

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 57.084.1

EDN: KHNKOH

<http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-169-178>



Моделирование инфекционного процесса у личинок *Galleria mellonella* для оценки антибактериального действия катионных пептидных соединений в условиях *in vivo*

Александр Николаевич Лобанов¹, Марина Владимировна Антипьева^{1, 2},
Дарья Владимировна Ерошенко¹, Татьяна Вячеславовна Полюдова¹

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика Д. Н. Прянишникова, Пермь, Россия

Автор, ответственный за переписку: Александр Николаевич Лобанов, lobanov.aleksandr.n@gmail.com

Аннотация. С использованием личинок большой восковой моли *Galleria mellonella* проведена сравнительная оценка вирулентности штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* M-2 и *Listeria welshimeri* Bel-19. Установлено, что все исследованные штаммы бактерий способны вызывать инфекционный процесс с изменением общего состояния личинок (меланизация, снижение подвижности, формирования коконов и гибель). Кроме того, выживаемость личинок понижалась с увеличением инфекционной дозы и зависела от массы личинки. Сравнительный анализ антибактериального действия катионных пептидных соединений (колистина и протамина) в условиях модельного организма показал, что колистин способствовал выживаемости 100% личинок, инфицированных *E. coli* ATCC 25922, а использование протамина увеличивало выживаемость личинок восковой моли после инфицирования *B. subtilis* ATCC 6633 и *L. innocua* M-2. Таким образом, личинки *G. mellonella* могут применяться как простая и экономичная модель для создания бактериального инфекционного процесса с последующей оценкой чувствительности бактерий к катионным пептидам в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: восковая моль, антибактериальная активность, катионные пептиды, колистин, протамин, бактериальная инфекция

Для цитирования: Моделирование инфекционного процесса у личинок *Galleria mellonella* для оценки антибактериального действия катионных пептидных соединений в условиях *in vivo* / А. Н. Лобанов, М. В. Антипьева, Д. В. Ерошенко, Т. В. Полюдова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2026. Т. 17, вып. 2. С. 169–178. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-169-178>.

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4). В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и веществ» ПФИЦ УрО РАН.

MICROBIOLOGY

Original article

Modeling of the infectious process in *Galleria mellonella* larvae to evaluate the antibacterial effect of cationic peptide compounds *in vivo*

Aleksandr N. Lobanov¹, Marina V. Antipeva^{1, 2}, Daria V. Eroshenko¹,
Tatyana V. Polyudova¹

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia

² Perm State Agro-Technological University named after academician D. N. Prianishnikov, Perm, Russia

Corresponding author: Aleksandr N. Lobanov, lobanov.aleksandr.n@gmail.com

Abstract. A comparative virulence assessment of *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* M-2, and *Listeria welshimeri* Bel-19 strains was conducted using the *Galleria mellonella* (greater wax moth) infection model. All tested strains were

capable of causing infection, altering the general condition of the larvae (melanization, decreased motility, and cocoon formation). Furthermore, the study demonstrated that larval survival decreased with increasing infectious dose of bacteria and depended on larval weight. A comparative analysis of the antibacterial activity of cationic peptide compounds (colistin and protamine) in a model organism revealed that colistin ensures 100% survival of larvae infected with *E. coli* ATCC 25922. Protamine increased the survival of wax moth larvae after infection with *B. subtilis* ATCC 6633 and *L. innocua* M-2 compared to the control. Thus, *G. mellonella* larvae can be used as a model for inducing infection and subsequently *in vivo* assessing bacterial sensitivity to cationic peptides.

Keywords: waxworm, antibacterial activity, cationic peptides, colistin, protamine, bacterial infection

For citation: Lobanov A. N., Antipeva M. V., Eroshenko D. V., Polyudova T. V. [Modeling of the infectious process in *Galleria mellonella* larvae to evaluate the antibacterial effect of cationic peptide compounds *in vivo*]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Vol. 17, iss. 2 (2026): pp. 169-178. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-169-178>.

Financing: the work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (124020500028-4). The work was carried out using the equipment of the Core Facilities Center “Research of materials and substances” at the PFRC UB RAS.

Введение

Бактериальные инфекции являются серьезной проблемой здравоохранения из-за появления и распространения бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [World Health Organization, 2022]. Данный факт обуславливает актуальность поиска и разработки новых противомикробных средств. Определение терапевтического потенциала новых соединений начинается со скрининга активности *in vitro*. При этом решающий этап взаимодействия пептида с мишенью происходит в модельной среде, которая сильно отличается от реальной среды живого организма. Мишени атакуемой микробной клетки имеют множество конформаций, на которые влияет окружающая среда. Все перечисленное может привести к расхождениям между активностью соединения в условиях *in vitro* и *in vivo*. Поэтому оценка антимикробной активности новых соединений или уже известных соединений, но с еще не установленными антибактериальными свойствами, является важным этапом исследования.

Личинки большой восковой моли (*Galleria mellonella*) в последние десятилетия широко используются в качестве модели для изучения инфекции и оценки антимикробной активности [Piatek, Sheehan, Kavanagh, 2020; Dinh et al., 2021]. Выбор данной модели, альтернативной позвоночным животным, обусловлен концепцией 3R об использовании позвоночных животных в научных экспериментах («Replacement, reduction and refinement of animal testing») [Гайдерова и др., 2025]. Помимо природных патогенных для *G. mellonella* микроорганизмов, таких как микромицеты *Beauveria bassiana* [Vertyporokh, Hulas-Stasiak, Wojda, 2020], личинки этих насекомых широко используются в качестве модели инфекций, вызываемых бактериями-патогенами человека и животных, а также для оценки эффективности новых противомикробных препаратов перед проведением доклинических исследований на млекопитающих [Asai et al., 2023; White, Sykes, Kumar, 2025]. При этом *G. mellonella* имеет ряд преимуществ перед моделями млекопитающих, поскольку не требует этического одобрения, легко поддается манипуляциям и имеет более низкую стоимость. Кроме того, личинки в большом количестве могут быть получены в лабораторных условиях, что обеспечивает быстрое проведение значительного количества экспериментов [Serrano et al., 2023].

