antimicrobial peptides and the 16S ribosomal RNA region helped to distinguish three population groups, which potentially supports the hypothesis of the existence of a variable innate immune response in this laboratory model in the presence of biogeographically determined intraspecific diversity.

Keywords: innate immune response, antimicrobial peptides, *Galleria mellonella*, biogeography, intraspecific diversity

For citation: Shamaev N. D. Background to the existence of variation in the innate immune response in *Galleria mellonella*. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2024; 24 (11): 1492–1501. DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-11-1492-1501>. (In Russ.)

Date of paper submission: 04.07.2024, **date of review:** 17.09.2024, **date of acceptance:** 27.09.2024.

Постановка проблемы (Introduction)

Анализ взаимоотношений хозяин – патоген является частью исследования инфекционных микроорганизмов и объектов и помогает понять патофизиологию заболевания и иммунный ответ хозяина. Несмотря на доступность исследований *in vitro*, *ex vivo*, клеточных линий и искусственных тканей в качестве вариантов исследования этого взаимодействия, модели на животных продолжают играть жизненно важную роль в понимании сложных взаимоотношений между заболеванием и его хозяином [1]. Преимущества использования животных моделей включают иммунологические реакции, температуру тела, метаболизм, а также физиологию клеток и тканей, которые аналогичны человеческим. Однако использование животных в научных исследованиях ограничено в последние годы из-за этических проблем, законов о защите животных и инициатив по защите животных [2; 3]. Модели-

мышь также обладают определенными недостатками, такими как высокая стоимость содержания, разведения и кормления животных, а также необходимость создания специальных условий биобезопасности в животноводческих помещениях для биоизоляции патогенных агентов [4]. В ответ на эти ограничения и технологические соображения были найдены альтернативные модельные организмы, которыми легче манипулировать и производить, которые дешевле содержать и которые вызывают меньше этических проблем. Среди этих новых моделей-заменителей выделяется большая восковая моль *Galleria mellonella* как беспозвоночное животное, позволяющее исследовать взаимоотношения патоген – хозяин и оценивать эффективность антибиотиков [5].

Несмотря на обилие патогенов или генотипов патогенов, которое может меняться во времени или пространстве, что приводит к колебаниям аллелей,

связанных с устойчивостью у их хозяев, при сбалансированном отборе (когда естественный отбор адаптивно поддерживает генетическое разнообразие во времени или пространстве) существует зависимость от конкретной молекулярной функции кодируемых генов и характера их взаимодействия с патогенами. Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой класс небольших пептидов, важных для реакции врожденной иммунной системы организма. Устойчивость к АМП у патогенов включает секрецию протеаз, отток АМП из внешней и внутренней мембран, а также модификацию поверхности мембран. Отбор АМП у насекомых может происходить при дифференцированной экспрессии гена АМП, разным количестве копий, иногда на уровне аминокислотной последовательности и может действовать синергично друг с другом [6]. АМП беспозвоночных могут иметь аминокислотный полиморфизм, приводящий к изменению восприимчивости к патогенам. Оценка наличия различных гаплотипов генов, кодирующих АМП, имеет ценность при исследовании взаимосвязи между генами АМП и патогенозом или иммунным ответом. В этом исследовании аллели генов, кодирующих АМП, были изучены среди известных изолятов *G. mellonella*, чтобы обнаружить возможность присутствия разнообразия аминокислот АМП и, таким образом, изучить возможность разнообразия иммунного ответа хозяина.

Методология и методы исследования (Methods)

Список зрелых АМП *G. mellonella* взят из предыдущих исследований. Последовательности аминокислот анионного пептида 1, аполифорицина, цекропина, цекропина D-подобного пептида, дефенсина, галиомицина, галлеримицина, гловерина, индуцибельного ингибитора сериновой протеазы 2, богатого пролином пептида 2 и лизоцима были введены в качестве запроса белка в инструменте базового поиска локального выравнивания от белка к нуклеотиду (TBLASTN) для поиска сходной последовательности в сборках генома *G. mellonella*: GCA_026898425.1 (личинка, природная экосистема, Австралия), GCA_002589825.1 (личинка, искусственная экосистема, Германия), GCA_004355975.1 (личинка, искусственная экосистема, Южная Корея), GCA_958496185.1 и GCA_958496355.1 (личинка, искусственная экосистема, Великобритания), GCA_003640425.2 (имаго, искусственная экосистема, США). Параметры алгоритма поиска TBLASTN были установлены по умолчанию. Нуклеотидную последовательность областей РНК и ДНК вводили в виде нуклеотидного запроса в инструмент базового локального поиска от нуклеотида к нуклеотиду (BLASTN). При вводе любого запроса либо 1 идентичная последовательность была указана как аналогичная последовательность из каждой сборки либо совпадение не было найдено. Филогенетиче-

ские деревья ожидаемых аминокислотных последовательностей АМП были построены с использованием метода максимального правдоподобия и модели на основе матрицы JTT, а деревья ожидаемой области 16S рибосомальной РНК были построены с использованием метода максимального правдоподобия и модели Тамуры – Нея с использованием MEGA. X [7]. Значения начальной загрузки были показаны в процентах после 500 репликаций на ветвях. Для каждого дерева использовались две внешние группы ортологов АМП, выбранные среди 6 генетически различных видов на основе наличия последовательностей (*Achroia grisella*, *Ostrinia furnacalis*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Helicoverpa armigera*, *Bicyclus anynana*). Топология дерева, особенно структура ветвления, считалась правдоподобной, когда значение начальной загрузки составляло 95 %, тогда как меньшие значения начальной загрузки не рассматривались.

