

**Влияние инактивированных бактерий рода *Bacillus* Cohn, 1872
на реакции клеточного иммунитета *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)**

**Influence of inactivated species of the genus *Bacillus* Cohn, 1872
on the cellular immunity of *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)**

**О.В. Поленогова, С. Жангисина, А.С. Артемченко,
Т.Н. Клементьева, В.В. Глупов
O.V. Polenogova, S. Zhangissina, A.S. Artemchenko,
T.N. Klementeva, V.V. Glupov**

Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: ovp0408@yandex.ru, saule.zhangisina@gmail.com, anna.artemchenko@bk.ru, red.klen@yandex.ru, skif61@list.ru.
Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

Ключевые слова: вошинная огнёвка, гемоциты, гранулоциты, клеточный иммунитет, инактивированные бактерии.

Key words: wax moth, hemocytes, granulocytes, cellular immunity, inactivated bacteria.

Резюме. Результаты экспериментов показали, что скармливание (*per os*) инактивированных клеток грамположительных бактерий рода *Bacillus* Cohn, 1872 и грамотрицательных рода *Escherichia* Castellani & Chalmers 1919 личинкам вошинной огнёвки *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) через 12 часов приводит к изменениям гемоцитарной формулы в гемолимфе. Изменения структуры популяции клеток проявились в увеличении числа иммунокомпетентных клеток гранулоцитов и снижении количества прогемоцитов и эноцитойдов. Кроме того, снижалось ($\times 1,3\text{--}1,8$) общее число гемоцитов и ($\times 1,4\text{--}2,6$) активность феноксидаз в гемолимфе личинок *G. mellonella*, но не сказывалось на выживаемости клеток. Вероятно, данные изменения могут быть связаны с распознаванием патоген-ассоциированных рецепторов на поверхности инактивированных бактерий, что приводило к выработке молекул медиаторов, активирующих клеточные иммунные реакции. Однако проверка данной гипотезы требует дальнейшего глубокого изучения роли гемоцитов в активации сигнальных путей и изменениях физиологического статуса хозяина.

Abstract. The results of the experiments showed that inoculation *per os* of *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) larvae with inactivated cells of Gram-positive bacteria of the genus *Bacillus* Cohn, 1872 and Gram-negative bacteria of the genus *Escherichia* Castellani & Chalmers 1919 leads to structural changes in the hemocyte population after 12 hours. Changes in the structure of the cell population were manifested by an increase in the number of immunocompetent cells, granulocytes, and a decrease in the number of prohemocytes and oenocytoids. This was accompanied by a decrease in the total number of hemocytes and suppression of phenoloxidase activity in the hemolymph of *G. mellonella* larvae, but did not affect cell survival. It is likely that these changes are related to the recognition of microbial components retained after inactivation by pathogen-associated receptors and the interaction between these receptors and microbial components, resulting in the production of mediator molecules that activate cellular immune responses. However, to verify this hypothesis, the role of hemocytes in activating signaling pathways and altering the physiological state of the host needs to be further investigated.

Введение

Врождённые иммунные реакции присущи всем животным, в том числе насекомым, и включают взаимосвязанные клеточные и гуморальные механизмы, направленные на быструю идентификацию и нейтрализацию патогенов в результате иммунного ответа [Hultmark, 1993; Zhang et al., 2021], что сопровождается активацией путей Toll, Imd, Janus kinase/signal трансдуктора и активатора транскрипции (JAK/STAT), c-Jun N-концевой киназы (JNK), и профеноксидазы (проФО) [Lu et al., 2020]. Значительную роль в этих реакциях играют клетки крови гемоциты, которые первыми реагируют на вторжение патогена [Pech, Strand, 1996]. На поверхности гемоцитов присутствуют патоген-ассоциированные рецепторы, например, водорастворимые формы рецепторов распознавания лектинов C-типа, белки распознавания пептидогликанов (ПГ), липотейхоевых кислот (ЛТА), г्लуканов и др. [Rao et al., 2015; Lin et al., 2020; Zhu et al., 2020; Zhang et al., 2021]. Они распознают и идентифицируют отдельные микробные компоненты или комплексы компонентов и активируют каскады врождённых иммунных реакций [Renwick et al., 2007; Satyavathi et al., 2018]. Консервативные микробные компоненты патогенов могут иметь различную природу: (i) полисахариды (ПГ), липолисахариды (ЛПС), г्लуканы и т.д. [Swaminathan et al., 2006; Chen et al., 2014]; (ii) липидные соединения (липотейхоевые кислоты, липоарабиноманнан) [Ariki et al., 2004; Jiang et al., 2004]; (iii) белки и полипептиды (флагеллин и капсидный белок) [Hayashi et al., 2001]; (iv) нуклеиновые кислоты [Oliveira, 2014].

Во время гемопоэза формируются различные типы гемоцитов для которых характерна определённая функциональная значимость. В частности, даже определённые подтипы клеток в пределах одного типа могут отвечать за определённые иммунные

реакции, например, нодуляцию, инкапсуляцию, фагоцитоз и меланизацию [Glupov, 2001; Terass et al., 1994; Wu et al., 2016]. Для чешуекрылых (Lepidoptera) известно пять типов клеток (гранулоциты, плазматоциты, прогемоциты, сферулоциты и энцитоиды) [Eleftherianos et al., 2021]. Гранулоциты и плазматоциты обладают повышенной адгезией и имеют на поверхности рецепторы распознавания, что делает их схожими с нейтрофилами млекопитающих [Kavanagh, Reeves, 2004; Renwick et al., 2007]. Энцитоиды — неадгезивные гемоциты, содержащие молекулы проФО-предшественников активной феноксидазы (ФО) [Banerjee et al., 2019]. Сферулоциты способны секретировать внеклеточные ловушки нуклеиновых кислот, которые участвуют в секвестрации микроорганизмов и активации процессов коагуляции [Altincicek et al., 2008]. Прогемоциты — базовые элементы и предшественники остальных типов клеток [Lavine, Strand, 2002; Liu et al., 2013].

Деление врождённых иммунных реакций на клеточный и гуморальный иммунитет довольно условно. Активные клеточные иммунные реакции приводят к активации гуморальных реакций и, наоборот, гуморальные реакции приводят к активации клеточного иммунитета. В целом, можно выделить несколько блоков формирования врождённых иммунных реакций: 1) активация проФО каскада с образованием активной ФО; 2) активация определённых путей экспрессии антимикробных пептидов (АМП); 3) синтез глико- и липопротеинподобных лектинов [Cerenius et al., 2010; Xu et al., 2019]. В результате активации проФО каскада запускаются процессы, связанные с меланогенезом, а также с образованием склеротина [Slepneva et al., 1999; Wang et al., 2022]. Меланин и склеротин входят в состав капсул и гранул, образованных в результате клеточных иммунных реакций. При формировании этих соединений формируется большое количество свободных радикалов, в первую очередь, хинонов и полухинонов [Dziarski et al., 2016; Whitten, Coates, 2017]. Синтез АМП в гемоцитах и в жировом теле при распознавании микробных компонентов регулируется в основном двумя сигнальными путями Imd и Toll [Vogel et al., 2011]. АМП связываются с полисахаридами и липотейхоевыми кислотами патогенов, разрушают их клеточные стенки, мембраны или рецепторы и взаимодействуют с внутриклеточными мишенями патогенов (белки, ДНК, РНК) [Malanovic, Lohner, 2016; Wojda et al., 2020]. В связывании АМП с микробами значительную роль играют лектиноподобные молекулы, которые функционально аналогичны лектинам млекопитающих [Rao et al., 2015; Zhu et al., 2020; Elies et al., 2020]. Лектины С-типа являются водорастворимыми рецепторами распознавания образов и участвуют в клеточных реакциях нодуляции, инкапсуляции и активации проФО [Yu, Kanost, 2004; Wang et al., 2017; Zhu et al., 2020].

Патогенез — сложный процесс, зависящий от множества факторов, среди которых иммунный статус хозяина, вирулентность патогена, микроби-

ота и внешние факторы (температура, влажность, инсоляция и др.). Известно, что специфические врождённые иммунные реакции у насекомых способны вызывать как патогены [Moret, Siva-Jothy, 2003; Pham et al., 2007; Roth et al., 2009; Milutinović et al., 2014] или их отдельные компоненты, например токсины [Milutinović et al., 2014] или супернатанты спор [Rodrigues et al., 2010], так и симбионты [Laughton et al., 2011; Hassan et al., 2020; Perreau et al., 2021; Polenogova et al., 2022]. Большинство из этих работ посвящены изучению возможности формирования врождённой иммунной памяти у насекомых при первичном заражении хозяина патогеном, что может сказываться в дальнейшем на устойчивости насекомых к патогенам и имеет аналогию с адаптивным иммунитетом млекопитающих, опосредованного антителами [Kurtz, Franz, 2003; Kurtz, 2005]. Однако, в данных исследованиях зачастую были использованы методы (i) — инъекирования насекомых бактериальными компонентами, инактивированными или низкими дозами патогенов [Moret, Siva-Jothy, 2003; Pham et al., 2007; Roth et al., 2009], или (ii) — перорального скармливания живых клеток бактерий или компонентов (Сгу-токсинов бактерий *B. thuringiensis* Berliner, 1915), полученных из бактерий [Rodrigues et al., 2010; Milutinović et al., 2014].