Врожденная иммунная система *G. mellonella* неспецифична и является первой линией защиты от микробов, поддерживает гомеостаз и профилактирует инфекции. Она включает как клеточную (фагоцитоз, образование узелков и инкапсуляция), так и гуморальную защиту (меланизация, свертывание гемолимфы и производство антимикробных пептидов). Все перечисленное указывает на высокую степень структурного и функционального сходства с иммунной системой млекопитающих [Hoffmann, 1995]. Отсутствие адаптивного иммунитета у *G. mellonella* и других насекомых является преимуществом, поскольку позволяет изучать взаимодействие хозяина и патогена без вмешательства адаптивных ответов [Kavanagh, Sheehan, 2018]. Ввиду перечисленных свойств, личинки *G. mellonella* в настоящее время стали популярной моделью для изучения токсичности соединений и эффективности противомикробных препаратов *in vivo*, которые позволяют получить представление о вероятной дозе и потенциальном эффекте на млекопитающих [Hofkens et al., 2023].

Целью данной работы явилось моделирование инфекционного процесса у личинок большой восковой моли с последующим воздействием на них катионных пептидных соединений.

Материалы и методы

Объекты исследования. В работе использованы личинки восковой моли *Galleria mellonella*, которые были получены из учебно-научного центра «Экологии и морфофизиологии медоносной пчелы» ФГБОУ

ВО Пермский ГАТУ. В качестве инфекционного агента были использованы грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, а также грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 (получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»). Для получения накопительных культур бактерии культивировали в жидкой питательной среде Luria Broth (LB) («Норбио», Китай) в течение ночи при 37°C, после чего клетки дважды отмывали в 10 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7.2), осадки суспендировали в питательной среде до $\sim 10^6$ – 10^8 КОЕ/мл. Количество колониеобразующих единиц в суспензиях определяли методом десятичных разведений и последующих точечных высевов на агаризованные чашки Петри [Веслополова, 1995].

Бабочки и личинки *G. mellonella* содержались при температуре 28–30°C в 3-литровых стеклянных банках, закрытых мелкоячеистой сеткой. В качестве корма использовали отработанные пчелиные соты. Использовали личинки массой 150–220 мг, для ряда экспериментов калибровали их по массе путем взвешивания на аналитических весах («Ohaus», Китай). За сутки до проведения эксперимента отобранные личинки выдерживали в термостате при 37°C на искусственном субстрате следующего состава: мед (11 г), воск (11 г), глицерин (10 г), сухие дрожжи (10 г), отруби пшеничные (20 г), кукурузная мука (20 г), пшеничная мука (10 г), сухое молоко (10 г) [Коновалова, 2009]. Все компоненты за исключением сухого молока, подвергали стерилизации автоклавированием при 1 атм 30 мин [Осокина, Колбина, Гуштин, 2016]. Распределение животных на группы по 10–20 личинок в каждой проводили методом слепой рандомизации.

В работе оценивали антибактериальное действие катионных соединений: пептидный антибиотик колистин (Sigma, США) и пептидное соединение сульфат протамина (1%, 850 ЕД/мл) (СОАО «Ферейн», Беларусь). Исходные растворы колистина и протамина концентрацией 0.1 мг/мл в деионизованной воде стерилизовали фильтрованием через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.22 мкм («Labfil® Economy Nylon», Китай).

Моделирование инфекционного процесса. Перед инфицированием гусениц помещали в чистые чашки Петри и выдерживали при 2–6°C в течение 4 ч для обеспечения анестезии. После обездвиживания гусениц холодом им вводили по 10 мкл приготовленной суспензии бактерий. Введение бактерий проводили путем инъекции в левую последнюю ложноножку с помощью инсулиновых шприцев иглой 30G (0.3 мм) («BD» Micro-FinePlusDemiU-100», США). После инфицирования личинки переносили в стерильные чашки Петри и помещали в термостат при 37°C. Для изучения влияния бактерий на развитие инфекционного процесса использовали личинки массой 150–220 мг, инфицированные суспензиями *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *P. fluorescens* ATCC 948, *B. subtilis* ATCC 6633, *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 в дозе 10^5 КОЕ/личинку.

Для оценки влияния инфекционной дозы на выживаемость личинок использовали 3 группы из 10–20 личинок для каждого вида бактерий, которые инфицировали 10 мкл бактериальной суспензии, содержащей 1×10^6 , 1×10^7 и 1×10^8 КОЕ/мл.

Исследование влияния массы личинок на их выживаемость после инфицирования бактериями *E. coli* ATCC 25922, *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 проводили на трёх группах личинок, отличающихся по массе (159 ± 10 , 185 ± 4 и 210 ± 7 мг), каждая из групп включала не менее 10 особей. После завершения испытаний все инфицированные личинки выводились из эксперимента путем помещения в морозильную камеру при –20 °C на 20–24 ч с последующим погружением в 96% раствор этилового спирта на 24 ч для дезинфекции.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) соединений. Определение чувствительности бактерий к исследуемым соединениям проводили методом последовательных двукратных микроразведений в 96-луночных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия) [Определение чувствительности..., 2024]. В лунки планшета вносили по 100 мкл питательной среды Muller-Hinton (BD, США), затем в первую лунку ряда вносили 100 мкл раствора колистина или протамина с исходной концентрацией 0.1 мг/мл, и проводили серию двукратных разведений, после чего в каждую лунку добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии, содержащей 10^6 КОЕ/мл. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C 18–20 ч. По окончании инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл 2,3,5-трифенилтетразолия х. (ТТХ, 10 мг/мл) и инкубировали 20–30 мин до развития окраски, обусловленной метаболически активными клетками. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) соединения принимали наименьшую концентрацию исследуемого соединения, при которой не выявлялся видимый рост бактерий.