Вероятность отклонения нулевой гипотезы о том, что последовательности развивались с одинаковым паттерном замещения, оценивалась по степени различий в смещениях базового состава между последовательностями (тест индекса диспаритета). Тест Монте-Карло (500 репликаций) использовался для оценки значений P , которые показаны под диагональю. Значения $P < 0,05$ считались значимыми.

Результаты (Results)

Точный механизм действия АМП насекомых все еще изучается, несмотря на то что они активны на мембранном уровне. Поскольку особи с потерей функции генов АМП в настоящее время недоступны, конкретная роль каждого из этих АМП не исследована. В настоящее время известно около 13 пептидов и белков, среди которых богатые пролином пептиды 1 и 2, лебоцин-подобный анионный пептид 1 и анионный пептид 2, гловерин, дефенсин/галиомицин, цекропин А-подобный пептид (цекропин А, цекропин), цекропин D-подобный пептид (цекропин D), аполифорицин, галлеримицин, морицин-подобный пептид В, лизоцим, аполифорицин III и супероксиддисмутаза [8]. Среди них 11 были более или менее обнаружены во всех изолятах в этом исследовании. Список генов *G. mellonella*, полученных в результате поиска в базе данных, показан в таблице 1.

Филогенетическое дерево, построенное с использованием 16S РНК из четырех изолятов *G. mellonella*, показало расхождение на две клады: Австралия с Соединенными Штатами Америки и Великобритания с Южной Кореей (рис. 1, панель А). Филогенетическое дерево со всеми 11 ядерными мишенями, кодирующими антимикробные пептиды у *G. mellonella*, показало разделение популяции на три группы Соединенного Королевства с Соединенными Штатами Америки, Южной Кореей с Австралией и одну группу с изолятом из Германии (рис. 1, панель В).

Список генов *G. mellonella*, полученный в результате поиска по базе данных NCBI

Название	Аббревиатура	Хромосома	NCBI ID
Анионный пептид 1	GM A	–	NW_026442151
	GM G	–	NTHM01000015
	GM SK	–	NHTH01000018
	GM UK1	4	OY292286
	GM UK2	–	CAUEHC010002810
Аполифорицин	GM USA	–	NW_022272931
	GM A	–	NW_026442069
	GM SK	–	NHTH01000041
	GM UK1	22	OY292304.1
Цекропин	GM UK2	–	CAUEHC010000413
	GM USA	–	NW_022274441
	GM A	–	NW_026442082
	GM G	–	NTHM01000002
Цекропин D-подобный пептид	GM SK	–	NHTH01000013
	GM UK1	14	OY292296
	GM UK2	–	CAUEHC010000302
	GM USA	–	NW_022269199
Дефенсин	GM A	–	NW_026442082
	GM G	–	NTHM01000002
	GM SK	–	NHTH01000013
	GM UK1	14	OY292296
	GM UK2	–	CAUEHC010001648
Галиомицин	GM USA	–	NW_022268635
	GM A	–	NW_026442068
	GM G	–	NTHM01000041
	GM SK	–	NHTH01000016
	GM UK1	5	OY292287
Галеримицин	GM UK2	–	CAUEHC010001648
	GM USA	–	NW_022268635
	GM A	–	NW_026442068
	GM G	–	NTHM01000041
	GM SK	–	NHTH01000016
Гловерин	GM UK1	5	OY292287
	GM UK2	–	CAUEHC010001648
	GM USA	–	NW_022268635
	GM G	–	NTHM01000041
Индукцибельный ингибитор сериновой протеазы 2	GM SK	–	NHTH01000016
	GM UK2	–	CAUEHC010002375
	GM USA	–	NW_022268635
	GM A	–	NW_026442060
	GM G	–	NTHM01000022
Лизоцим	GM SK	–	NHTH01000073
	GM UK1	24	OY292306
	GM UK2	–	CAUEHC010000355
	GM USA	–	NW_022271647
	GM A	–	NW_026442020
Богатый пролином пептид 2	GM G	–	NTHM01000068
	GM SK	–	NHTH01000348
	GM UK1	27	OY292309
	GM UK2	–	CAUEHC010000166
	GM USA	–	NW_022271652
16s рРНК	GM A	–	NW_026442013
	GM G	–	NTHM01000740
	GM SK	–	NHTH01000102
	GM UK1	6	OY292288
	GM UK2	–	CAUEHC010000113
16s рРНК	GM USA	–	NW_022273793
	GM A	–	NW_026442151
	GM G	–	NTHM01000015
	GM SK	–	NHTH01000018
	GM UK1	4	OY292286
16s рРНК	GM UK2	–	CAUEHC010002810
	GM USA	–	NW_022272931
	GM A	–	NC_028532
	GM SK	–	NHTH01000498
16s рРНК	GM UK1	митохондрии	OY292312
	GM USA	–	NC_028532

Примечание. Проверк (–) означает, что данные о хромосоме отсутствуют.