В данной работе использовали лабораторную линию вошиной огнёвки *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). *Galleria mellonella* (Linnaeus) имеет ряд преимуществ, среди которых хорошо изученный врождённый иммунитет [Lange et al., 2018; Wojda et al., 2020; Kordaczuk et al., 2022]. Личинки этих насекомых широко используются как модельный объект для токсикологических исследований, в том числе антибактериальных препаратов, для оценки патогенности различных микроорганизмов *in vivo* [Cutuli et al., 2019; Coates, Söderhäll, 2020; Duman et al., 2022].

Эксперименты заключались в скармливании личинкам вошиной огнёвки инактивированных клеток грамположительных бактерий рода *Bacillus* Cohn, 1872 и грамотрицательных рода *Escherichia* Migula, 1895, которые часто могут встречаться в микрофлоре животных, в том числе в кишечнике насекомых, и оценке реакций клеточного (общее число, выживаемость и соотношение типов клеток в популяции гемоцитов) и гуморального иммунитета (активность ФО в гемолимфе).

Материал и методы

Насекомые и бактерии. Лабораторную линию вошиной огнёвки *Galleria mellonella* (Linnaeus) содержали при постоянной температуре 28,0 °C и 60,0 % влажности на искусственной питательной среде [Kryukova et al., 2020]. В эксперименте использовали четыре вида бактерий: *Bacillus thuringiensis galleria* (Shvetsova, 1959), *Bacillus cereus* Frankland, Frankland, 1887, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872 и *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani, Chalmers,

1919 из Коллекции микроорганизмов Зоологического музея Института систематики и экологии животных СО РАН. Бактерии культивировали на протяжении 16 часов (140 грм, 28°C) в питательном бульоне (Хаймида, Индия) и затем дважды отмывали (10000×g, 10 мин, 4 °C) в 75 mM растворе хлорида натрия. Конечные концентрации бактериальных суспензий в 75 mM растворе хлорида натрия составили 1×10^8 клеток/мл. Часть суспензии каждого вида бактерий автоклавировали (15 мин при 121 °C) и охлаждали. Качество инактивации бактерий проверяли путем инокуляции суспензий на поверхность питательного агара и 48-часовой инкубации при 28 °C. Сохранность структур клеток бактерий после инактивации автоклавированием была подтверждена микроскопией (Carl Zeiss Axioskop 40, Германия).

По одному мл суспензий активных (N) или инактивированных (A) клеток бактерий вносили в 3 г искусственной диеты и скармливали личинкам *G. mellonella* IV возраста (порция 3 г корма на 30 личинок). В контроле в диету личинкам вносили стерильный 75 mM раствор хлорида натрия. Замену корма необработанным осуществляли через 24 ч и далее ежедневно. Учёт выживших личинок осуществляли ежедневно на протяжении 5 суток. Количество насекомых, используемых в биотесте, составило минимум 220 особей в каждом варианте.

Через 12, 24 и 48 ч после *per os* воздействия личинок анестезировали при +4 °C и отбирали образцы гемолимфы через прокол в кутикуле для оценки активности фенолоксидазы (ФО), анализа общего числа гемоцитов (ОЧГ), определения структуры популяции гемоцитов и выживаемости клеток.

Активность фенолоксидазы. Гемолимфу (10 мкл) переносили в 40 мкл 0,1 M натрий-фосфатного буфера (ФБ; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM глюкоза, 10 mM HEPES, pH 7,2). 10 мкл супернатанта (5 мин, 4 °C, 500×g) вводили в 200 мкл свежеприготовленной 10 mM L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) в ФБ и инкубировали в темноте при 28 °C в течение 25 мин в темноте. Активность ФО оценивали спектрофотометрически по скорости образования допахрома на длине волны 490 нм по методу Ashida & Söderhäll [1984]. В каждом варианте исследовали не менее чем 25 образцов (1 образец = 1 насекомое).

Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорда [Bradford, 1976]. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Активность ферментов выражали в единицах оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси на 1 мг белка за единицу времени.

Общее число гемоцитов. Общее число гемоцитов (ОЧГ), структуру популяции гемоцитов и выживаемость клеток оценивали с помощью микроскопии. Для анализа ОЧГ, 10 мкл гемолимфы вносили в 70 мкл ледяного (+4 °C) антикоагулирующего буфера (АБ) (62 mM NaCl, 100 mM глюкозы, 10 mM EDTA, 30 mM цитрата натрия, 3,26 mM лимонной кислоты, pH 4,6), содержащего 2 mM фенилтиомочевины. Образцы центрифугировали (5 мин при 500×g). Клет-

ки ре-суспендировали и трижды промывали в 80 мкл ледяного АБ. Затем, к осадку вносили HEPES буфер [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM глюкозы, 10 mM HEPES, pH 7,2]. Количество гемоцитов определяли как общее число гемоцитов в 1 мл гемолимфы. Каждый вариант включал 9 биологических повторностей (1 повторность = 1 особь).

Популяционная структура и выживаемость гемоцитов. Типы гемоцитов определяли с помощью опубликованной ранее модифицированной классификации Gupta [1979] и Brehélin и Zachary [1986]. Гемолимфу (30 мкл) помещали в 30 мкл ледяного АБ (+4 °C), содержащего 2 mM фенилтиомочевины. Затем готовили суспензию гемоцитов, как для анализа ОЧГ (см. выше), каплю суспензии гемоцитов (30 мкл) наносили на предметное стекло и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 20–30 мин. Гемоциты фиксировали в течение 20 мин глутаральдегид-формальдегидным фиксатором (2,5 % глутаральдегида, 4 % формальдегида в ФБ). После фиксации предметные стекла со слоями гемоцитов трижды промывали дистиллированной водой и окрашивали по Май-Грюнвальду-Гиемзе (MGG). Соотношение типов гемоцитов определяли путём микроскопического подсчёта клеток в 20 полях зрения на образец. Соотношение типов клеток переводили в проценты. В каждом варианте было использовано не менее 15 биологических повторностей (1 повторность = 3 особи).

Жизнеспособные клетки гемоцитов определяли в монослое клеток, окрашенных в течение 20 мин 1 % раствором трипанового синего. Соотношение жизнеспособных гемоцитов определяли путём подсчёта клеток в 30 полях зрения на образец и переводили в проценты. В каждом варианте было использовано не менее 15 биологических повторностей (1 повторность = 3 особи).

Статистика. Анализ выживаемость насекомых анализировали по методу Каплана-Мейера (Лог-Ранк). Статистическая значимость ненормально распределённых данных (Shapiro-Wilk test, $P < 0,05$) была проанализирована с использованием однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с пост-хок тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Для расчётов использовали программы STATISTICA 8, Past3 и GraphPad Prism5 и SigmaPlot.

Результаты

Скармливание личинкам вощиной огнёвки суспензии АВt, а также суспензий активных и инактивированных клеток NBc, АВc, NBs, АВs, NEc, АЕс не приводило к гибели насекомых и их выживаемость, как и в контроле, составила 97–99 % (табл. 1). Скармливание суспензии активных клеток NBt привело к классическому развитию бактериальной инфекции, где выживаемость особей на 5-й день наблюдения составила 53 % (Лог ранк тест, $p < 0,001$, по сравнению с контролем).

Таблица 1. Выживаемость личинок *G. mellonella* после скармливания (*per os*) бактериальных суспензий активных и инактивированных клеток *B. thuringiensis galleria*, *B. cereus*, *B. subtilis* и *E. coli*. Титр бактериальных суспензий составил 1×10^8 клеток/мл. В контроле был использован 75 мМ раствор хлорида натрия

Table 1. Survival *G. mellonella* larvae after *per os* treatments bacterial suspension with active and inactivated cells: *B. thuringiensis galleria*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *E. coli*. Titer of bacterial suspension was used 1×10^8 cells/ml. In control was used 75 mM sodium chloride solution

Вид бактерий	Выживаемость личинок <i>G. mellonella</i> после <i>per os</i> воздействия суспензиями бактерий (1×10^8 клеток/мл) (%)	
	Активные клетки (N)	Инактивированные клетки (A)
Контроль	100	
<i>B. thuringiensis galleria</i>	53 (3,54–3,94)*	99 (4,91–5,03)
<i>B. cereus</i>	99 (4,9–5,0)	98 (4,9–5,0)
<i>B. subtilis</i>	98 (4,88–5,02)	99 (4,95–5,02)
<i>E. coli</i>	97 (4,83–5,0)	98 (4,9–5,02)

Результаты анализа общего числа гемоцитов (ОЧГ) показали изменения числа клеток уже через 12 ч после воздействия. Скармливание активных клеток NBt 12 ч после воздействия привело к значительному ($\times 1,4$) всплеску числа гемоцитов (Краскел-Уоллис тест и тест Данна, $p = 0,007$, по сравнению с контролем, рис. 1). Однако, в дальнейшем наблюдалось ($\times 1,5-1,9$) снижение данного показателя ($p < 0,001$, по сравнению с контролем). В то время как инактивированные АВt приводили к значительному ($\times 1,3-1,8$) подавлению ОЧГ во всех временных точках ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). Схожий эффект в виде снижения ОЧГ во всех временных точ-

ках наблюдался в вариантах со скармливанием АВs и АЕс ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 3, 4). В то время как в варианте АВс регистрировалось через 12 ч после инокуляции незначительное снижение ОЧГ, которое затем возрастало (валидно для 24 ч: $p = 0,01$, по сравнению с контролем, рис. 2). Скармливание NBs также приводило к подавлению ОЧГ во всех временных точках (валидно для 24 ч и 48 ч: $p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 3). Суспензии активных клеток NEC, также как и NBs способствовали увеличению THC в гемолиме личинок во всех временных точках (валидно для NEC 24 ч и NBs 48 ч: $p < 0,05$, по сравнению с контролем (рис. 2, 3).