Определение лечебного эффекта соединений *in vivo*. Обработку личинок проводили через 1 ч после введения бактерий *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633 или *L. innocua* M-2 в дозе 10^5 КОЕ/личинка и 1 ч анестезии при 2–6°C путем инъекции раствора исследуемого соединения в объеме 10 мкл в правую последнюю ложноножку. Контрольной группе личинок вводили по 10 мкл буферного раствора. Наблю-

дение за гусеницами осуществляли каждые 24 ч в течение 3 сут. После завершения испытаний инфицированные личинки выводились из эксперимента, как указано выше.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были проведены в 3–5 кратной повторности. Статистическая обработка результатов проведена с помощью компьютерной программы «GraphPad Prism», при этом производили расчет средних значений и доверительных интервалов при $p=0.05$. Анализ выживаемости личинок *G. mellonella* проводили путем построения кривых Каплана – Мейера.

Результаты и их обсуждение

Влияние бактерий на выживаемость личинок *G. mellonella*. Известно, что у личинок *G. mellonella* после введения им некоторых бактерий развивается инфекционный процесс, который может заканчиваться гибелью личинок [Champion, Wagley, Titball, 2016; Asai et al., 2023]. В рамках настоящей работы проведен сравнительный анализ жизнеспособности личинок после воздействия грамотрицательных (двух штаммов *E. coli* и *P. fluorescens* ATCC 948) и грамположительных (*B. subtilis* ATCC 6633 и *Listeria* spp.) бактерий (рис. 1).

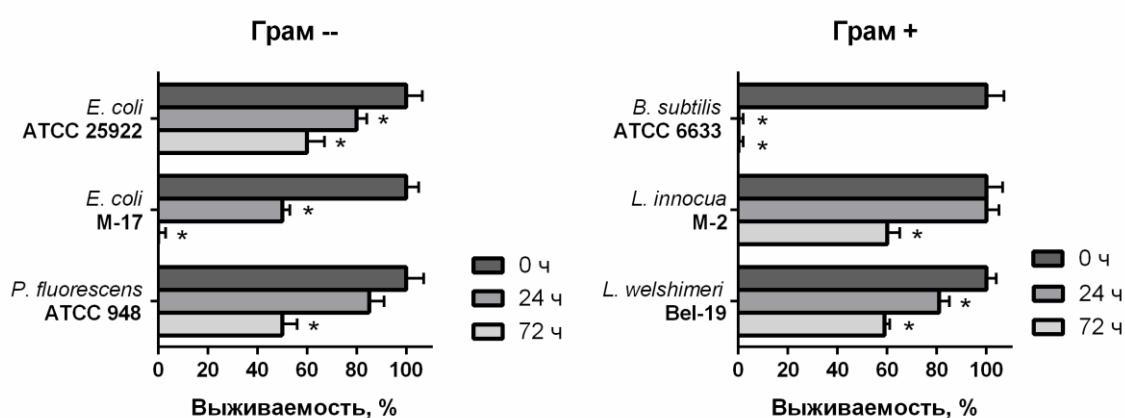


Рис. 1. Выживаемость личинок *G. mellonella* после их инфицирования бактериями *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *P. fluorescens* ATCC 948, *B. subtilis* ATCC 6633, *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19.

* – достоверное отличие от значения в 0 ч

[Survival of *G. mellonella* larvae after their infection with *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17, *P. fluorescens* ATCC 948, *B. subtilis* ATCC 6633, *L. innocua* M-2, and *L. welshimeri* Bel-19, * – significant difference from the value at 0 h]

Клетки всех исследованных штаммов, введенные в гемолимфу личинкам в количестве 10^5 КОЕ/личинка, приводили к гибели *G. mellonella* (рис. 1). Примерно 50% личинок восковой моли, зараженных *E. coli* ATCC 25922 и *P. fluorescens* ATCC 948, погибло через 3 сут. Клетки *E. coli* M-17 были более вирулентными по сравнению *E. coli* ATCC 25922 и вызывали гибель всех личинок в выборке через 72 ч. Наиболее агрессивными для *G. mellonella* оказались грамположительные бактерии *B. subtilis* ATCC 6633, введение которых сопровождалось гибелью всех личинок уже через 24 ч после инфицирования. Динамика гибели личинок после инфицирования *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 была схожей и приводила к гибели примерно 40% особей в выборке через 72 ч.

После инфицирования у личинок *G. mellonella* наблюдалось изменение фенотипических признаков (рис. 2). У инфицированных личинок через несколько часов регистрировалось снижение подвижности и меланизация (потемнение), отсутствовало формирование коконов (рис. 2Б). Полностью меланизированные личинки, как правило, всегда погибали, однако меланизация концов тела (переднего и/или заднего) не всегда означала, что личинка погибнет.

Влияние инфицирующей дозы на выживаемость личинок *G. mellonella*. Согласно опубликованному исследованию, инфицирующая доза для большинства изученных грамположительных и грамотрицательных бактерий составляет от 1.5×10^4 КОЕ/личинка до 10^6 КОЕ/личинка [Chen, Keddie, 2021]. При этом установлено, что выживаемость бактерий напрямую зависит от дозы [Mukherjee et al., 2010; Hesketh-Best et al., 2021]. В настоящем исследовании также изучено развитие инфекционного процесса после введения различных доз исследуемых штаммов (рис. 3).