Table 1

List of *G. mellonella* genes obtained by searching the NCBI database

Name	Isolate abbreviation	Chromosome location	NCBI ID
Anionic peptide 1	GM A	–	NW_026442151
	GM G	–	NTHM01000015
	GM SK	–	NHTH01000018
	GM UK1	4	OY292286
	GM UK2	–	CAUEHC010002810
Apoliphoricin	GM USA	–	NW_022272931
	GM A	–	NW_026442069
	GM SK	–	NHTH01000041
	GM UK1	22	OY292304.1
Cecropin	GM UK2	–	CAUEHC010000413
	GM USA	–	NW_022274441
	GM A	–	NW_026442082
	GM G	–	NTHM01000002
Cecropin D-like peptide	GM SK	–	NHTH01000013
	GM UK1	14	OY292296
	GM UK2	–	CAUEHC010000302
	GM USA	–	NW_022269199
Defensin	GM A	–	NW_026442082
	GM G	–	NTHM01000002
	GM SK	–	NHTH01000013
	GM UK1	14	OY292296
Galiomicin	GM A	–	NW_026442068
	GM G	–	NTHM01000041
	GM SK	–	NHTH01000016
	GM UK1	5	OY292287
Gallerimicin	GM UK2	–	CAUEHC010001648
	GM USA	–	NW_022268635
	GM A	–	NW_026442068
	GM G	–	NTHM01000041
Gloverin	GM SK	–	NHTH01000016
	GM UK2	–	CAUEHC010002375
	GM USA	–	NW_022268635
	GM A	–	NW_026442060
Inducible serine protease inhibitor 2	GM G	–	NTHM01000022
	GM SK	–	NHTH01000073
	GM UK1	24	OY292306
	GM UK2	–	CAUEHC010000355
Lysozyme	GM USA	–	NW_022271647
	GM A	–	NW_026442020
	GM G	–	NTHM01000068
	GM SK	–	NHTH01000348
Proline-rich peptide 2	GM UK1	27	OY292309
	GM UK2	–	CAUEHC010000166
	GM USA	–	NW_022271652
	GM A	–	NW_026442013
16s rRNA	GM G	–	NTHM01000740
	GM SK	–	NHTH01000102
	GM UK1	6	OY292288
	GM UK2	–	CAUEHC010000113
16s rRNA	GM USA	–	NW_022273793
	GM A	–	NW_026442151
	GM G	–	NTHM01000015
	GM SK	–	NHTH01000018
16s rRNA	GM UK1	4	OY292286
	GM UK2	–	CAUEHC010002810
	GM USA	–	NW_022272931
16s rRNA	GM A	–	NC_028532
	GM SK	–	NHTH01000498
	GM UK1	mitochondion	OY292312
16s rRNA	GM USA	–	NC_028532

Note. A dash (–) indicates that chromosome data missing.

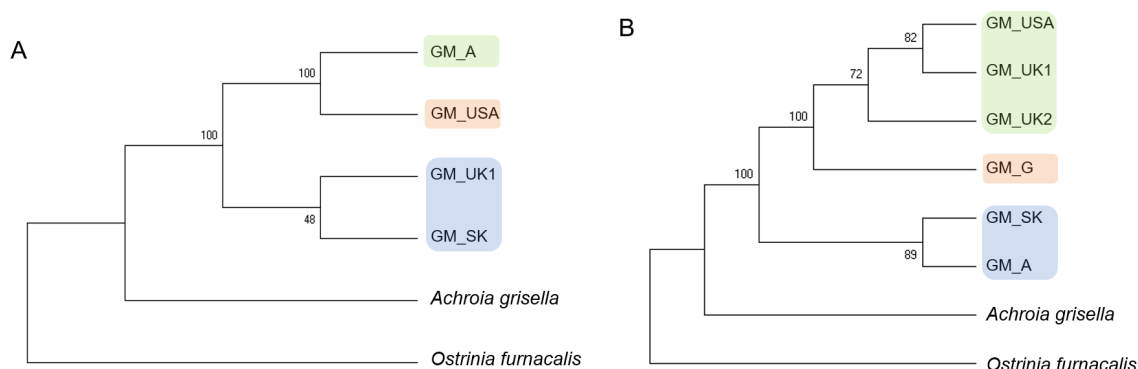


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные с использованием мишеней РНК и ДНК из изолятов *G. mellonella* из Великобритании (GM_UK1 и GM_UK2), Соединенных Штатов Америки (GM_USA), Южной Кореи (GM_SK), Австралии (GM_A) и Германии (GM_G). А – филогенетическое дерево, построенное с использованием 16S РНК; В – филогенетическое дерево с 11 мишенями ДНК, кодирующими антимикробные пептиды *G. mellonella*