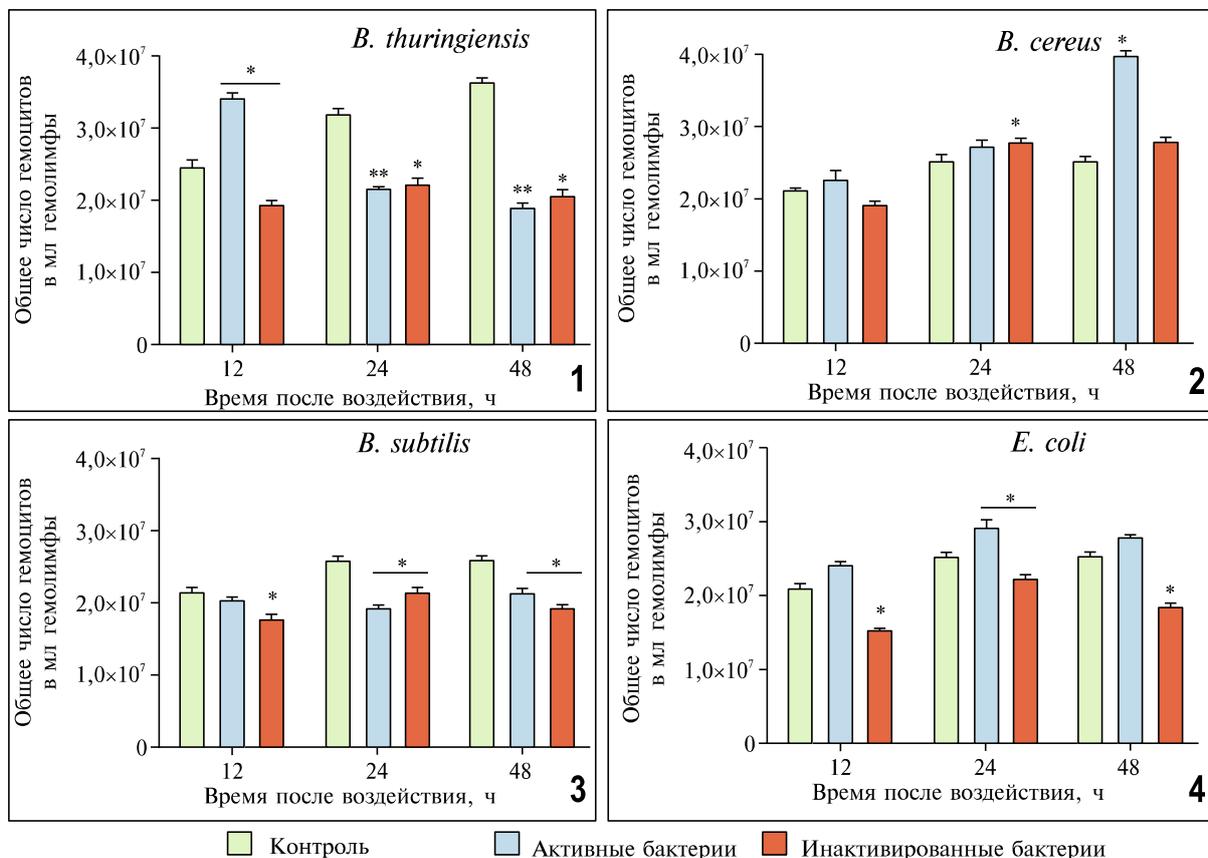


Рис. 1–4. Общее число гемоцитов (ОЧГ) в гемолиме личинок *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток. 1 — *B. thuringiensis galleria*; 2 — *B. cereus*; 3 — *B. subtilis*; 4 — *E. coli*.

Figs 1–4. Total hemocyte count (THC) in the hemolymph of *G. mellonella* (Linnaeus) larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment of bacterial suspension with active and inactivated cells. 1 — *B. thuringiensis galleria*; 2 — *B. cereus*; 3 — *B. subtilis*; 4 — *E. coli*.

Per os инокуляция суспензий инактивированных бактерий личинкам вошиной огнёвки приводила к значительному ($\times 1,39-2,63$) подавлению активности ФО в первые 12 ч после воздействия (рис. 5–8). Так, подавление активности ФО наблюдалось во всех временных точках при скармливании АВт и АВс (важно для 12–24 ч АВт: $p < 0,05$ и для АВс: $p < 0,001$, по сравнению с контролем (рис. 5–7). Скармливание активных клеток этих же бактерий также приводило к снижению активности ФО в первые 24 ч (важно для NBt 12, 24 ч и NBs 12 ч: $p < 0,001$, по сравнению с контролем).

Интересно, что скармливание суспензий как инактивированных АЕс, так и активных клеток *E. coli* НЕс вызывали снижение активности ФО, причём в варианте со скармливанием НЕс подавление активности фермента наблюдалось во всех временных точках, а при АЕс начиная с 24 ч ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 8). *Per os* АВс и NBс приводило к подавлению активности ФО на 12 ч и 48 ч, соответственно (для АВс: $p < 0,001$, для NBс: $p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 6).

Анализ структуры популяции гемоцитов показал, что *per os* инактивированными клетками бактерий в первые 12 ч приводит к увеличению числа иммунокомпетентных клеток гранулоцитов

(кроме варианта АВс) ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 9–12). Кроме того, в первые 12 ч после *per os* инокуляции АВс и АЕс снижалось число прогемоцитов и эноцитоидов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 11, 12). Через 24 ч после *per os* АВт число прогемоцитов падало ($P = 0,002$, по сравнению с контролем, рис. 10). В вариантах со скармливанием АВс наблюдалось увеличение числа плазматочитов и эноцитоидов по сравнению с значениями в контрольной группе ($p < 0,05$, рис. 10), а в случае *per os* АЕс — увеличение числа эноцитоидов и падение соотношения сферулоцитов в популяции клеток гемоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 12). Скармливание суспензий АВт и АВс приводило к значительному снижению прогемоцитов и увеличению числа гранулоцитов через 48 ч после воздействия ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 10, 12). В то время как *per os* АВс и АЕс напротив, способствовали росту числа прогемоцитов и снижению количества клеток гранулоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 11, 12).

Скармливание суспензии активных клеток энтомопатогенных бактерий (АВт) приводило к некоторому увеличению числа гранулоцитов (12 ч) по сравнению с контрольной группой личинок, однако затем (24 ч) число клеток снижалось ($P = 0,01$,

