ISSN 2072-2419

№ 2

Международный вестник ветеринарии

INTERNATIONAL BULLETIN OF VETERINARY MEDICINE

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2017

www.spbgavm.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Фармакология, токсикология, фармация	• *Изменение уровня содержания деформированных эритроцитов крыс под воздействием фосфорорганической интоксикации. Алистратова Ф. И., Скопичев В.Г.*	**9**
	• *Повышение эффективности современных сорбентов. Барышев В.А., Попова О.С., Свиридова А.В.*	**13**
Зоогигиена, санитария, кормление	• *Зоогигиенические аспекты использования обработанной рисовой шелухи в кормлении тяжелосупоросных и лактирующих свиноматок. Кузнецов А.Ф., Ачилов В.В., Зенков К.Ф., Никитин Г.С.*	**17**
	• *Микробиологические показатели мяса нерпы кольчатой, добытой в арктической зоне республики Саха (Якутия). Березкина М.М., Малтугуева М.Х., Васильев С.В*	**23**
Биохимия, анатомия, физиология	• *Морфометрия нервных стволов грудной конечности йоркширского терьера. Вирунен С.В., Щипакин М.В., Прусаков А.В., Васильев Д.В., Былинская Д.С.*	**27**
	• *Физиологическая выраженность агрегационных процессов в крови телок в ходе доращивания. Глаголева Т.И.*	**30**
	• *Некоторые показатели жизнеспособности молодняка овец различного происхождения. Абонеев В.В, Марченко В.В., Гнездилова Л.А.*	**35**
	• *Воздействие кастрации на морфологию эритроцитов. Скопичев В. Г., Богачев Н. Н.*	**42**
	• *Возрастные изменения гистоструктуры легких у куриных эмбрионов. Сулейманов Ф.И., Суйя Е.В., Челнокова М.И.*	**46**
	• *Совершенствование продуктивных качеств крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы племенного хозяйства московской области. Бакай А.В., Тыньо Я.Я., Якименко Н.Н.*	**50**
	• *Изучение гематологических показателей крови коров при применении увмк «Лизунца Солевит». Хайруллин Д.Д., Валиуллин Л.Р., Егоров В.И., Овсянников А.П.*	**55**
Хирургия	• *Влияние острого воспалительного процесса на изменения в тканях глазного яблока собак. Стекольников А.А., Усольцева И.Б.*	**60**
Незаразные болезни	• *Клиническая классификация дисбиозов у телят при незаразных желудочно-кишечных болезнях. Ковалёнок Ю.К., Курдеко А.П.*	**65**
	• *Сравнительная характеристика инструментальных методов диагностики колитов у собак. Трушкин В.А., Ковалев С.П., Воинова А.А., Никитин Г.С., Гапонова В.Н.*	**71**
	• *Механизмы появления почечнокаменной болезни у костистых рыб. Лукин А.А.*	**76**
Экспериментальная фармакология	• *Личинки большой восковой моли (galleria mellonella) как модельный объект для исследования новых лекарственных средств. Гайдай Д.С., Гайдай Е.А., Макарова М.Н*	**82**
	• Питание лабораторных животных. Основные рационы. Сообщение. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Рыбакова А.В., Зозуля О.К.	**91**

- *Выбор вида животных для оценки нейротоксичности фармакологических веществ. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Шекунова Е.В* **106**
- *Трансформация щитовидной железы лошадей в условиях йодной недостаточности. Пилов А.Х.* **113**
- *Использование песчанок для биомедицинских исследований. Рыбакова А.В., Макарова М.Н.* **117**

Незаменимые аминокислоты + энергетики + железо, кобальт, медь + витамины группы В

Профилактика и лечение заболеваний:
- гиповитаминозы и микроэлементозы;
- субклинический и клинический кетоз;
- гипофункция яичников;
- патологии спермиогенеза;
- снижение индекса осеменения;
- анемии различной этиологии;
- гипотрофия новорожденных телят.