Fig. 1. Phylogenetic trees constructed using RNA and DNA targets from *G. mellonella* isolates from United Kingdom (GM_UK1 and GM_UK2), Unites States of America (GM_USA), South Korea (GM_SK), Australia (GM_A) and Germany (GM_G). A – A phylogenetic tree constructed using 16S RNA; B – A phylogenetic tree with 11 DNA targets encoding antimicrobial peptides in *G. mellonella*

Тенденция ветвления филогенетических деревьев с использованием аминокислот АМП показала, что изоляты из Германии, Южной Кореи и Австралии образуют общую группу (гловерин, цекропин, цекропин D-подобный пептид, галлиомицин и аполифорицин), а Австралия образует одну отдельную группу (анионный пептид 1, богатый пролином пептид 1 и лизоцим) или Соединенные Штаты Америки, разделяющие группу с изолятом из Соединенного Королевства, за исключением дерева из цекропина, демонстрируя наиболее сложную дивергенцию клад для каждого изолята из двух стран (рис. 2). Согласно оценке индекса диспаратета для 8 из 11 доступных нуклеотидных последовательностей АМП была проведена оценка 3291 позиции по степени различий в смещениях базового состава между последовательностями. Для последовательностей из Южной Кореи и Австралии можно сказать, что они развивались с одинаковым паттерном замещения, в отличие от Соединенных Штатов Америки, Великобритании, Германии.

Большинство АМП являются катионными, обладают широким спектром антибактериальной и/или грибковой активности. По данным литературного поиска, лебоцин-подобный анионный пептид 1 обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий *M. luteus* и *L. monocytogenes* и противогрибковой активностью в отношении *A. niger* и *T. harzianum*. Цекропины являются линейными амфипатическими пептидами с α -спиральной структурой.

Цекропин-подобный пептид был впервые очищен из гемолимфы личинок *G. mellonella*, стимулированных иммунитетом. Он синтезируется из 22 аминокислот и дополнительным пропептидом из 4 остатков. Молекулярная масса пептида из 37 остатков составляет 4,16 кДа. Он имеет сходство с це-

кропинами А и В из *Hyalophora cecropia*, *Hyphantria cunea* и *Bombux mori*. Этот катионный пептид активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий.

В наборе транскриптомных данных было идентифицировано четыре различных цекропина. Они также включали цекропин А и D из гемолимфы *G. mellonella*. Пептид цекропина А проявляет эффективность *in vitro* против некоторых грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, видов *Leishmania*, *Entamoeba histolytica*. Его транскрипция стимулируется в эпителиальных клетках в присутствии живых бактерий [9]. Взаимодействие пептида Цекропина D с бактериальными клетками *E. coli* приводит к внутриклеточным повреждениям: потере многослойной структуры клеточной оболочки, образованию мембранных везикул и расширению периплазматического пространства, что в конечном итоге приводит к гибели бактерий [10]. Этот пептид массой 4,2 кДа активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против нитчатых грибов *Aspergillus niger*.

Дефенсин обладает противогрибковой активностью в отношении *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Corni fructus*, *Fusarium oxysporum*, *Pichia pastoris*, *Pachysolen tannophilus* и *Trichoderma harzianum* [11].

Морицин-подобные пептиды и гловерины интригующе ограничены отрядом Lepidoptera. Первые исследования впервые обнаружили пептиды у *B. mori*. У *G. mellonella* есть 8 генов, кодирующих 7 различных морицин-подобных пептидов (2 зрелых транскрипта идентичны). Они особенно активны против нитчатых грибов, а также в определенной степени против дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий и вирусов. Морицины относятся к амфипатическим α -спиральным анти-

микробным пептидам. Гловерины – это основные, термостабильные белки, обогащенные остатками глицина, но лишенные цистеинов. Антимикробная активность гловерина основана на взаимодействии с липополисахаридами бактерий и компонентами мембран грибов, а также способна инактивировать бакуловирусы. Гловерины впервые были обнаружены у шелкопряда *Hyalophora gloveri*. Среди иммуноиндуцированных транскриптов *G. mellonella* были идентифицированы 5 членов семейства гловеринов.