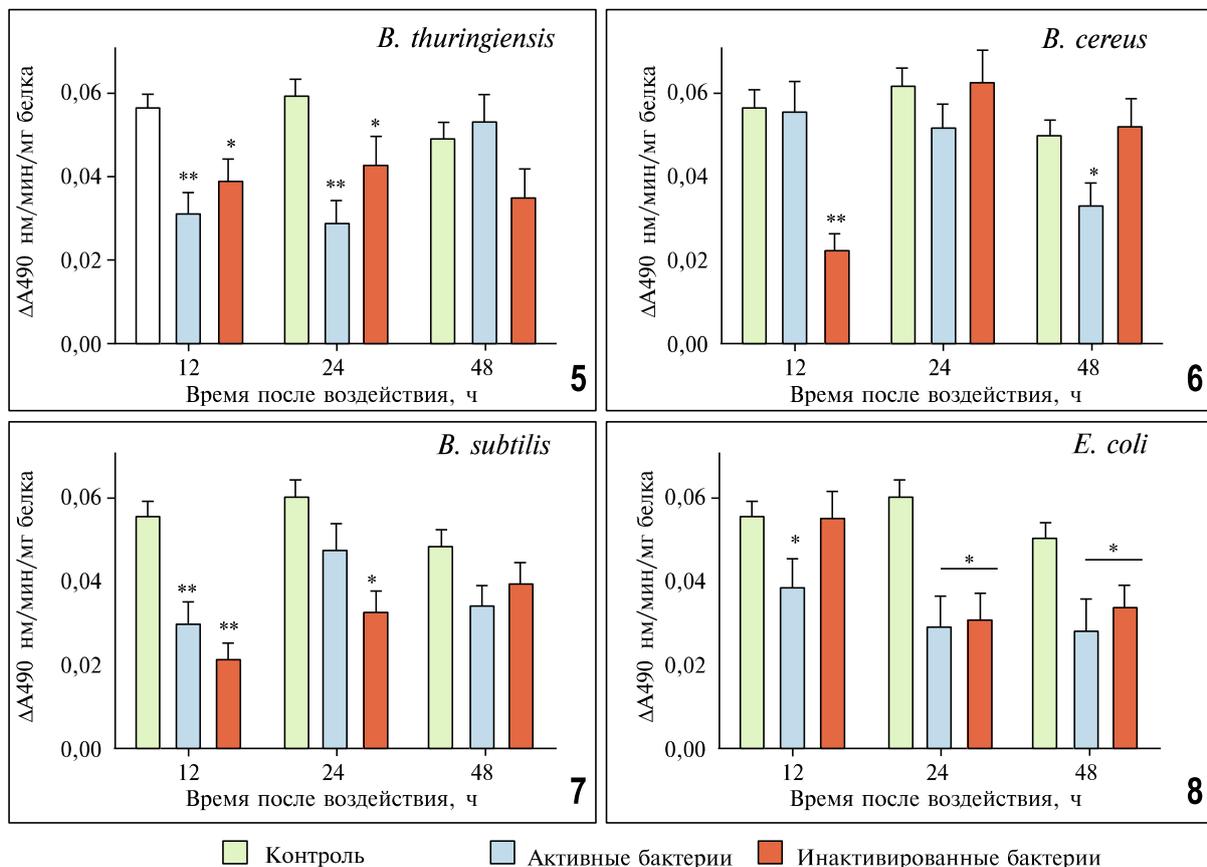


Рис. 5–8. Активность фенолоксидаз (ФО) в гемолимфе личинок *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток: 5 — *B. thuringiensis galleria*; 6 — *B. cereus*; 7 — *B. subtilis*; 8 — *E. coli*.

Figure 5–8. Activity of phenoloxidases (PO) in the hemolymph of *G. mellonella* larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment of bacterial suspension with active and inactivated cells. 5 — *B. thuringiensis galleria*; 6 — *B. cereus*; 7 — *B. subtilis*; 8 — *E. coli*.

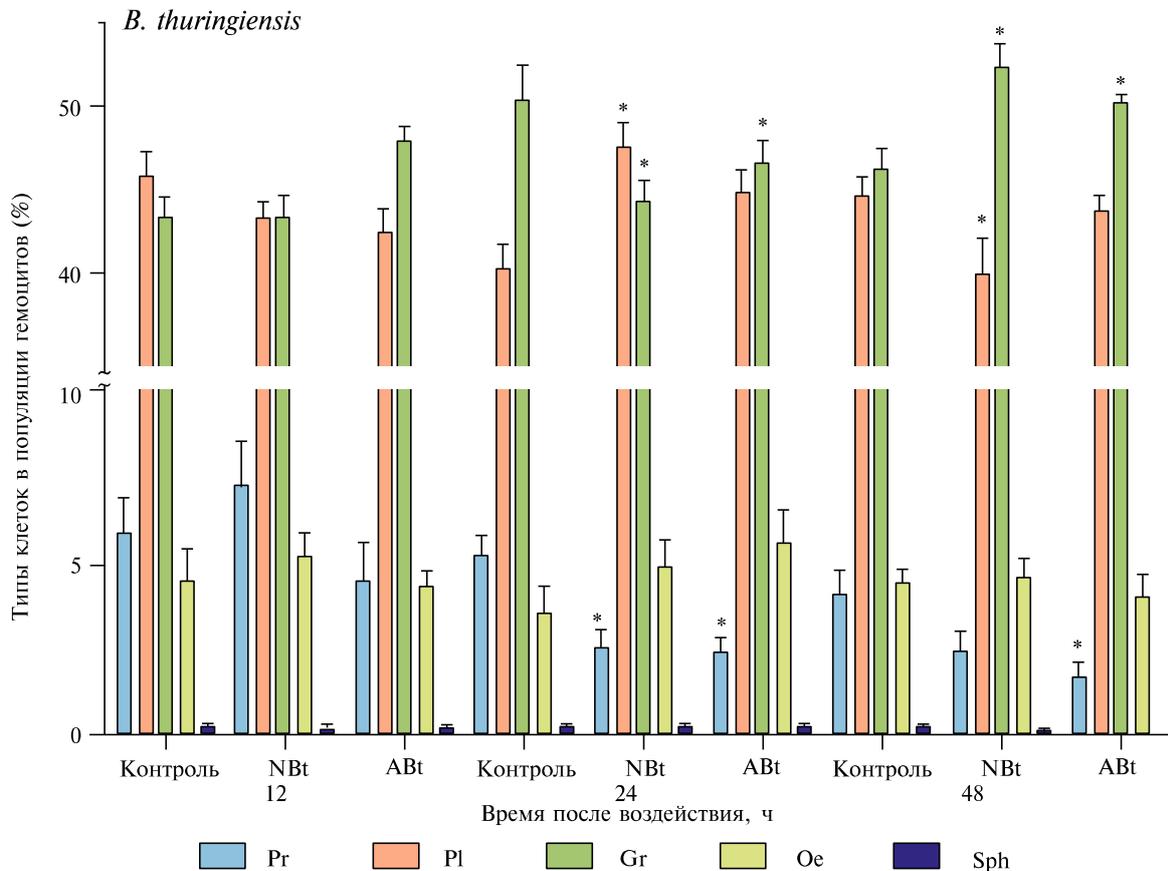


Рис. 9. Соотношение типов клеток в популяции гемоцитов *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток *B. thuringiensis galleria*. Pr — прогемоциты, Pl — плазматоциты, Gr — гранулоциты, Oe — энцитойды, Sph — сферулоциты.

Fig. 9. Percentage of cell types in the hemocyte population of *G. mellonella* in the hemolymph of *G. mellonella* larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment bacterial suspension with active and inactivated cells of *B. thuringiensis galleria*. Pr — prohemocytes, Pl — plasmacytes, Gr — granulocytes, Oe — oenocytoids, Sph — spherulocytes.

рис. 9). Кроме того, *per os* инокуляция ABt приводила к ($\times 2$) снижению количества прогемоцитов и ($\times 1,16$) увеличению числа плазматоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). Однако, через 48 ч после инокуляции ABt было зарегистрировано ($\times 1,13$) увеличение числа гранулоцитов и ($\times 1,11$) падение плазматоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). В случае со скормливанием активных клеток NBc через 12 ч наблюдалось незначительное увеличение числа плазматоцитов и снижение количества прогемоцитов по сравнению с контролем ($p > 0,05$, рис. 10). Однако, в дальнейшем, через 24 и 48 ч число клеток прогемоцитов падало, а количество гранулоцитов возрастало ($p < 0,05$). Инокуляция активных NBs и NEc личинкам воиной огнёвки приводила к схожим изменениям соотношения типов иммунокомпетентных клеток в популяции гемоцитов (рис. 11, 12). Так, первые 12 ч после скормливания обеих бактерий (NBs и NEc) число гранулоцитов возрастало на фоне падения количества прогемоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). Однако, в дальнейшем через 24 ч соотношение типов клеток сменилось, и наблюдалось увеличение числа прогемоцитов и падение числа плазматоцитов ($p < 0,05$, по сравнению с контролем). Через 48 ч эта

тенденция сохранялась, однако достоверно значение было для прогемоцитов при инокуляции NEc ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 12). Интересно, что через 48 ч наблюдалось значительное падение числа энцитойдов при скормливании активных клеток NBc ($\times 4,5$) и NEc ($\times 2$) ($p < 0,05$, по сравнению с контролем, рис. 10, 12).

Скормливание инактивированных бактерий не вызвало снижения выживаемости клеток гемоцитов по сравнению с контролем и составила 98–99,5 % (рис. 13–16). Хотя в случаях *per os* ABc и AEc через 24 ч после воздействия выживаемость клеток возрастала относительно контроля ($p < 0,05$, рис. 15, 16). Активные клетки NBt приводили к значительной гибели гемоцитов на 24 и 48 ч относительно других вариантов эксперимента ($p < 0,001$, рис. 13), а активные клетки ABs и AEs, напротив способствовали их выживаемости (для ABs 24 ч и AEs 48 ч: $p < 0,001$, по сравнению с контролем, рис. 15, 16).