Дозировка и способ применения:
коровам и быкам в дозе 10 мл на 450 кг живой массы с интервалом 48 часов (3-5 инъекций).
Телятам - гипотрофикам помогает сразу после однократного введения в дозе 1 мл в/м в первые сутки жизни

Форма выпуска: Флаконы по 5, 10, 100, 500 мл.
Организация-производитель: «Ceva Animal Health Pty Ltd», Австралия

Эксклюзивный представитель в странах Евразийского Экономического Союза: **ГК «НЕВА-ВЕТ»**, тел./факс **(812) 596-39-62**. **www.vetapteka.ru**
Номер регистрационного удостоверения: 036-3-1.15-2560 №ПВИ-3-9.9/02967

HAEMOBALANS injection

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 57.084

ЛИЧИНКИ БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ (GALLERIA MELLONELLA) КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Гайдай Д.С.-биолог, Гайдай Е.А.-биолог, Макарова М.Н.- ведущий научный сотрудник, д.м.н. ЗАО «НПО» ДОМ ФАРМАЦИИ»

Ключевые слова: доклинические исследования, беспозвоночные, личинки большой восковой моли, Galleria mellonella, альтернативные модели, биологические тест-системы. **Key words:** pre-clinical studies, invertebrates, greater wax moth larvae, Galleria mellonella, alternative models, a biological test-redundant system.

РЕФЕРАТ

Обзор посвящен личинкам большой восковой моли (Galleria mellonella) и возможностям использования их в доклинических исследованиях. В конце 60-х годов была предложена концепция 3R, которая является общепринятым мировым стандартом, позволившим в значительной степени сократить количество используемых лабораторных животных. Использование млекопитающих в качестве моделей для биомедицинских исследований, является высокозатратным, а также сопряжено с биоэтическими проблемами. В последние годы в качестве альтернативной модели для изучения бактериальных и грибковых инфекций, а также для оценки эффективности антибактериальных препаратов широко используют личинки большой восковой моли (G. mellonella).

Личинки G. mellonella дешевы и просты в использовании, у них короткий жизненный цикл. Отсутствие биоэтических ограничений и возможность большой выборки позволяет большой восковой моли быть модельным объектом в таких тестах как определение микробной вирулентности и патогенности микроорганизмов и прочих паразитов, определение LD50 лекарственного средства и токсичность веществ, изучение фармакокинетики, тестирование эффективности противомикробных лекарственных средств на зараженных личинках G. mellonella. Также преимуществами использования этого насекомого является простота использования, низкие затраты, быстрый результат и накопленный мировой опыт работы с ними.

Эти характеристики делают G. mellonella идеальным объектом исследований [8,9]. Несмотря на отсутствие у насекомых приобретенного иммунитета, врожденный иммунитет имеет значительное сходство с иммунным ответом позвоночных животных, в том числе и человека [6,8]. Применение личинок большой восковой моли в исследованиях антимикробной активности и токсичности лекарственных средств растет с каждым годом и охватывает широкий спектр микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

В 1959 г. Расселом и Берчем [7] была предложена концепция 3R. Сегодня эта концепция является общепринятым мировым стандартом, позволившим в значительной степени сократить количество

Таблица 1

Компоненты иммунной системы G. mellonella

Клеточный иммунитет	
Гемоциты	Прогемоциты
	Плазматоциты
	Гранулоциты
	Коагулоциты
	Сферулоциты
	Эноцитоиды
Гуморальный иммунитет	
Опсонины	Аполипофорин-III (apoLp-III)
	Пептидогликан-распознающие белки (PGRP)
	Катионный пептид 8 (GmCP8)
	Гемолин
Антимикробные пептиды (AMP)	Лизоцим
	Цекропин
	Морициноподобные пептиды
	Гловерин
	Галиомицин
	Галлеримицин
	Galleria дефенсин
	Gm пролин-богатые пептиды 1 и 2
	Gm анионный пептид 1 и 2
	Индуцируемый ингибитор сериновой протеазы 2
	Гелиоцин-подобный пептид
	X-tox
	Gm аполипофорицин
Меланизация	Фенолоксидаза

используемых лабораторных животных. В последние годы в качестве альтернативной модели для изучения бактериальных и грибковых инфекций, а также для оценки эффективности антибактериальных препаратов широко используют личинки большой восковой моли.