Основная функция пептидов, таких как галлеримицин и галиомицин, – противогрибковая. Галлеримицин был идентифицирован в 2003 году. Его выведенная аминокислотная последовательность демонстрирует сходство с противогрибковым пептидом дрозомицином из *D. melanogaster* и гелио-

мицином из *Heliothis virescens*. Рекомбинантный препротейн обладает 76 аминокислотами и имеет молекулярную массу 11,6 кДа. Рекомбинантный белок проявляет активность против энтомопатогенного грибка *M. anisopliae*. кДНК галиомицина состоит из 622 нуклеотидов и содержит открытую рамку считывания из 216 нуклеотидов, что соответствует препротейну с 72 остатками. Зрелый белок содержит 43 остатка и имеет молекулярную массу 4,7 кДа. Как и все дефенсины насекомых, он содержит 6 остатков цистеина, которые образуют 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. Он на 90,7 % идентичен гелиомицину. Этот защитный пептид проявляет активность против 2 нитчатых грибов и дрожжей, но не проявляет антибактериальной активности.

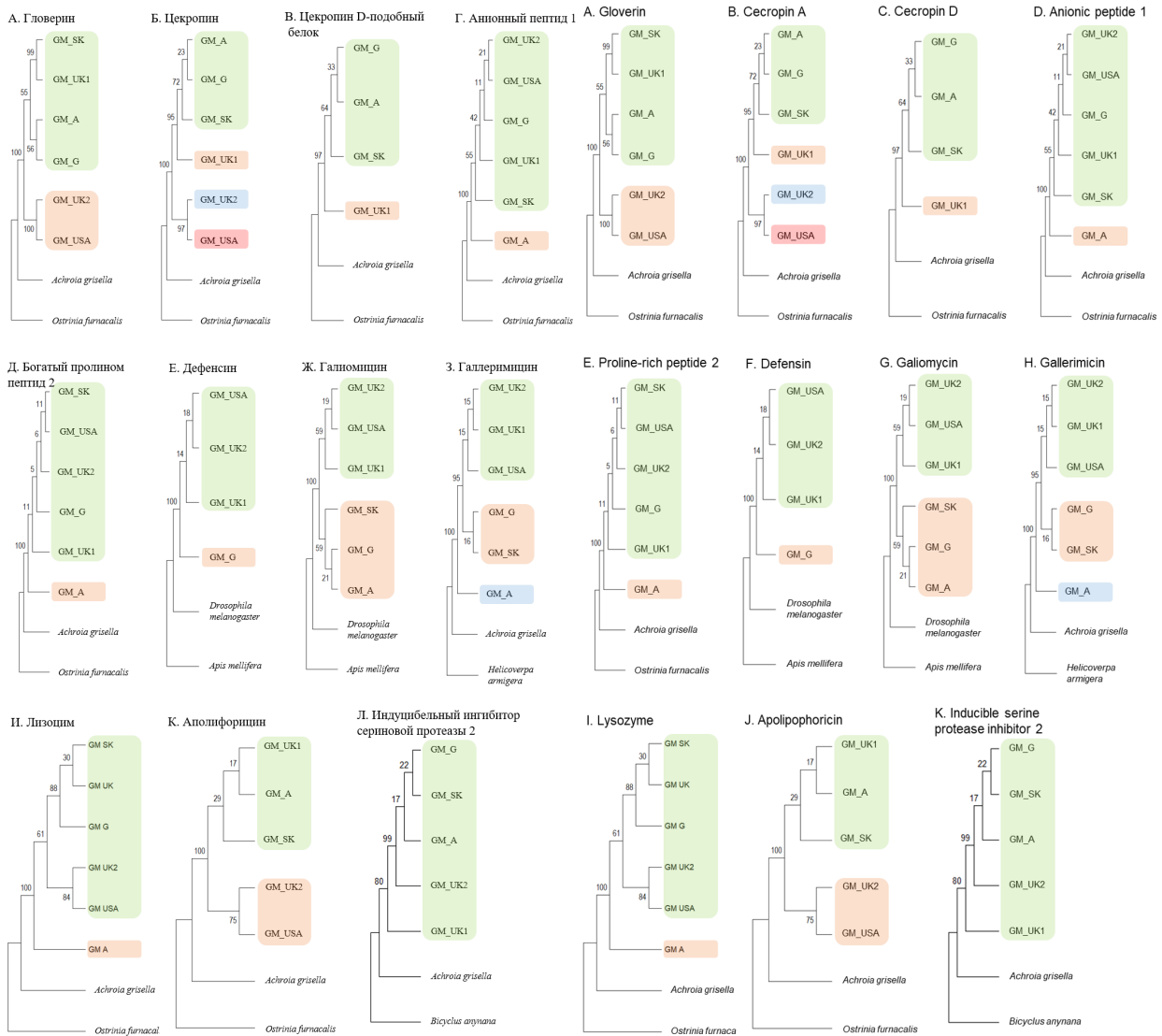


Рис. 2. Филогенетические деревья каждой из 11 ДНК-мишеней, кодирующих антимикробные пептиды *G. mellonella* из Великобритании (GM_UK1 и GM_UK2), Соединенных Штатов Америки (GM_USA), Южной Кореи (GM_SK), Австралии (GM_A) и Германии (GM_G)