Рис. 2. Личинки *G. mellonella* до инфицирования (А) и через 18 ч после введения *L. innocua* М-2 (Б)
 [*G. mellonella* larvae before infection (A) and 18 h after injection with *L. innocua* M-2 (Б)]

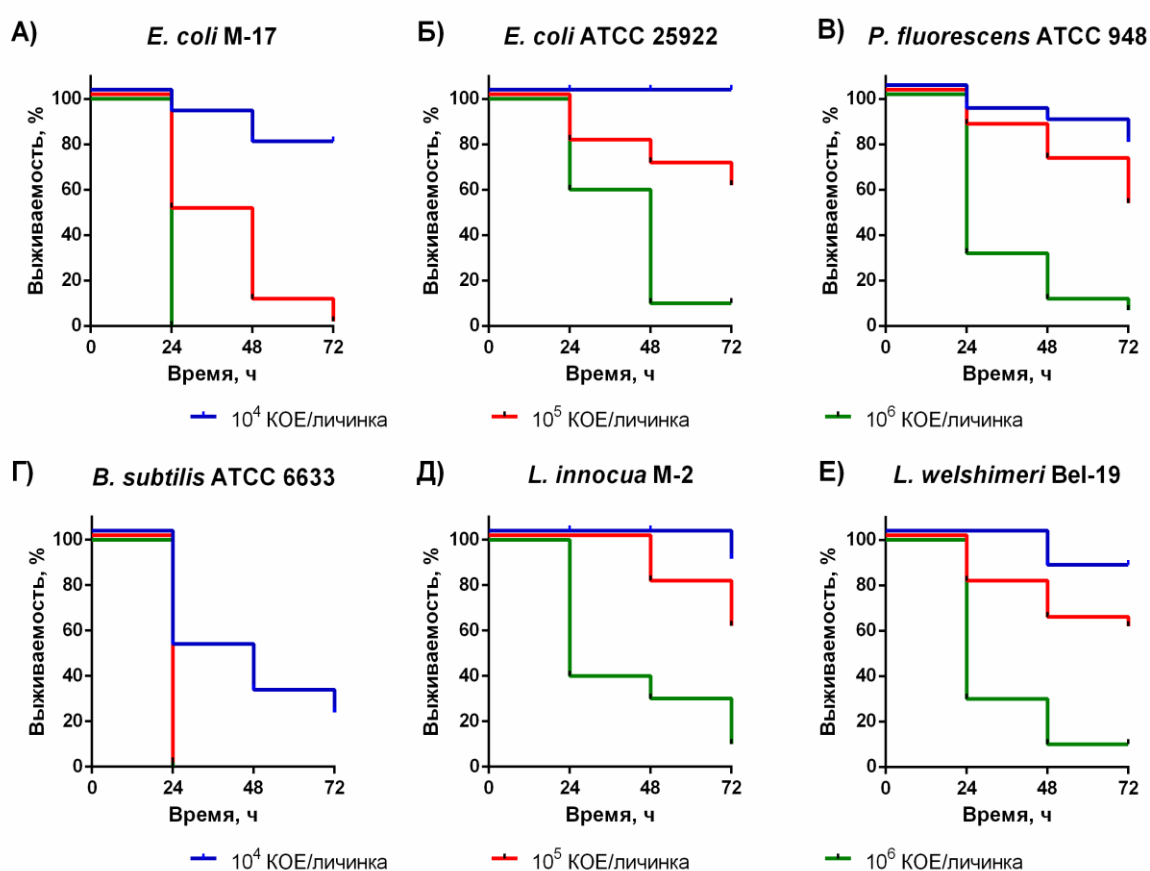


Рис. 3. Выживаемость личинок *G. mellonella* после их инфицирования бактериями *E. coli* ATCC 25922 (А), *E. coli* М-17 (Б), *P. fluorescens* ATCC 948 (В), *B. subtilis* ATCC 6633 (Г), *L. innocua* М-2 (Д) и *L. welshimeri* Bel-19 (Е) в различных дозах (10^4 – 10^6 КОЕ/личинка)

[Survival of *G. mellonella* larvae after their infection with *E. coli* ATCC 25922 (A), *E. coli* M-17 (Б), *P. fluorescens* ATCC 948 (В), *B. subtilis* ATCC 6633 (Г), *L. innocua* M-2 (Д) и *L. welshimeri* Bel-19 (Е) in various doses (10^4 – 10^6 CFU/larva)]

Введение суспензии клеток *E. coli* М-17 в минимальной исследованной дозе приводило к гибели 20% личинок, при этом увеличение количества бактерий в 10 и 100 раз привело к полной гибели личинок через 72 ч и 24 ч после введения соответственно (рис. 3А). При этом другой штамм *E. coli* ATCC 25922 был менее вирулентным и не вызывал гибель личинок в дозе 10^4 КОЕ/личинка (рис. 3Б). Дальнейшее увеличение количества вводимых бактерий приводило к более выраженному эффекту, так, введение 10^6 КОЕ/личинка приводило к 90%-ной гибели через 48 ч. Динамика гибели личинок после введения

P. fluorescens ATCC 948 была практически идентичной таковой после введения *E. coli* ATCC 25922 (рис. 3В), что согласуется с ранее проведенными исследованиями [Malmquist, Rogan, McGillivray, 2019; Chen, Keddie, 2021].

Инфицирование личинок клетками *B. subtilis* ATCC 6633 также приводило к гибели насекомых дозозависимым образом (рис. 3Г). Полная гибель личинок происходила через 24 ч после введения им суспензии бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 начиная с дозы 10^5 КОЕ/личинка. Снижение количества вводимых бактерий способствовало лучшему выживанию *G. mellonella*. Динамика гибели личинок после инфицирования *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 была сходной, при этом наблюдалась гибель 90% личинок после введения им листерий в максимальной исследованной дозе (10^6 КОЕ/личинка) через 72 ч и 48 ч соответственно (рис. 3Д, Е). Снижение дозы вводимых бактерий в 10 раз приводило к выживанию 40% личинок. Согласно данным литературы, даже непатогенные штаммы листерий, такие как *L. innocua*, могут вызывать септическую гибель личинок большой восковой моли при высокой дозе инфицирования (10^7 КОЕ/личинка), однако при меньших дозах (10^6 КОЕ/личинка) бактериальные клетки могут быть связаны клеточными рецепторами, распознающими пептидогликан бактерий, что приводит к активации врожденной иммунной системы и элиминации бактерий [Mukherjee et al., 2010].