Обсуждение

Вторжение любых микроорганизмов в кишечник насекомых приводит к активации процессов рас-

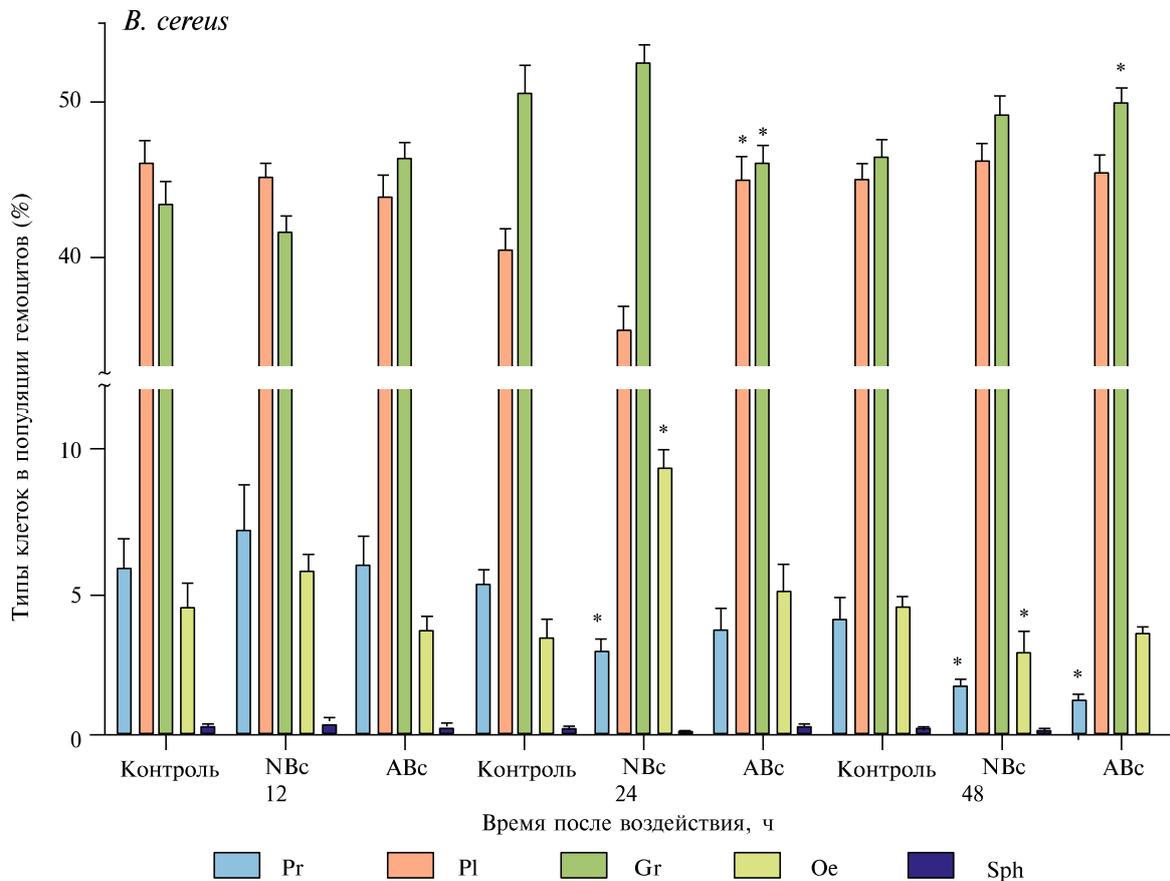


Рис. 10. Соотношение типов клеток в популяции гемоцитов *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток *B. cereus*. Pr — прогемоциты, Pl — плазматоциты, Gr — гранулоциты, Oe — энцитойды, Sph — сферулоциты.

Fig. 10. Percentage of cell types in the hemocyte population of *G. mellonella* in the hemolymph of *G. mellonella* larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment bacterial suspension with active and inactivated cells of *B. cereus*. Pr — prohemocytes, Pl — plasmatocytes, Gr — granulocytes, Oe — oocytoids, Sph — spherulocytes.

познавания и идентификации патогена хозяином. Данные процессы приводят к нарушению структуры микробиоты, что сопровождается увеличением плотности определённых групп бактерий и концентрации продуктов вторичного метаболизма [Shao et al., 2017; Zhang et al., 2022] и может приводить к модуляции симбионтами врождённых иммунных реакций [Laughton et al., 2011; Hassan et al., 2020; Perreau et al., 2021]. Мы предположили, что погибшие (инактивированные) клетки бактерий, способны стимулировать врождённые иммунные реакции у насекомых за счёт распознавания определённых специфических паттернов распознавания на поверхности клеток микроорганизмов. В данной работе мы моделировали природные процессы, когда погибшие клетки бактерий могут попадать в кишечник насекомых вместе с пищей. Личинкам воиной огнёвки скармливали активные и инактивированные клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий и оценивали выживаемость личинок огнёвки, реакции клеточного (общее число гемоцитов и их выживаемость, соотношение типов клеток в популяции гемоцитов) и гуморального иммунитета (активность фенолоксидаз).

Результаты экспериментов показали, что пероральное скармливание инактивированных бактерий, которые сохранили структуру и целостность клеток (подтверждено микроскопией), не сказалось на выживаемости личинок *G. mellonella* (Linnaeus), но приводило к изменениям количества гемоцитов, соотношения типов клеток гемоцитов и активности фенолоксидаз.

Анализ общего числа гемоцитов (ОЧГ) в гемолимфе личинок *G. mellonella* показал значительное снижение количества клеток в первые 12 ч после скармливания инактивированных клеток бактерий, в то время как *per os* активных бактерий *B. thuringiensis*, напротив, в первые 12 ч приводило к значительному увеличению ОЧГ. Интересно, что в случае скармливания других активных клеток бактерий, увеличение ОЧГ наблюдалось позднее, через 24 ч (*E. coli*) и 48 ч (*B. cereus*). Увеличение числа свободноциркулирующих клеток крови при проникновении патогенов в кишечник может быть обусловлено повреждением клеток кишечника насекомых и нарушением его секреторной активности, часто может быть связано с гомеостазом за счёт активации процессов, регулирующих окислительный стресс и продукцию активных форм

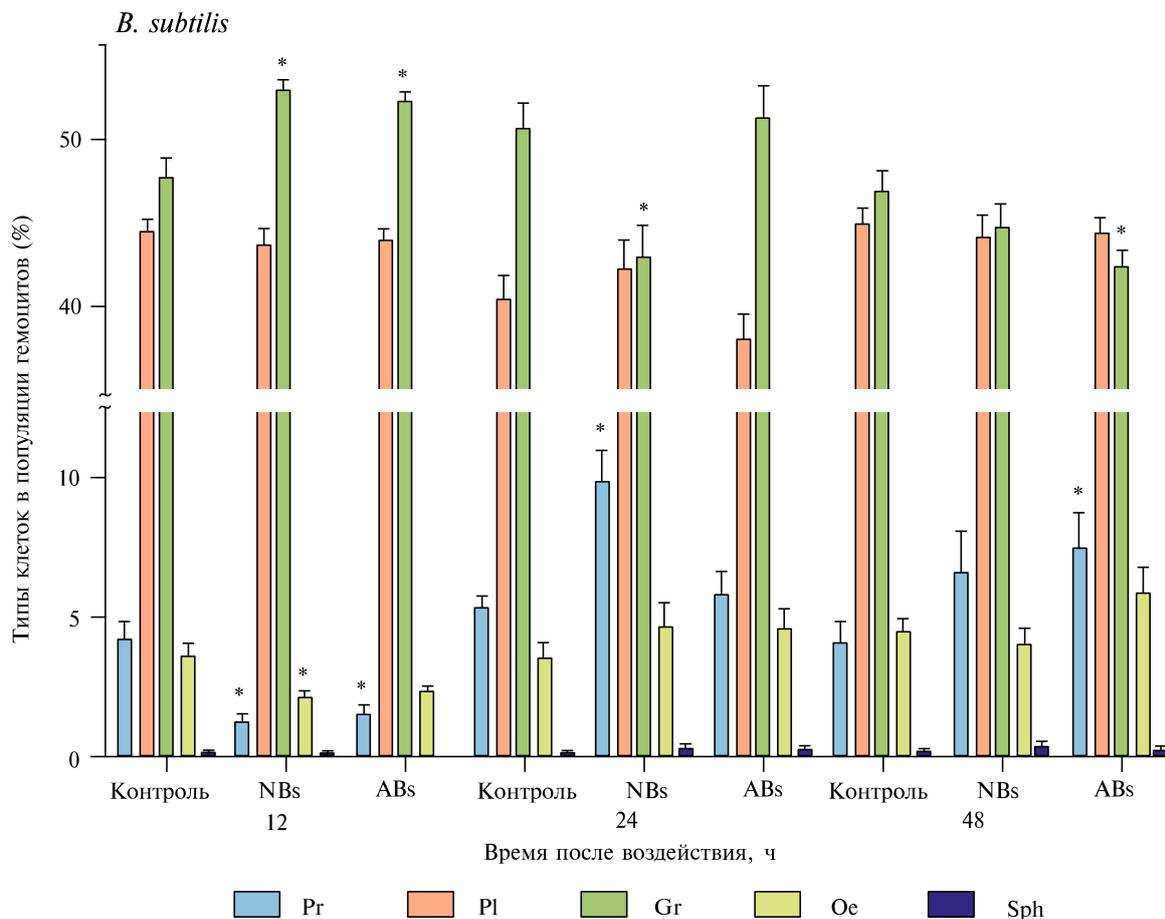


Рис. 11. Соотношение типов клеток в популяции гемоцитов *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток *B. subtilis*. Pr — прогемоциты, Pl — плазматоциты, Gr — гранулоциты, Oe — энцитониды, Sph — сферулоциты.

Fig. 11. Percentage of cell types in the hemocyte population of *G. mellonella* (Linnaeus) larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment bacterial suspension with active and inactivated cells of *B. subtilis*. Pr — prohemocytes, Pl — plasmatocytes, Gr — granulocytes, Oe — oocytoids, Sph — spherulocytes.

кислорода, факторов апоптоза и некроза [DeBlock, Stoks, 2008; Jones et al., 2012; Lange et al., 2018]. Мы предполагаем, что снижение показателя ОЧГ при скармливании суспензий инактивированных бактерий может быть связано с распознаванием клетками хозяина микробных компонентов, которые не проникают в гемоцель. Данные процессы могут сопровождаться увеличением адгезии гемоцитов, образованием клампов клеток и их прикреплением к мышцам и другим внутренним органам вошиной огнёвки, что вполне закономерно скажется на популяционной структуре гемоцитов и их количестве.