Большая восковая моль или пчелиная огневка Galleria mellonella – один из традиционных объектов лабораторных исследований [1]. Отсутствие биоэтических ограничений и возможность большой выборки позволяет большой восковой моли быть модельным объектом в следующих тестах:

Определение микробной вирулентности и патогенности микроорганизмов и прочих паразитов

Определение LD50 лекарственного средства и токсичность веществ.

Фармакокинетика

Тестирование эффективности противомикробных средств на зараженных личинках.

Также преимуществами использования этого насекомого является простота использования, низкие затраты, быстрый результат и накопленный мировой опыт работы с ними.

G. mellonella продуцирует несколько белков плазмы, которые служат в качестве опсонинов, которые распознают и связываются с консервативными микробными компонентами, сходными с рецепторами распознавания образов у млекопитающих.

Несмотря на отсутствие у насекомых

приобретенного иммунитета, врожденный иммунитет восковой моли имеет значительное сходство с иммунным ответом позвоночных животных, в том числе и человека [6,8]. Эти характеристики делают G. mellonella идеальным объектом исследований [8,9]

АНАТОМИЯ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ

Большая восковая моль (Galleria mellonella) (син.: пчелиная огневка, клочень, мотылица, шашень) из отряда чешуекрылых относится к семейству огневок (Pyralidae), распространенных по всему земному шару, где есть пчелы, за исключением районов с суровым климатом или расположенных на высоте свыше 1500-2000 м над уровнем моря [3].

Тип: Arthropoda (Членистоногие), Класс: Insecta (Насекомые), Отряд: Lepidoptera (Чешуекрылые), Семейство: Pyralidae (Настоящие огневки), Род: Galleria, Вид: Galleria mellonella, (Linnaeus, 1758) [11]

Гусеницы восковой или пчелиной огневки (Galleria mellonella) развиваются в ульях, где питаются воском, оплетая при этом ячейки паутиной. Они являются вредителями пчеловодства, доводя при массовом размножении ульи до гибели. Продолжительность жизни самок Galleria mellonella составляет 7-12 дней, самцов — 10-26 дней. Для откладки яиц самки выбирают чаще сильные семьи пчел. Каждую ночь в одну пчелиную семью могут входить для откладки яиц от 7 до 12 молей.

Рис.1 – Инъекция внутрь гемоцеля через последнюю левую ложноножку [4]

Яйца откладываются отдельными партиями на стенки ячеек со свежей пыльцой. За свою жизнь самка откладывает до 1850 яиц. Яйца белого цвета, круглые или слегка овальные, величиной около 0,5×0,35 мм. Развитие яйца продолжается 5-8 суток. Вышедшая из яйца личинка имеет длину 1 мм, передняя часть ее тела значительно шире задней, голова светло-желтого цвета, несколько уплощена; имеет 8 ног и на заднем конце две щетинки. В первые 10-20 минут она малоподвижна, продвигается по ячейке пчелиных сот сверху вниз. Через 15-30 минут становится более активной, питается в течение 10-30 мин медом из открытых ячеек, иногда останавливается для питания в ячейках с пыльцой. Через 2 часа личинка вновь потребляет мед 5-10 минут, а затем начинает поедать воск. Перевариванию этого продукта способствует фермент липаза, присутствующий в гемолимфе Galleria mellonella, которая гидролизует, не только воск, но и, например, восковую капсулу туберкулезных палочек.

Взрослая личинка беловато-серого цвета, голова бурая. Тело ее длиной около 18 мм состоит из 13 сегментов. Оно широкое в средней части и слегка суживается к головному и заднему концам.

При 30-32°С полный цикл развития длится 47 дней: яйцо – 8 дней, личинка – 30 дней; куколка – 9 дней, перед окукливанием личинка формирует кокон. Наружный слой кокона плотный, внутренняя оболочка мягкая и пушистая. На прядение его личинки затрачивают более двух дней.

В условиях улья цикл развития составляет 5-8 недель (57-63 дня). При 20°С развитие затягивается, а при 10°С и ниже прекращается. При минусовых температурах пчелиная огневка погибает во всех стадиях [2].