Влияние массы личинок на их выживаемость после инфицирования. Была проведена серия экспериментов по изучению устойчивости личинок к бактериальной инфекции в зависимости от их массы. С этой целью использовали выборки личинок восковой моли со средней массой 159 ± 10 , 185 ± 4 и 210 ± 7 мг, которые были инфицированы бактериями *E. coli* ATCC 25922, *L. innocua* M-2 и *L. welshimeri* Bel-19 в количестве 10^5 КОЕ/личинка (рис. 4).

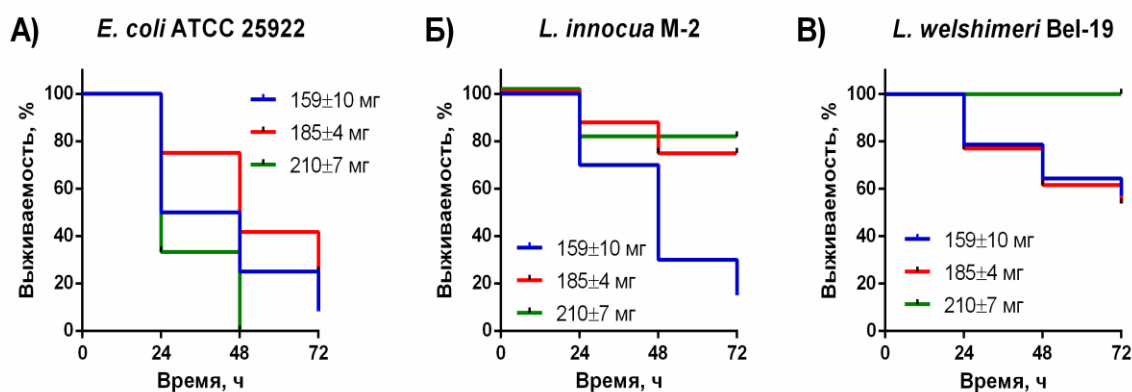


Рис. 4. Выживаемость личинок *G. mellonella* различной массы после их инфицирования бактериями *E. coli* ATCC 25922 (А), *L. innocua* M-2 (Б), *L. welshimeri* Bel-19 (В)

[Survival of *G. mellonella* larvae of varying weights after their infection with *E. coli* ATCC 25922 (А), *L. innocua* M-2 (Б), *L. welshimeri* Bel-19 (В)]

Введение грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922 приводило к гибели личинок, причем наиболее чувствительными были личинки с наибольшей средней массой (210 мг) (рис. 4А). Личинки с меньшей массой были более жизнеспособны, при этом была отмечена гибель 75% личинок массой 185 мг через 72 ч после введения. Аналогичный эффект был ранее отмечен для личинок массой более 260 мг при инфицировании *Staphylococcus aureus*, в связи с чем было высказано предположение, что более крупные личинки старше и ближе к окукливанию, чем личинки меньших весовых групп [Jorjão et al., 2018; Hesketh-Best et al., 2021]. Для тутового шелкопряда было показано, что при развитии личинок наблюдаются существенные динамические метаболомные изменения в гемолимфе, которые затрагивают множество метаболических путей и могут влиять на иммунитет насекомых [Zhou et al., 2015].

Бактерии *L. innocua* M-2 (рис. 4Б) были более агрессивными для личинок восковой моли средним весом 159 и 210 мг, по сравнению с *L. welshimeri* Bel-19 (рис. 4В). Однако, в отличие от инфицирования *E. coli*, при введении листерий личинки со средней массой 210 мг показали наибольшую выживаемость по сравнению с личинками меньшей массы. Наиболее выраженный инфекционный процесс, вызванный бактериями рода *Listeria*, наблюдался у гусениц с наименьшей средней массой 159 мг, вызывая гибель 40–85% личинок. Показано, что голодание и, как следствие, снижение массы может снижать устойчивость *G. mellonella* к инфицированию из-за сокращения продукции внутриклеточных пептидов и количества циркулирующих гемоцитов [Banville, Browne, Kavanagh, 2012]. Кроме того, развитие инфекционного процесса зависит от объема циркулирующей жидкости и соответствующей бактериальной дозы [Andrea, Krogfelt, Jenssen, 2019].

Чувствительность бактерий к антимикробным пептидам. Для исследования антибактериального действия в условиях *in vivo* был выбран пептидный антибиотик колистин, относящийся к антибиотикам последнего резерва для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [World Health Organization, 2022], а также катионный пептид протамин, являющийся специфическим антагонистом гепарина, у которого были обнаружены антибактериальные свойства [Ookubo et al., 2024]. Выбранные соединения были протестированы методом двукратных разведений в отношении *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633 и *L. innocua* M-2 для определения МИК. Все исследованные соединения обладали антибактериальной активностью в отношении исследованных бактерий в условиях *in vitro* (табл.). Грамотрицательные бактерии *E. coli* ATCC 25922 были более устойчивы к действию протамина, но обладали высокой чувствительностью к колистину, тогда как МИК протамина в отношении грамположительных культур было в 2–4 раза меньше, чем в отношении *E. coli* ATCC 25922.

Минимальные ингибирующие концентрации катионных соединений (МИК, мкг/мл)
[Minimum inhibitory concentrations of cationic compounds (MIC, µg/ml)]

Бактериальные культуры	Колистин	Протамин
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.78	25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	25	6.25
<i>L. innocua</i> M-2	25	12.5

Антибактериальное действие соединений в условиях *in vivo*. Антибактериальное действие ряда катионных пептидов было ранее протестировано в условиях модельного организма – восковой моли *G. mellonella*, по результатам которого эта модель показала надежные и воспроизводимые результаты [Hofkens et al., 2023]. Поэтому мы изучили действие колистина в отношении бактерий *E. coli* ATCC 25922, а также протамина в отношении бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *L. innocua* M-2 после их введения личинкам *G. mellonella* (рис. 5).