Fig. 2. Phylogenetic trees from each of the 11 DNA targets encoding antimicrobial peptides in *G. mellonella* from the United Kingdom (GM_UK1 and GM_UK2), United States of America (GM_USA), South Korea (GM_SK), Australia (GM_A), and Germany (GM_G)

Пожалуй, одними из важных по своим функциям являются лизоцим и аполипофорин-III, оказывающие антибактериальное воздействие [12]. У некоторых насекомых, включая *Manduca sexta*, аполипофорин-III был впервые идентифицирован как белок, участвующий в транспорте липидов, который мобилизует диацилглицерины из жирового тела в мышцу крыла через гемолимфу. Кроме того, по данным авторов, этот белок является положительным регулятором развития плазмодий у комара *Anopheles stephensi*. Согласно другим исследованиям, структурные характеристики аполипофорин-III включают сегменты амфипатических α -спиралей, которые позволяют ему связывать нейтральные липиды как у прямокрылых, так и у чешуекрылых [13]. Значение аполипофорин-III *G. mellonella* в гуморальном иммунном ответе привело к обширным исследованиям этого белка. Когда восковая моль подвергается воздействию патогенных агентов, уровень этого белка массой 18 кДа повышается, что облегчает клеточные процессы, такие как инкапсуляция. Хотя связанный с липидами аполипофорин-III менее эффективен в связывании с липополисахаридами [14], существуют убедительные доказательства того, что структурная ассоциация аполипофорин-III с липидами способствует его иммуномодулирующим функциям. Кроме того, аполипофорин связывается с β -1,3-глюканами независимо от его структурной конформации и связи с липидами. Согласно другим исследованиям, этот опсонин демонстрирует высокую гомологию с аполипофорин-III млекопитающих, который принимает участие в иммунных процессах, таких как детоксикация ЛПС, стимулирует фагоцитоз и высвобождает оксид азота из тромбоцитов. Исследованиям об иммуностимулирующих функциях аполипофорин-III показали, что он способствует активности антимикробного пептида цекропина и увеличивает антибактериальную активность гемолимфы, а также производство гемоцитами супероксида. Также аполипофорин-III координируется с лизоцимом *G. mellonella*, усиливая пермеабилизирующее действие лизоцима против грамотрицательных бактерий. Индуцибельный ингибитор сериновой протеазы 2 ингибирует трипсин и токсиную протеазу PR2 *Metarhizium robertsii*. Маловероятно, что биологическая роль индуцибельных ингибиторов протеаз, выделенных из бесклеточной гемолимфы *G. mellonella*, ограничивается контролем протеаз, секретируемых инвазивными патогенами. Гормоны регулируют ингибирующую активность сериновых протеаз в гемолимфе изучаемых видов чешуекрылых, причем эта активность варьирует на разных стадиях развития. Усиление регуляции у *G. mellonella* во время окукливания может указывать на то, что эндогенные протеазы регулируются во время метаморфоза. Возможно, индуцибельный ингибитор сериновой протеазы 2 также регулирует

эндогенные протеазы, которые активируются в ответ на микробную инфекцию, в дополнение к ингибированию микробных протеаз [15].

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

В данном исследовании нам удалось обнаружить и провести анализ всех или части из найденных в генетических базах данных пептидов и белков, среди которых богатый пролином пептид 2, лебоцин-подобный анионный пептид 1, дефенсин, галиомицин, цекропин А-подобный пептид (цекропин А, цекропин), цекропин D-подобный пептид (цекропин D), аполипофорин, галеримицин и лизоцим. Однако в данном исследовании нам не удалось найти данные по аполипофорину-III, гемолину, катионному белку 8, белкам распознавания пептидогликана, некоторым морицинам и цекропинам, ингибитору металлопротеиназы, богатому пролином пептиду 2 и анионному пептиду 2. На данный момент известно, что иммунный ответ *G. mellonella*, который состоит как из клеточных, так и из гуморальных компонентов, является его основным преимуществом при исследовании взаимоотношений «патоген – хозяин». Гемоциты, которые участвуют в фагоцитозе, узелковании, инкапсуляции, свертывании крови и меланизации после обнаружения патогена, опосредуют клеточный ответ *G. mellonella*. Кроме того, иммунные клетки *G. mellonella* выделяют в гемолимфу растворимые эффекторные химические вещества, такие как опсонины, лизоцимы, феноксидаза, ингибиторы металлопротеиназ насекомых и антимикробные пептиды. Опсонины насекомых способны идентифицировать и связывать связанные с патогеном химические структуры, такие как β -1,3-глюканы, липополисахариды и липотейхоевая кислота. На данный момент у *G. mellonella* насчитывается четыре различных типа опсонов: гемолин, катионный белок 8, аполипофорин-III и белки распознавания пептидогликана. Цекропины, альфа-спиральные пептиды массой 4 кДа, которые в основном активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, и альфа-спиральные морицины, которые активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов, входят в число антимикробных пептидов, кодируемых геномом *G. mellonella*. Восемь генов кодируют морицины; четыре белка, идентифицированные как морицин А, В, С3 и D, были выделены из гемолимфы. Гловерины – это пептиды с высоким содержанием глицина, которые в первую очередь действуют против грамотрицательных бактерий. Транскриптом иммунизированных личинок был обнаружен в 2011 году, а весь их геном был секвенирован в 2018 году. С помощью транскриптомного анализа обнаружено пять транскриптов гловерина. К пептидам с преимущественно противогрибковым действием относятся те, которые имеют во вторичной структуре дисульфидные мостики, например галеримицин и