Проведённый анализ структуры популяции клеток гемоцитов показал, что в первые часы скармливания инактивированных клеток всех исследованных бактерий наблюдалось значительное увеличение числа клеток гранулоцитов. Ранее было высказано предположение, что на поверхности гранулоцитов присутствует комплекс различных PAMPs (пептидогликана, липополисахаридов, β -1,3-глюкана и др.), что позволяет им идентифицировать широкий круг патогенов [Jiang et al., 2010]. Секретируемые гранулоцитами цитокины и трансмембран-

ные белки (интегрин, нейроглиан, тетраспанин и лакунин) играют значительную роль в сигнализации и/или контроле агрегации других типов клеток, например плазматоцитов, и активируют выработку новых клеток из депо [Diehl-Jones et al., 1996; Lavine, Strand, 2002], что вполне может объяснять увеличение числа этого типа клеток в гемолимфе. Кроме того, повышенную адгезивность клеток гранулоцитов и снижение числа плазматоцитов после инъектирования личинкам *G. mellonella* патогенных *B. cereus* и непатогенных *B. subtilis*, а также термоинактивированных непатогенных *B. cereus* наблюдали в пионерных работах Чейн и Андерсон, что авторы связали с нодуляцией [Chain, Anderson, 1982]. Нодуляция, меланизация и инкапсуляция являются терминальными событиями для гемоцитов [Oliver et al., 2011]. Лизис некротических гемоцитов и любые повреждения эпителиального слоя кишечника сопровождаются увеличением секреции гемоцитами ФО в плазму [Kanost, Gorman, 2008]. Однако, пероральное скармливание инактивированных бактерий не приводило к снижению выживаемости клеток. Важно отметить, что инактивированные клетки

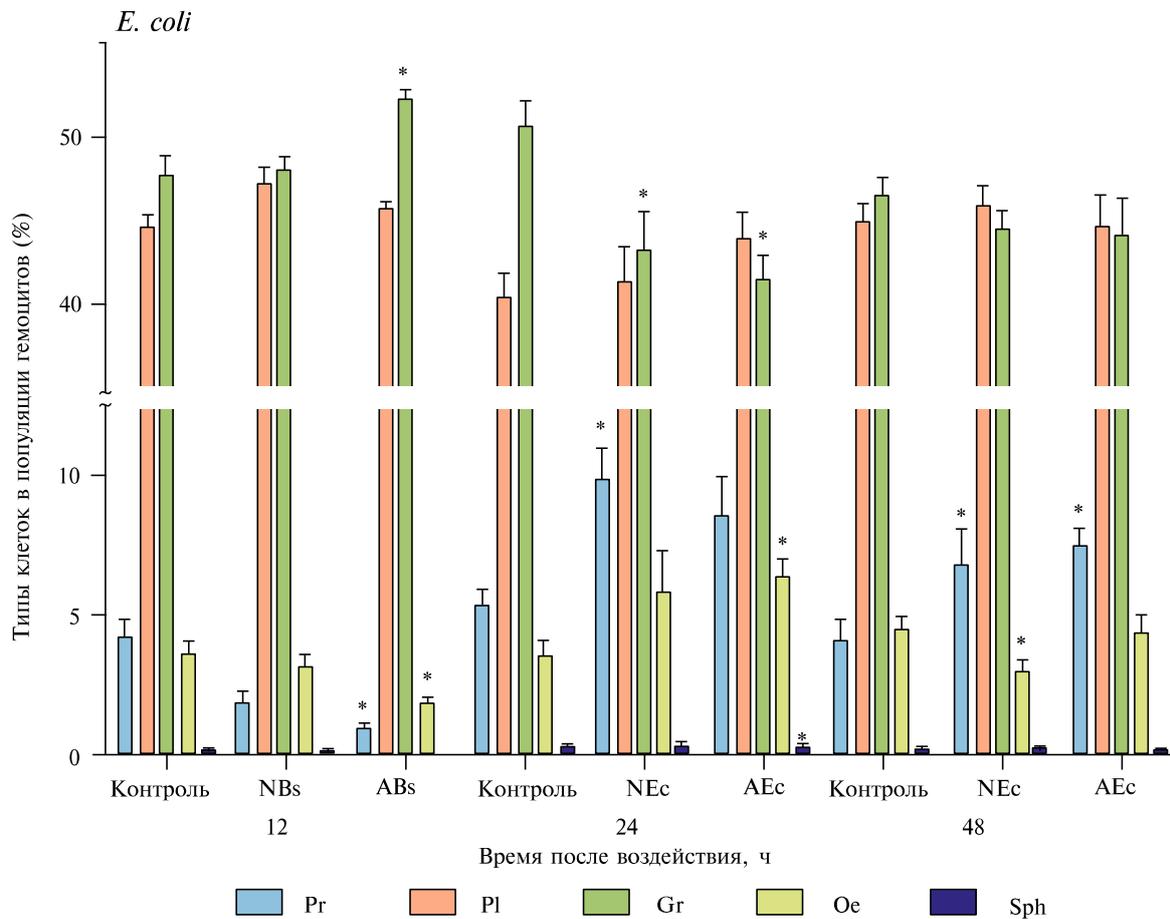


Рис. 12. Соотношение типов клеток в популяции гемоцитов *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клеток *E. coli*. Pr — прогемоциты, Pl — плазматоциты, Gr — гранулоциты, Oe — энотоиды, Sph — сферулоциты.

Fig. 12. Percentage of cell types in the hemocyte population of *G. mellonella* in the hemolymph of *G. mellonella* larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment bacterial suspension with active and inactivated cells of *E. coli*. Pr — prohemocytes, Pl — plasmatocytes, Gr — granulocytes, Oe — oenoctoids, Sph — spherulocytes.

B. cereus и *E. coli*, а также активные формы *B. subtilis* напротив, способствовали увеличению выживаемости клеток гемоцитов (рис. 13–16). Кроме того, через 24 ч после скармливания инактивированных *E. coli* было зарегистрировано значительное снижение числа сферулоцитов, которые участвуют в активации коагуляции и секвестрации микроорганизмов [Altincicek et al., 2008].

Активирование проФО каскада приводит к образованию меланина в клампах гемоцитов, сопровождается выбросом радикалов, в частности различных хинонов и полухинонов [Slepneva et al., 1999]. Известно, что энотоиды являются основным источником проФО у *G. mellonella* [Schmit et al., 1977]. Кроме того, ранее сообщалось о присутствии и способности к экспрессии молекул проФО гранулоцитами других *Lepidoptera* (в частности, *Bombyx mori* Linnaeus, 1758) [Ling et al., 2005; Liu et al., 2013]. Инактивированные бактерии приводили к значительному снижению активности ФО в гемолимфе личинок *G. mellonella* в первые часы после перорального скармливания (рис. 1–4). Сниженные значения ФО говорят об угнетении системы проФО

каскада у насекомых, тогда как повышенные уровни ФО, напротив, о вероятной секреции гемоцитами и высвобождении их содержимого в гемолимфу, то есть реакции на стресс [Coates, Söderhäll, 2020]. Пероральное инфицирование личинок активными клетками бактерий *B. thuringiensis galleriae* приводило к значительному подавлению активности ФО в первые 24 ч после воздействия, но было восстановлено до значения в контрольной группе к 48 ч, что коррелирует с значениями показателей ОЧГ и выживаемостью клеток гемоцитов. Было показано, что активация проФО каскада может быть стимулирована рецепторами, расположенными на поверхности клеток гемоцитов, например аполипофорином III и белком Gm-24 [Park et al., 2005], тогда как лизоцим, представляющий собой мурамидазы, разрушающие пептидогликан клеточных стенок бактерий и грибов [Yu et al., 2002], а также анионный пептид-2, Gm defensin и богатый пролином пептид 1 напротив, способствуют снижению активности ФО [Zdybicka-Barabas et al., 2014]. Активация данных процессов регулируется сложной цепью сигнальных путей (гемоциты-жировое тело, мышцы-гемоциты