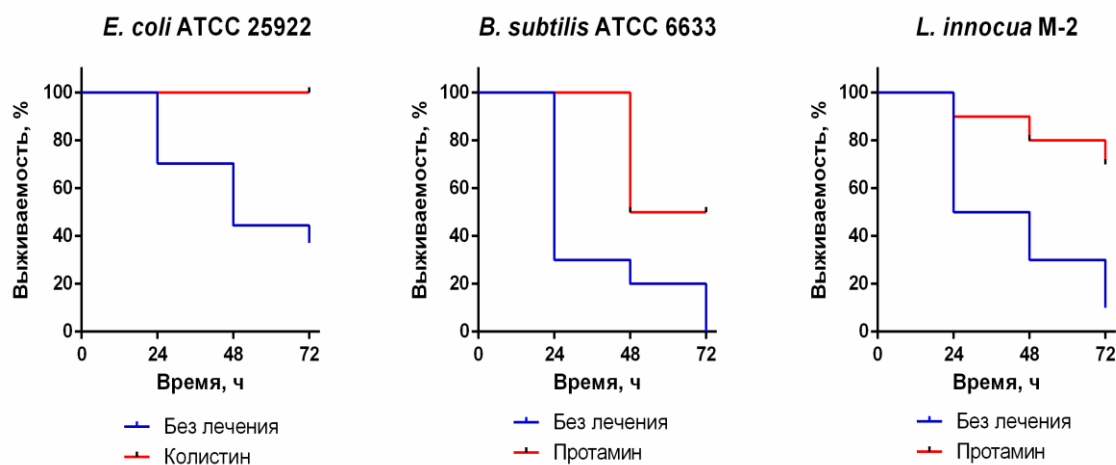


Рис. 5. Выживаемость личинок *G. mellonella* после их инфицирования *E. coli* ATCC 25922 (10^5 КОЕ/личинка) и введения колистина (0.78 мкг/личинку) (А), *B. subtilis* ATCC 6633 (Б) и *L. innocua* M-2 (В) после введения протамина (6.25 и 12.5 мкг/личинка)

[Survival of *G. mellonella* larvae after their infection with *E. coli* ATCC 25922 (10^5 CFU/larva) and treatment with colistin (2 µg/larva) (A), *B. subtilis* ATCC 6633 (B) and *L. innocua* M-2 (C) after the introduction of protamine (6.25 and 12.5 µg/larva)]

При введении колистина гусеницам, инфицированным *E. coli* ATCC 25922, уровень выживания личинок составлял 100% в течение всего периода наблюдения, тогда как без введения препарата наблюдалось снижение жизнеспособности на 30–60%. После инфицирования бактериями *B. subtilis* ATCC 6633 наблюдалась 100% гибель личинок, тогда как введение протамина способствовало выживанию 50% особей. Воздействие протамина на *L. innocua* M-2 в условиях *in vivo* также способствовало выживанию 70% особей в выборке, тогда как в отсутствие лечения наблюдалась гибель 90% личинок.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что все исследованные бактерии вызвали инфекционный процесс у личинок большой восковой моли, при этом дозу введения необходимо регулировать в зависимости от вида и штамма бактерий. Кроме того, большое значение для анализа степени инфицирования личинок *G. mellonella* имеет средняя масса гусениц в выборке. Установлено, что катионные пептидные соединения (колистин и протамин) проявляют антибактериальное действие в условиях модельного организма в отношении протестированных штаммов бактерий, о чем свидетельствует повышение выживаемости инфицированных бактериями гусениц *G. mellonella* после введения им антибактериальных соединений.

Таким образом, использование личинок *G. mellonella* в качестве инфекционной модели для оценки эффективности антибактериальных соединений в условиях *in vivo* характеризуется относительной простотой и экономичностью анализа, что позволяет ускорить определение потенциальных терапевтических доз для млекопитающих при проведении доклинических испытаний новых противомикробных средств.