галиомицин. Кроме того, *G. mellonella* продуцирует два богатых пролином белка и два анионных пептида. Гемолимфа нестимулированных личинок содержит защитно-активные белки гемолимфы лизоцим и аполипофорин-III. Лизоцим представляет собой мурамидазу, которая разрушает связи в бактериальном пептидогликаниде между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамидной кислотой; однако было также показано, что этот белок обладает неферментативной противомикробной активностью. Одним из примеров многофункционального белка является аполипофорин-III, который участвует в доставке жирных кислот к мышцам во время полета. Кроме того, он действует как рецептор PPP и обладает антибактериальными свойствами. Действие антимикробных пептидов может стимулироваться обоими белками. Ингибитор металлопротеиназы насекомых – это один из наиболее интересных защитных химических веществ, обнаруженных у *G. mellonella*. Патогенные бактерии и грибы вырабатывают металлопротеиназы в гемолимфе для расщепления иммунологически значимых белков и пептидов. Дальнейшие исследования с генетическим материалом и генетическими базами данных должны решить проблему обнаружения перечисленных АМП и белков.

Благодаря пониманию генетического разнообразия можно облегчить анализ признаков для поиска выгодных генетических вариаций. Некоторые из АМП, использованных в этом исследовании, могут привести к образованию отдельных групп *G. mellonella*. Аллели генов, кодирующих АМП, исследованные среди зарегистрированных изолятов *G. mellonella*, демонстрируют наличие аминокислотного разнообразия АМП и, таким образом, потенциально разнообразия в конкретных молекулярных функциях кодируемых генов и характера их взаимодействия с патогенами и, следовательно, потенциального разнообразия в иммунном ответе хозяина. Хотя биоинформатический анализ может дать ценную информацию об изменчивости врожденного иммунного ответа, важно учитывать, что результаты могут не полностью отражать сложные взаимодействия внутри живого организма, такого как *Galleria mellonella*. Например, известно, что устойчивость *G. mellonella* меняется с возрастом личинки и зависит от многих факторов, таких как внешняя температура, гормоны и диета. Также появляется все больше сообщений о роли липидных медиаторов в модуляции иммунитета *G. mellonella*. Устойчивость *G. mellonella* также зависит от предыдущего опыта особей (механического или теплового стресса). Эти факторы, примененные до заражения, делают *G. mellonella* более устойчивой к дальнейшему заражению. Тепловой шок, примененный до заражения, по-разному модулирует определенные компоненты иммунного ответа *G. mellonella* после заражения *B. thuringiensis*. Экспрессия генов, кодирующих антимикробные пептиды,

повышена у предварительно подвергнутых шоку животных по сравнению с личинками, постоянно содержащимися при оптимальной температуре роста, в то время как экспрессия индуцибельного ингибитора сериновой протеазы 2 в жировом теле не была затронута. Количество аполипофорина III было немного выше у предварительно подвергнутых шоку животных. Антимикробные пептиды и аполипофорин III очень чувствительны к перевариванию бактериальными протеазами, и эта чувствительность снижается при тепловом шоке. Более сильный тепловой шок, применяемый к уже инфицированным насекомым, подавляет экспрессию генов, вызванных иммунной системой, но у личинок, оправившихся от теплового шока, экспрессия аполипофорина III выше, чем у инфицированных животных, не подвергавшихся воздействию повышенной температуры. С учетом того, что насекомые, использованные для генетического анализа, были взяты из разных типов экосистем и на разных этапах роста, вероятно и наличие ассоциированных изменений в последовательностях аминокислот, использованных в данном исследовании.

Несмотря на то что насекомые обладают только врожденной иммунной системой, которая лишена T-, B-клеток и антител, некоторые насекомые, подвергшиеся заражению низкими дозами микроорганизмов, более устойчивы к следующему заражению. Обнаружение рецепторов у *D. melanogaster*, которые перестраиваются после иммунного воздействия, позволяют мухе более эффективно реагировать на повторное заражение. Это явление называется иммунным праймингом, или обученным иммунитетом. Предварительное воздействие *S. albicans* или *S. cerevisiae* на *G. mellonella* приводит к повышению устойчивости насекомого к дальнейшей инъекции *S. albicans*. Прайминг *G. mellonella* был достигнут после инъекции иммунных элиситоров: глюкоана, ламинарина или убитых нагреванием бактерий. Иммунный прайминг также может быть трансгенерационным (25-е поколение личинок *G. mellonella* под селективным давлением *Beauveria bassiana* проявило устойчивость к этому патогену). Такая устойчивость включает передовую линию защиты (внешние покровы), поэтому личинки были лучше защищены от вторжения патогенов. Трансгенерационный иммунный прайминг *G. mellonella* может быть опосредован материнской передачей бактерий развивающимся яйцам. С учетом этого результаты, показавшие изменения в последовательностях аминокислот у разных популяций, могут быть потенциально связаны и с неумышленным и/или естественным иммунным праймингом *G. mellonella*. Дальнейшие лабораторные испытания с использованием биогеографически различных популяций данного насекомого помогут провести углубленное разделение на устойчивые и восприимчивые группы.