ИММУННАЯ СИСТЕМА

Врожденный иммунный ответ насе-

Таблица 2

Система учета показателей здоровья личинок *Galleria mellonella*

Критерий	Описание	Оценка
Подвижность	Отсутствует	0
	Минимальная активность, вызванная стимуляцией	1
	Активность, вызванная стимулом	2
	Активность без стимуляции	3
Образование кокона	Не образует кокон	0
	Частичное образование кокона	0,5
	Полный кокон	1
Меланизация	Черные личинки	0
	Черные точки на коричневых личинках	1
	≥3 точек на личинке кремового цвета	2
	<3 точек на личинке кремового цвета	3
	Меланизация отсутствует	4
Выживаемость	Погибшие	0
	Живые	2

Рис. 2 – Стадии меланизации личинок и образования кокона [8]

комых включает 2 компонента: клеточный и гуморальный. Клеточный ответ опосредован гемоцитами. Эти клетки находятся в гемолимфе, которая функционирует аналогично крови млекопитающих. Основной функцией гемоцитов является фагоцитоз. Гемоциты способны поглощать большое количество твердых частиц, кармина, мертвых бактерий, погибших форменных элементов и в особенности клеток, гистолизированных при линьке (гемоциты выполняют роль

Таблица 3

Использование личинок большой восковой моли (*G. Mellonella*) в микробиологических исследованиях

Патоген	Ссылка	
	Автор	Год
Streptococcus pyogenes	Loh J.M. et al.	2013
	Olsen R.J. et al.	2011
Streptococcus pneumoniae	Evans B.A., Rozen D.E.	2012
Enterococus faecalis	La Rosa S.L. et al.	2012, 2013
	Park S.Y. et al.	2007
	Zhao C. et al.	2010
Enterococus faecium	Chibebe Junior J. et al.	2013
	Lebreton F. et al.	2011, 2012
Staphylococcus aureus	Desbois A.P., Coote P.J.	2011
Listeria monocytogenes	Mukherjee K. et al.	2010, 2011, 2013
Pseudomonas aeroginosa	Andrejko M. et al.	2005, 2011, 2012, 2014
Escherichia coli	Leuko S., Raivio T.L.	2012
Klebsiella pneumonia	Harding C.R. et al.	2012, 2013
Legionella pneumophila	Koch G. et al.	2014
Francisella tularensis	Ahmad S. et al.	2010
	Aperis G. et al.	2007
Acinetobacter baumanii	Jacobs A.C. et al.	2014
	Peleg A.Y. et al.	2009
Burkholderia sp.	Koch G. et al.	2014
	Schell M.A. et al.	2008
	Seed K.D., Dennis J.J.	2008
	Thomas R.J. et al.	2013
	Wand M.E. et al.	2011

макрофагов) [8].

У насекомых иммунитет в основном обуславливается фагоцитозом. Гемоциты Galleria фагоцитируют таких бактерий как туберкулезная палочка или стафилококки и не чувствительны к присутствию других форм, например, коккобацилл. Они реагируют на введение ничтожных количеств кишечных бактерий, Bacillus sumtilis и сибирской язвы [8].

Подобный фагоцитоз сопровождается интересной гуморальной особенностью: гемолимфа насекомых не содержит ни сенсибилизаторов, ни алексинов. Однако в гемолимфе насекомых были обнаружены агглютинины, бактериолизины, действующие на коккобациллы, холерные вибрионы и дезинтерийные бактерии Шига. Эти антитела неспецифичны и появление их можно вызвать простым введением чужеродного белка [8].

Клеточный иммунитет:

У Galleria mellonella обнуржено 6 из 8 типов гемоцитов: прогемоциты (пролейкоциты), плазматоциты, гранулоциты (зернистые лейкоциты), коагулоциты, сферулоциты (клетки со сферическими включениями), эноцитоиды. [8].

Плазматоциты и гранулоциты играют ключевую роль в клеточной защите. Они участвуют в фагоцитозе, образовании «узелков» и инкапсуляции. Фагоцитоз у насекомых схож с данным процессом у млекопитающих.