Список источников

1. Веслополова Е.Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология. 1995. Т. 64, № 2. С. 279–284.
2. Гайдерова Л.А. и др. Реализация концепции 3Rs при контроле качества биологических препаратов: современное состояние и перспективы (обзор) // Безопасность и риск фармакотерапии. 2025. Т. 13(2). С. 229–239. DOI: 10.30895/2312-7821-2025-13-2-229-240. EDN: KAQUZG
3. Коновалова Т.В. Лабораторное содержание и разведение большой восковой огневки *Galleria mellonella* L. // Российский ветеринарный журнал. 2009. № 4. С. 45–47. EDN: PGQJDP
4. Осокина А.С., Колбина Л.М., Гушин А.В. Влияние кормления и условий содержания на рост личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella* L.) // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30, № 7. С. 88–92. EDN: WJXNYX
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Российские рекомендации. Версия 2024-02 / МАКМАХ, СГМУ: Смоленск, 2024. 192 с.
6. Andrea A., Krogfelt K.A., Jenssen H. Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery // Microorganisms. 2019. Vol. 7(3). Art. ftab85. DOI: 10.3390/microorganisms7030085.
7. Asai M. et al. *Galleria mellonella*-intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs // FEMS Microbiol. Rev. 2023. Vol. 47(2). Art. fuad011. DOI: 10.1093/femsre/fuad011. EDN: PBWDQO
8. Banville N., Browne N., Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection // Virulence. 2012. Vol. 3, № 6. P. 497–503. DOI: 10.4161/viru.21972.
9. Champion O.L., Wagle S., Titball R.W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research // Virulence. 2016 Vol. 7(7). P. 840–5. DOI: 10.1080/21505594.2016.1203486.
10. Chen R.Y., Keddie B.A. The *Galleria mellonella*-enteropathogenic *Escherichia coli* model system: characterization of pathogen virulence and insect immune responses // J. Insect Sci. 2021. Vol. 21(4). Art. 7. DOI: 10.1093/jisesa/ieab046. EDN: UYWYR
11. Dinh H. et al. Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age // Pathog. Dis. 2021. Vol. 79(2). Art. ftab006. DOI: 10.1093/femspd/ftab006. EDN: TKXTAQ
12. Hesketh-Best P.J. et al. *Galleria mellonella* larvae exhibit a weight-dependent lethal median dose when infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Pathogens and disease. 2021. Vol. 79, № 2. Art. ftab003. DOI: 10.1093/femspd/ftab003. EDN: GKKTAB
13. Hoffmann J.A. Innate immunity of insects // Curr. Opin. Immunol. 1995. Vol. 7(1). P. 4–10. DOI: 10.1016/0952-7915(95)80022-0.
14. Hofkens N. et al. Microbisporicin (NAI-107) protects *Galleria mellonella* from infection with *Neisseria gonorrhoeae* // Microbiol. Spectr. 2023. Vol. 11(6). Art. e0282523. DOI: 10.1128/spectrum.02825-23. EDN: CPQYFJ
15. Jorjão A.L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies // Virulence. 2018. Vol. 9. P. 383–389. DOI: 10.1080/21505594.2017.1397871.
16. Kavanagh K., Sheehan G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest // J. Fungi (Basel). 2018. Vol. 4(3). Art. 113. DOI: 10.3390/jof4030113.
17. Malmquist J.A., Rogan M.R., McGillivray S.M. *Galleria mellonella* as an infection model for *Bacillus anthracis* Sterne // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. Vol. 9. Art. 360. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00360.
18. Mukherjee K. et al. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76(1). P. 310–317. DOI: 10.1128/AEM.01301-09. EDN: NYONEB

19. Ookubo M. et al. “Rich arginine and strong positive charge” antimicrobial protein protamine: From its action on cell membranes to inhibition of bacterial vital functions // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2024. T. 1866, № 5. Art. 184323. DOI: 10.1016/j.bbamem.2024.184323. EDN: NYWNRO
20. Piatek M., Sheehan G., Kavanagh K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying *in vivo* activity of conventional and novel antimicrobial agents // *Pathog. Dis.* 2020. Vol. 78(8). Art. ftaa059. DOI: 10.1093/femspd/ftaa059. EDN: TTMTSY
21. Serrano I. et al. The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation // *Antibiotics (Basel)*. 2023. Vol. 12(3). Art. 505. DOI: 10.3390/antibiotics12030505. EDN: ITADWL
22. Vertyporokh L., Hufas-Stasiak M., Wojda I. Host-pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana* // *Insect Sci.* 2020. Vol. 27(5). P. 1079–1089. DOI: 10.1111/1744-7917.12706. EDN: ZKIICX
23. Wang G. et al. APD6: the antimicrobial peptide database is expanded to promote research and development by deploying an unprecedented information pipeline // *Nucleic Acids Res.* 2026. Vol. 54(D1). P. 363–374. DOI: 10.1093/nar/gkaf860.
24. White D., Sykes E.M.E., Kumar A. *Galleria mellonella* as an infection and antibiotic treatment model for *Acinetobacter baumannii* // *J. Vis. Exp.* 2025. № 221. Art. e68625. DOI: 10.3791/68625. EDN: WCGDLI
25. World Health Organization. The WHO AWaRe (access, watch, reserve) antibiotic book. World Health Organization, 2022.
26. Zhou L. et al. Developmental changes for the hemolymph metabolome of silkworm (*Bombyx mori* L.) // *J. Proteome Res.* 2015. Vol. 14(5). P. 2331–2347. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00159.

References

1. Veslopolova E.F. [Micromethod for determining the number of colony-forming microorganisms]. *Mikrobiologija*. V. 64, No. 2 (1995): pp. 279-284. (In Russ.).
2. Gaiderova L.A. et al. [Implementation of the 3Rs concept in quality control of biological products: current state and prospects (review)]. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. V. 13(2) (2025): pp. 229-239. (In Russ.). DOI: 10.30895/2312-7821-2025-13-2-229-240. EDN: KAQUZG
3. Konovalova T.V. [Laboratory maintenance and breeding of the greater wax moth *Galleria mellonella* L.]. *Rossijskij veterinarnyj žurnal*. No. 4 (2009): pp. 45-47. (In Russ.). EDN: PGQJDP
4. Osokina A.S., Kolbina L.M., Gushchin A.V. [Effect of feeding and maintenance conditions on the growth of larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella* L.)]. *Dostizhija nauki i tehniki APK*. V. 30, No. 7 (2016): pp. 88-92. (In Russ.). EDN: WJXNYX
5. *Opređenje čuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Rossijskie rekomendacii. Versija 2024-02* [Russian guidelines. Determination of antimicrobial susceptibility of microorganisms. Version 2024-02]. MAKMAKH, SGMU: Smolensk, 2024. 192 p. (In Russ.).
6. Andrea A., Krogfelt K.A., Jenssen H. Methods and Challenges of Using the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) as a Model Organism in Antimicrobial Compound Discovery. *Microorganisms*. V. 7(3) (2019). Art. ftab85. DOI: 10.3390/microorganisms7030085.
7. Asai M. et al. *Galleria mellonella*-intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs. *FEMS Microbiol. Rev.* V. 47(2) (2023). Art. fuad011. DOI: 10.1093/femsre/fuad011. EDN: PBWDQO
8. Banville N., Browne N., Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*. V. 3, No. 6 (2012): pp. 497-503. DOI: 10.4161/viru.21972.
9. Champion O.L., Wagley S., Titball R.W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*. V. 7(7) (2016): pp. 840-5. DOI: 10.1080/21505594.2016.1203486.
10. Chen R.Y., Keddie B.A. The *Galleria mellonella*-enteropathogenic *Escherichia coli* model system: characterization of pathogen virulence and insect immune responses. *J. Insect Sci.* V. 21(4) (2021). Art. 7. DOI: 10.1093/jisesa/ieab046. EDN: UYWYR
11. Dinh H. et al. Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. *Pathog. Dis.* V. 79(2) (2021). Art. ftab006. DOI: 10.1093/femspd/ftab006. EDN: TKXTAQ
12. Hesketh-Best P.J. et al. *Galleria mellonella* larvae exhibit a weight-dependent lethal median dose when infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and disease*. V. 79, No. 2 (2021). Art. ftab003. DOI: 10.1093/femspd/ftab003. EDN: GKKTAB
13. Hoffmann J.A. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* V. 7(1). (1995): pp. 4-10. DOI: 10.1016/0952-7915(95)80022-0.
14. Hofkens N. et al. Microbisporicin (NAI-107) protects *Galleria mellonella* from infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiol. Spectr.* V. 11(6) (2023). Art. e0282523. DOI: 10.1128/spectrum.02825-23. EDN: CPQYFJ
15. Jorjão A.L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. V. 9 (2018): pp. 383-389. DOI: 10.1080/21505594.2017.1397871.
16. Kavanagh K., Sheehan G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *J. Fungi (Basel)*. V. 4(3) (2018). Art. 113. DOI: 10.3390/jof4030113.