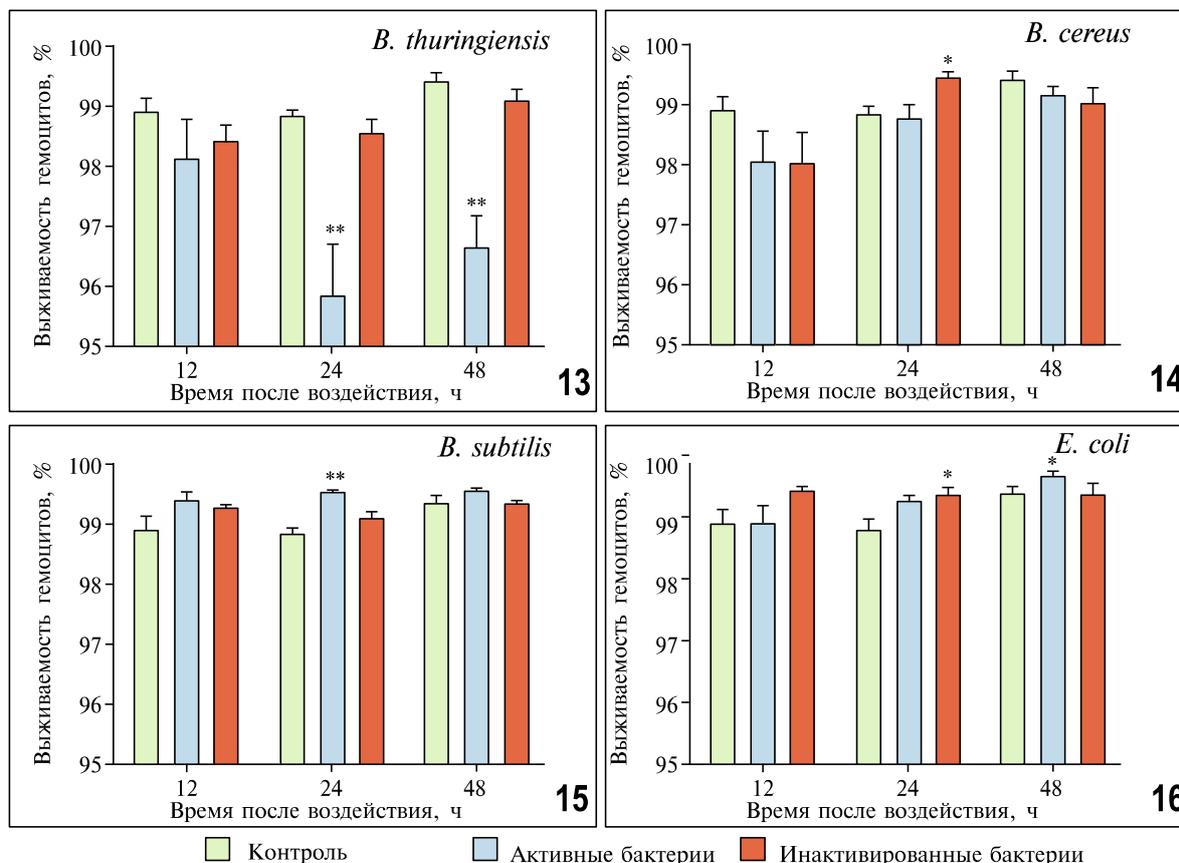


Рис. 13–16. Выживаемость гемоцитов в гемолимфе личинок *G. mellonella* через 12, 24 и 48 ч после *per os* инокуляции суспензий активных и инактивированных клостков. 13 — *B. thuringiensis galleria*; 14 — *B. cereus*; 15 — *B. subtilis*; 16 — *E. coli*.

Figs 13–16. Percentage of hemocyte survival of *G. mellonella* in the hemolymph of *G. mellonella* larvae after 12, 24 and 48 h *per os* treatment of bacterial suspension with active and inactivated cells. 13 — *B. thuringiensis galleria*; 14 — *B. cereus*; 15 — *B. subtilis*; 16 — *E. coli*.

и кишечник-жировое тело) [Commins et al., 2010; Wojda et al., 2020].

Вторжение любых микробов в кишечник приводит к нарушению равновесия микробиоты, что сопровождается увеличением концентрации продуктов вторичного метаболизма микробиоты [Shao et al., 2017; Zhang et al., 2022] и может приводить к модуляции симбионтами врождённых иммунных реакций [Laughton et al., 2011; Hassan et al., 2020; Perreau et al., 2021]. Наши результаты показали, что при скармливании даже инактивированных клеток бактерий наблюдается кратковременная активация клеточных иммунных реакций, что вероятно, связано с распознаванием насекомыми микробных компонентов. Вполне возможно, что взаимодействие рецепторов клеточного эпителия кишечника и бактерий приводит к выработке медиаторов, что сказывается на изменениях в гемоцитарной формуле *G. mellonella*. Данное исследование требует дальнейшего изучения роли гемоцитов в активации сигнальных путей и изменениях физиологического статуса насекомых.

Благодарности

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-76-10051, <https://rscf.ru/project/22-76-10051/>.

Авторы признательны за оказанную помощь в содержании линий насекомых к.с.-х.н. Е.А. Бунтовой и В.В. Зыряновой (ИСиЭЖ СО РАН).

References

- Altincicek B., Stötzel S., Wygrecka M., Preissner K.T., Vilcinskas A. 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects // *Journal of Immunology*. Vol.181. No.4. P.2705–2712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2705>
- Ariki S., Koori K., Osaki T., Motoyama K., Inamori K., Kawabata S. 2004. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* Vol.10. No.4. P.953–958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306904101>.
- Ashida M., Soderhall K. 1984. The prophenoloxidase activating system in crayfish // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*. Vol.77. No.1. P.21–26. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90217-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90217-7).
- Banerjee U., Girard J.R., Goins L.M., Spratford C.M. 2019. *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis // *Genetics*. Vol.211. No.2. P.367–417. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300223>.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. Vol.72. Nos 1–2. P.248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brehélin M., Zachary D. 1986. Insect Haemocytes: A new classification to rule out the controversy // Brehélin M. (Ed.): *Immunity in Invertebrates, Proceedings in Life Sciences*. Berlin,

- Heidelberg: Springer. P.36–48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70768-1_4.
- Cerenius L., Kawabata S.I., Lee B.L., Nonaka M., Söderhäll K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity // Trends in Biochemical Sciences. Vol.35. No.10. P.575–583. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.006>.
- Chain B.M., Anderson R.S. 1982. Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria // Journal of Insect Physiology. Vol.28. No.4. P.377–384. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90051-8).
- Chen Y.Y., Chen J.C., Lin Y.C., Kitikiew S., Li H.F., Bai J.C., Tseng K.C., Lin B.W., Liu P.C., Shi Y.Z., Kuo Y.H., Chang Y.H. 2014. Endogenous molecules induced by a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp // PLoS One. Vol.9. No.12. Art.e115232. P.1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115232>.
- Coates C.J., Söderhäll K. 2020. The stress-immunity axis in shellfish // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.186. Art.107492. P.1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107492>.
- Commis S.P., Borish L., Steinke J.W. 2010. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines // Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol.125. No.2. Suppl.2. P.53–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>.
- Cutuli M.A., Petronio Petronio G., Vergalito F., Magnifico I., Pietrangelo L., Venditti N., Di Marco R. 2019. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model host: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing // Virulence. Vol.10. No.1. P.527–541. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621649>.
- Dziarski R., Royet J., Gupta D. 2016. Peptidoglycan recognition proteins and lysozyme // Ratcliffe M.J.H. (Ed.): Encyclopedia of immunobiology. Vol.2. Oxford: Elsevier Academic Press. P.389–403. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374279-7.02022-1>.
- DeBlock M., Stoks R. 2008. Short-term larval food stress and associated compensatory growth reduce adult immune function in a damselfly // Ecological Entomology. Vol.33. No.6. P.796–801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01024.x>.
- Diehl-Jones W., Mandato C.A., Whent G., Downer R.G.H. 1996. Monoaminergic regulation of hemocyte activity // Journal of Insect Physiology. Vol.42. No.1. P.13–19. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00078-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00078-X).
- Duman E.E., Gwokyalya R., Altuntas H., Kutrup B. 2022. Screening the immunotoxicity of different food preservative agents on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae // Drug and Chemical Toxicology. Vol.46. No.4. P.757–767. <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2091589>.
- Eleftherianos I., Heryanto C., Bassal T., Zhang W., Tettamanti G., Mohamed A. 2021. Hemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites // Immunology. Vol.164. No.3. P.401–432. <https://doi.org/10.1111/imm.13390>.
- Elíes J., Yáñez M., Pereira T.M.C., Gil-Longo J., MacDougall D.A., Campos-Toimil M. 2020. An update to calcium binding proteins // Islam M. (Ed.): Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol.1131. Cham: Springer. P.183–213. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_8.
- Glupov V.V. 2001. Mechanisms of insect resistance // Glupov V.V. (Ed.): Insect pathogens: structural and functional aspects. Moscow: Kruglyi god. P.475–558. [In Russian].
- Gupta A.P. 1979. Hemocytes types, their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance // Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques. Cambridge: Cambridge University Press. P.85–127.
- Hultmark D. 1993. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity // Trend in Genetics. Vol.9. No.5. P.178–183. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90165-e](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90165-e).
- Hassan B., Siddiqui J.A., Xu Y. 2020. Vertically transmitted gut bacteria and nutrition influence the immunity and fitness of *Bactrocera dorsalis* larvae // Frontiers in Microbiology. Vol.11. Art.596352. P.1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596352>.
- Jiang H., Ma C., Lu Z.Q., Kanost M.R. 2004. Beta-1,3-glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*; an acute-phase protein that binds beta-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation // Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol.34. No.1. P.89–100. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.006>.
- Jiang H., Vilcinskas A., Kanost M.R. 2010. Immunity in Lepidopteran insects // Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol.708. P.181–204. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10.
- Jones R.M., Mercante J.W., Neish A.S. 2012. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications // Current Medicinal Chemistry. Vol.19. No.10. P.1519–1529. <https://doi.org/10.2174/092986712799828283>.
- Kanost M.R., Gorman M.J. 2008. Phenoloxidases in insect immunity // Beckage N.E. (Ed.): Insect immunology. San Diego: Academic Press. P.69–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12373976-6.50006-9>.
- Kavanagh K., Reeves E. P. 2004. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens // FEMS Microbiology Reviews. Vol.28. No.1. P.101–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>.
- Kurtz J., Franz K. 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity // Nature. Vol.425. P.37–38. <https://doi.org/10.1038/425037a>.
- Kurtz J. 2005. Specific Memory within innate immune systems // Trends in Immunology. Vol.26. No.4. P.186–192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>.
- Kordaczuk J., Sulek M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Śmiątek J., Wojda N. 2022. Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity // Scientific Reports. Vol.12. No.1. Art.11737. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15929-6>.
- Kryukova N.A., Mozhaytseva K.A., Rotskaya U.N., Glupov V.V. 2020. *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae) // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. Vol.106. No.1. No.e21746. <https://doi.org/10.1002/arch.21746>.
- Lange A., Beier S., Huson D. H., Parusel R., Iglauer F., Frick J.S. 2018. Genome sequence of *Galleria mellonella* (Greater wax moth) // Genome Announcements. Vol.6. No.2. No.e01220-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-17>.
- Lavine M.D., Strand M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity // Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol.32. No.10. P.1295–1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9).
- Laughton A.M., Garcia J.R., Altincicek B., Strand M.R., Gerardo N.M. 2011. Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* // Journal of Insect Physiology. Vol.57. No.6. P.830–839. P.830-839. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.015>.
- Lin Z., Wang J.L., Cheng Y., Wang J.X., Zou Z. 2020. Pattern recognition receptors from Lepidopteran insects and their biological functions // Developmental and Comparative Immunology. Vol.108. No.103688. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103688>.
- Ling E., Shirai K., Kanehatsu R., Kiguchi K. 2005. Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* // Tissue and Cell. Vol.37. No.2. P.101–107. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2004.10.007>.
- Lu Y.Z., Su F.H., Li Q.L., Zhang J., Li Y.J., Tang T., Hu Q.H., Yu X.Q. 2020. Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses // Developmental and Comparative Immunology. Vol.102. No.103468. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103468>.
- Liu F., Xu Q., Zhang Q., Lu A., Beerntsen B.T., Ling E. 2013. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori* // Invertebrate Survival Journal. Vol.10. No.1. P.102–109. <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/292>.
- Malanovic N., Lohner K. 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides // Biochimica et Biophysica Acta. Vol.1858. No.5. P.936–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>.
- Milutinović B., Fritzlar S., Kurtz J. 2014. Increased survival in the red flour beetle after oral priming with bacteria-conditioned media // Journal of Innate Immunity. Vol.6. No.3. P.306–314. <https://doi.org/10.1159/000355211>.
- Moret Y., Siva-Jothy M.T. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol.270. No.1532. P.2475–2480. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>.