Гуморальный иммунный ответ:

G. mellonella продуцирует несколько белков плазмы, которые служат в качестве опсонинов, которые распознают и связываются с консервативными микробными компонентами, сходными с рецепторами распознавания образов у млекопитающих. Аполипофорин-III (apoLp-III), основная обменная молекула переноса липидов, играет важную роль во врожденном иммунном ответе в качестве молекулы распознавания образов. ApoLp-III демонстрирует высокое сродство к гидрофобным лигандам, таким как бактериальный липополисахарид (LPS) и липотейхоевая кислота (LTA). Кроме того, сообщалось о связывании с β-1,3-глюканом и грибными конидиями, что приводит к увеличению клеточного инкапсулирования. ApoLp-III демонстрирует высокую гомологию с аполипопротеином E (apoE) млекопитающих, который участвует в детоксикации LPS, стимуляции фагоцитоза и выделении оксида азота (NO) из тромбоцитов. ApoLp-III стимулирует увеличение антибактериальной активности гемолимфы и продукции супероксида гемоцитами и повышает активность антимикробного пептида цекропина. ApoLlo-III действует синергетически с лизоцимом G. mellonella, увеличивая пермеабилизирующую активность лизоцима против грамотрицательных бактерий [8,10].

Пептидогликан-распознающие белки (PGRP) связываются с пептидогликаном через консервативный домен, гомологичный лизоциму бактериофага T4. PGRP восковой моли были обнаружены с помощью анализа индуцированных LPS генов в гемоцитах. Пептидогликан-распознающие белки у некоторых других видов насекомых также способны гидролизовать пептидогликан, но это не было продемонстрировано для PGRP у G. mellonella.

Из гемолимфы личинок G. mellonella был идентифицирован новый опсонин с гомологией катионного белка 8 (CP8) Manduca sexta (табачный бражник) и назван GmCP8 (G. mellonella CP8). GmCP8, который продуцируется в жировом теле (биосинтетический орган, аналог печени у млекопитающих), средней кишке и кожных покровах и секретируется в гемолимфе, проявляет заметную связывающую активность с LPS, LTA и β-1,3-глюканом.

Антимикробные пептиды (AMP) встречаются в клетках миелоидной и эпителиальной природы млекопитающих, амфибий, рыб, насекомых, птиц, растений и др. и играют важную роль во врожденном иммунитете, демонстрируя микробицидную активность широкого спектра. Анализ спектра AMP гемолимфы G. mellonella выявил 18 AMPs: лизоцим, морициноподобные пептиды, цекропины, гловерин, Gm пролин-богатые пептиды 1 и 2, Gm анионный пептид 1 и 2, галиомицин, галлеримицин, индуцируемый ингибитор сериновой протеазы 2, x-tox и гелиоцин-подобный пептид. Другой AMP, дефенсин насекомых, названный Galleria дефенсин, был очищен от личиночной гемолимфы G. mellonella, иммунизированной против E. coli.

AMP у насекомых в основном производятся в жировом теле, гемоцитах, пищеварительном тракте, слюнных железах и репродуктивной системе. У млекопитающих AMP секретируются из эпителиальных и фагоцитарных клеток, где они запасаются во внутриклеточных гранулах. Лизоцим разрушает пептидогликан клеточной стенки путем гидролиза β-1,4-связи между N-ацетилглюкозаминовой и N-ацетилмурамовой кислотами.

Лизоцим G. mellonella также показывает неферментативную активность против грибков, напоминающую способ действия катионных защитных пептидов. Цекропины и морицины принадлежат к семейству амфипатических α-спиральных AMP, которые проникают через стенки бактериальных клеток и образуют поры в

цитоплазматической мембране, что приводит к утечке ионов. Они активны в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий.

Дефенсины - богатые цистеином катионные пептиды действуют, формируя зависимые от напряжения ионные каналы в цитоплазматической мембране, что приводит к утечке ионов и лизису клеток. Дефенсины насекомых действуют против грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий.