17. Malmquist J.A., Rogan M.R., McGillivray S.M. *Galleria mellonella* as an Infection Model for *Bacillus anthracis* Sterne. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* V. 9 (2019). Art. 360. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00360.
18. Mukherjee K. et al. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis*. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 76(1) (2010): pp. 310-317. DOI: 10.1128/AEM.01301-09. EDN: NYONEB
19. Ookubo M. et al. “Rich arginine and strong positive charge” antimicrobial protein protamine: From its action on cell membranes to inhibition of bacterial vital functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* V. 1866. No. 5 (2024). Art. 184323. DOI: 10.1016/j.bbamem.2024.184323. EDN: NYWNRO
20. Piatek M., Sheehan G., Kavanagh K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying *in vivo* activity of conventional and novel antimicrobial agents. *Pathog. Dis.* V. 78(8) (2020). Art. ftaa059. DOI: 10.1093/femspd/ftaa059. EDN: TTMTSY
21. Serrano I. et al. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics* (Basel). V. 12(3) (2023). Art. 505. DOI: 10.3390/antibiotics12030505. EDN: ITADWL
22. Vertyporokh L., Hуłas-Stasiak M., Wojda I. Host-pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana*. *Insect Sci.* V. 27(5) (2020): pp. 1079-1089. DOI: 10.1111/1744-7917.12706. EDN: ZKIICX
23. Wang G. et al. APD6: the antimicrobial peptide database is expanded to promote research and development by deploying an unprecedented information pipeline. *Nucleic Acids Res.* V. 54(D1) (2026): pp. 363-374. DOI: 10.1093/nar/gkaf860.
24. White D., Sykes E.M.E., Kumar A. *Galleria mellonella* as an Infection and Antibiotic Treatment Model for *Acinetobacter baumannii*. *J. Vis. Exp.* No. 221 (2025). Art. e68625. DOI: 10.3791/68625. EDN: WCGDLI
25. World Health Organization. The WHO AWaRe (access, watch, reserve) antibiotic book. - World Health Organization, 2022.
26. Zhou L. et al. Developmental Changes for the Hemolymph Metabolome of Silkworm (*Bombyx mori* L.). *J. Proteome Res.* V. 14(5) (2015): pp. 2331-2347. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00159.

Статья поступила в редакцию 21.05.2026; одобрена после рецензирования 25.05.2026; принята к публикации 01.06.2026.

The article was submitted 21.05.2026; approved after reviewing 25.05.2026; accepted for publication 01.06.2026.

Информация об авторах

А. Н. Лобанов – lobanov.aleksandr.n@gmail.com, инженер «ИЭГМ УрО РАН», аспирант ПФИЦ УрО РАН;
 М. В. Антипова – girmar@mail.ru, канд. биол. наук, младший научный сотрудник «ИЭГМ УрО РАН», доцент ПГАТУ.
 Д. В. Ерошенко – dasha.eroshenko@gmail.com, канд. биол. наук, инженер «ИЭГМ УрО РАН»;
 Т. В. Полюдова – poludova76@mail.ru, канд. биол. наук, зав. лабораторией «ИЭГМ УрО РАН».

Information about the authors

A. N. Lobanov – lobanov.aleksandr.n@gmail.com, engineer «IEGM UB RAS», postgraduate student PFRC UB RAS;
 M. V. Antipeva – girmar@mail.ru, candidate of biological sciences, junior researcher «IEGM UB RAS», associate professor Perm State Agro-Technological University named after academician D. N. Prianishnikov.
 D. V. Eroshenko – dasha.eroshenko@gmail.com, candidate of biological sciences, engineer «IEGM UB RAS»;
 T. V. Polyudova – poludova76@mail.ru, candidate of biological sciences, head of laboratory «IEGM UB RAS».

Вклад авторов:

Лобанов А. Н. – экспериментальная работа; статистическая обработка материала; написание исходного текста.
 Антипова М. В. – экспериментальная работа; доработка текста.
 Ерошенко Д. В. – статистическая обработка материала; доработка текста.
 Полюдова Т. В. – научное руководство, концепция исследования, работа над текстом.

Contribution of the authors:

Lobanov A. N. – experimental work; statistical processing of material; writing the original draft.
 Antipeva M. V. – experimental work; text revision.
 Eroshenko D. V. – statistical processing of material; text revision.
 Polyudova T. V. – research supervision, research concept, text revision.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.