Библиографический список (References)

1. Gyssens I. C. Animal models for research in human infectious diseases. CMI editorial policy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019; 25: 649–650. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.04.010.
2. Cutuli M. A., Petronio G., Vergalito F., Magnifico I., Pietrangelo L., Venditti N., Di Marco R. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*. 2019; 10 (1): 527–541. DOI: 10.1080/21505594.2019.1621649.
3. Gunatilake M. History and development of laboratory animal science in Sri Lanka. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2018; 1 (1): 3–6. DOI: 10.1002/ame2.12003.
4. Ménard G., Rouillon A., Cattoir V., Donnio P. Y. *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11: 782733. DOI: 10.3389/fcimb.2021.782733.
5. Pereira M. F., Rossi C. C., da Silva G. C., Rosa J. N., Bazzolli D. M. S. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease*. 2020; 78 (8): ftaa056. DOI: 10.1093/femspd/ftaa056.
6. Ramirez J. L., Hampton K. J., Rosales A. M., Muturi E. J. Multiple mosquito AMPs are needed to potentiate their antifungal effect against entomopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 13: 1062383. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1062383.
7. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021; 38 (7): 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
8. Andrejko M., Mak P., Siemińska-Kuczer A., Iwański B., Wojda I., Suder P., Kuleta P., Regucka K., Cytryńska M. 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. *Journal of Insect Physiology*. 2021; 131: 104239. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2021.104239.
9. Vergis J., Malik S. V. S., Pathak R., Kumar M., Kurkure N. V., Barbudhe S. B., Rawool D. B. Exploring *Galleria mellonella* larval model to evaluate antibacterial efficacy of Cecropin A (1-7)-Melittin against multi-drug resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Pathogens and Disease*. 2021; 79 (3): ftab010. DOI: 10.1093/femspd/ftab010.
10. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Pawlikowska-Pawłęga B., Mak P., Luchowski R., Skrzypiec K., Mendyk E., Wydrych J., Gruszecki W. I., Cytryńska M. Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cepropin D with living bacterial cells. *Amino Acids*. 2019; 51: 175–191. DOI: 10.1007/s00726-018-2641-4.
11. Stączek S., Zdybicka-barabas A., Wojda I., Wiater A., Mak P., Suder P., Skrzypiec K., Cytryńska M. Fungal α -1,3-glucan as a new pathogen-associated molecular pattern in the insect model host *Galleria mellonella*. *Molecules*. 2021; 26 (16): 5097. DOI: 10.3390/molecules26165097.
12. Vertyporokh L., Kordaczuk J., Mak P., Hulaś-Stasiak M., Wojda I. Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*. *Journal of Insect Physiology*. 2019; 117: 103903. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.103903.
13. Ramírez-Sotelo U., García-Carnero L. C., Martínez-Álvarez J. A., Gómez-Gaviria M., Mora-Montes H. M. An ELISA-based method for *Galleria mellonella* apolipoprotein-III quantification. *PeerJ*. 2024; 12: e17117. DOI: 10.7717/peerj.17117.
14. Wijeratne T. U., Weers P. M. M. Lipid-bound apoLp-III is less effective in binding to lipopolysaccharides and phosphatidylglycerol vesicles compared to the lipid-free protein. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019; 458 (1–2): 61–70. DOI: 10.1007/s11010-019-03530-x.
15. Serrano I., Verdial C., Tavares L., Oliveira M. The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. *Antibiotics*. 2023; 12 (3): 505. DOI: 10.3390/antibiotics12030505.

Об авторе:

Николай Дмитриевич Шамаев, кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация; лаборант-исследователь, Казанская государственная медицинская академия – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России, Казань, Россия; старший преподаватель кафедры медицинской биологии и генетики, Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; ORCID 0000-0002-0575-3760, AuthorID 972199. E-mail: nikolay1157@gmail.com

Author's information:

Nikolay D. Shamaev, candidate of biological sciences, associate professor of the department of applied ecology, Institute of ecology and nature management, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia; laboratory research assistant, Kazan State Medical Academy – branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russia; senior lecturer, department of medical biology and genetics, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; ORCID 0000-0002-0575-3760, AuthorID 972199. E-mail: nikolay1157@gmail.com