- Oliver J.D., Dusty Loy J., Parikh G., Bartholomay L. 2011. Comparative analysis of hemocyte phagocytosis between six species of arthropods as measured by flow cytometry // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.108. No.2. P.126–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.004>.
- Oliveira S.C. 2014. Innate immune sensing of nucleic acids from pathogen // *Microbes and Infection*. Vol.16. No.12. P.977–988. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.003>.
- Park S.Y., Kim C.H., Jeong W.H., Lee J.H., Seo S.J., Han Y.S., Lee I.H. 2005. Effect of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella* // *Developmental and Comparative Immunology*. Vol.29. No.1. P.43–51. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.06.001>.
- Pech L.L., Strand M.R. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes // *Journal of Cell Science*. Vol.109. No.8. P.2053–2060. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.8.2053>.
- Perreau J., Zhang B., Maeda G.P., Kirkpatrick M., Moran N.A. 2021. Strong within-host selection in a maternally inherited obligate symbiont: *Buchnera* and aphids // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* Vol.118. No.35. No.e2102467118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102467118>.
- Pham L.N., Dionne M.S., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes // *PLoS Pathogens*. Vol.3. No.3. No.e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>.
- Polenogova O.V., Noskov Yu.A., Artemchenko A.S., Zhangissina S., Klementeva T.N., Yaroslavtseva O.N., Khodyrev V.P., Kruykova N.A., Glupov V.V. 2022. *Citrobacter freundii*, a natural associate of the Colorado potato beetle, increases larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* // *Pest Management Science*. Vol.78. No.9. P.3823–3835. <https://doi.org/10.1002/ps.6856>.
- Rao X.J., Cao X., He Y., Hu Y., Zhang X., Chen Y.R., Blissard G., Kanost M.R., Yu X.Q., Jiang H. 2015. Structural features, evolutionary relationships, and transcriptional regulation of C-type lectin-domain proteins in *Manduca sexta* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol.62. P.75–85. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.006>.
- Renwick J., Reeves E. P., Wientjes F. B., Kavanagh K. 2007. Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella* // *Developmental and Comparative Immunology*. Vol.31. No.4. P.347–359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.007>.
- Rodrigues J., Brayner F.A., Alves L.C., Dixit R., Barillas-Mury C. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes // *Science*. Vol.329. No.5997. P.1353–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1190689>.
- Roth O., Sadd B.M., Schmid-Hempel P., Kurtz J. 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol.276. No.1654. P.145–151. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1157>.
- Satyavathi V.V., Mohamed A.A., Kumari S., Mamatha D.M., Duvic B. 2018. The IMD pathway regulates lysozyme-like proteins (LLPs) in the silkworm *Antheraea mylitta* // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.154. P.102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.006>.
- Schmit A.R., Rowley A.F., Ratcliffe N.A. 1977. The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.29. P.232–234. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90200-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90200-2).
- Shao Y., Chen B., Sun C., Ishida K., Hertweck C., Boland W. 2017. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota // *Cell Chemical Biology*. Vol.24. No.1. P.66–75. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015>.
- Slepneva I.A., Glupov V.V., Sergeeva S.V., Khramtsov V.V. 1999. EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol.264. No.1. P.212–215. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1504>.
- Swaminathan C.P., Brown P.H., Roychowdhury A., Wang Q., Guan R., Silverman N., Goldman W.E., Boons G.J., Mariuzza R.A. 2006. Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* Vol.103. No.3. P.684–689. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507656103>.
- Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V. 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila* // *Development*. Vol.120. No.7. P.1829–1837. <https://doi.org/10.1242/dev.120.7.1829>.
- Vogel H., Altincicek B., Glockner G., Vilcinskas A. 2011. A comprehensive transcriptome and immunogene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella* // *BMC Genomics*. Vol.12. No.308. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-308>.
- Wang P., Zhuo X.R., Tang L., Liu X.S., Wang Y.F., Wang G.X., Yu X.Q., Wang J.L. 2017. C-type lectin interacting with beta-integrin enhances hemocytic encapsulation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol.86. P.29–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.05.005>.
- Wang Y., Spatz M., Da Costa G., Michaudel C., Lapiere A., Danne C., Agus A., Michel M.L., Netea M.G., Langella P., Sokol H., Richard M.L. 2022. Deletion of both dectin-1 and dectin-2 affects the bacterial but not fungal gut microbiota and susceptibility to colitis in mice // *Microbiome*. Vol.10. No.1. P.91. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01273-4>.
- Wojda I., Staniec B., Sułek M., Kordaczuk J. 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies // *Pathogens and Disease*. Vol.78. No.9. No.ftaa057. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa057>.
- Whitten M.M.A., Coates C.J. 2017. Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side // *Pigment Cell and Melanoma Research*. Vol.30. No.4. P.386–401. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12590>.
- Wu G., Liu Y., Yi Y. 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: cell types and their role in innate immunity // *Tissue and Cell*. Vol.48. No.4. P.297–304. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.06.007>.
- Xu L., Ma L., Wang W., Li L., Lu Z. 2019. Phenoloxidases are required for the pea aphid's defense against bacterial and fungal infection // *Insect Molecular Biology*. Vol.28. No.2. P.176–186. <https://doi.org/10.1111/imb.12536>.
- Yu K.H., Kim K.N., Lee J.H., Lee H.S., Kim S.H., Cho K.Y., Nam M.H., Lee I.H. 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three Lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli* // *Developmental and Comparative Immunology*. Vol.26. No.8. P.707–713. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(02\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(02)00027-7).
- Yu X.Q., Kanost M.R. 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* // *Developmental and Comparative Immunology*. Vol.28. No.9. P.891–900. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.02.005>.
- Zdybicka-Barabas A., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M. 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella* // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Vol.87. No.1. P.1–12. <https://doi.org/10.1002/arch.21175>.
- Zhang W., Tettamanti G., Bassal T., Heryanto C., Eleftherianos I., Mohamed A. 2021. Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways // *Cellular Signalling*. Vol.83. Art.110003. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003>.
- Zhang X., Feng H., He J., Muhammad A., Zhang F., Lu X. 2022. Features and colonization strategies of *Enterococcus faecalis* in the gut of *Bombyx mori* // *Frontiers in Microbiology*. Vol.13. Art.921330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.921330>.
- Zhu Y., Yu X., Cheng G. 2020. Insect C-type lectins in microbial infections // Hsieh S.L. (Ed.): *Lectin in Host Defense Against Microbial Infections*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol.1204. Singapore: Springer. P.129–140. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_5.