Пролин-богатые пептиды представляют собой небольшие пептиды в пределах 2-4 кДа, они увеличивают проницаемость мембран бактерий. Gm пролин-богатые пептиды 1 и 2 ингибируют рост дрожжей. Гловерин относится к семейству антимикробных пептидов, богатых глицином, который связывается с LPS на грамотрицательных бактериях и ингибирует синтез жизненно важных белков наружной мембраны, приводя к проницаемости мембраны. Галлеримицин - дефенсин-подобный противогрибковый пептид, выделен из гемоцитов G. mellonella, обработанных LPS, не оказывает заметного влияния на грамположительные и грамотрицательные бактерии или дрожжи, но проявляет активность против нитчатых грибов. X-tox представляет собой нетипичный индуцибельный дефенсин-подобный пептид, в котором отсутствует обнаруживаемая антимикробная активность, предполагающая пока еще неизвестную иммунную функцию [8].

Меланизация:

Реакция меланизации может быть описана как синтез и осаждение меланина для инкапсуляции патогенов в месте раны с последующей коагуляцией гемолимфы и опсонизацией и аналогична образованию абсцесса при инфекциях млекопитающих.

Образование меланина катализируется фенолоксидазой (PO), которая вырабатывается как неактивная профенолоксидаза зимогена (ProPO) в гемоцитах. ProPO насекомых - важный врожденный белок иммунитета, участвует в клеточной и гуморальной защите. Меланизация инициируется после взаимодействия растворимых паттернраспознающих рецепторов (PRR) с поверхностями-мишенями, такими как LTA или термолизин, запускающими каскад сериновой протеазы, что приводит к расщеплению ProPO и образованию PO. Активированный PO превращает монофенолы и фенолы в хиноны, которые полимеризуются неферментативно с образованием меланина вокруг патогенных микроорганизмов и ран. PO также может продуцировать клетки, разрушающие активные формы кислорода, активация PO контролируется ингибиторами протеаз. Лизоцим, Galleria дефенсин, пролин-богатый пептид 1 и анионный пептид 2 уменьшают активность PO гемолимфы, что свидетельствует о значительности этих AMP в иммунной модуляции.

При стимуляции LPS, PMA или интерлейкином-8 (IL-8) нейтрофилы высвобождают хромосомную ДНК, содержащую бактерицидные белки, чтобы сформировать внеклеточный фибриллярный матрикс, известный как нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs), благодаря их способности захватывать и убивать бактерии. Микроскопические ex-vivo анализы реакций свертывания гемолимфы G. mellonella показали, что эноцитоиды являются источником эндогенно полученных внеклеточных нуклеиновых кислот. Предположительно активно высвобождаемая нуклеиновая кислота из нейтрофилов и гемоцитов имеет сопоставимую роль в захвате патогенов и усилении врожденных иммунных реакций [8].

Ряд исследований показывают наличие индуцируемых иммунных молекул Galleria mellonella, которые обеспечивают относительно долговечные противомикробные реакции при повторном заражении [5].

В таблице 1 представлены компоненты иммунной системы G. mellonella.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОСКОВОЙ МОЛИ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В качестве животной модели используют личиночную стадию Galleria mellonella. Личинок в лабораторных условиях рекомендуют содержать на ис-

кусственном субстрате (22% кукурузной муки, 22% зародышей пшеницы, 11% сухих дрожжей, 17,5% пчелиного воска, 11% меда, и 11% глицерина) при 32°C в темноте [5].

В качестве модели для экспериментальных исследований используют личинки последней возрастной стадии, приблизительно возраста 5 недель с момента выхода из яйца. Личинки имеют длину от 2 до 2,5 см и имеют кремовый цвет. Личинок содержат при 15°C перед использованием, также рекомендуется лишать личинок пищи за 24 часа до заражения [5,8].

Наиболее распространенный путь инфицирования - инъекция внутрь гемоцеля через последнюю левую ложноножку или через кожу (рисунок 1). Также описан пероральный путь инфицирования, однако в таком случае сложно дозировать инфекционный агент. Эту проблему можно решить с помощью более сложного в техническом отношении метода принудительного кормления [4,5,8].

Микробные инокуляты должны быть очищены до заражения от факторов вирулентности, секретируемых во время роста микроорганизмов in vitro. Также рекомендуется применять плацебо-посевной материал в качестве контроля за потенциальной физической травмой, вызванной инъекцией.

После заражения личинок содержат при температуре до 37°C. Микробная вирулентность обычно оценивается в течение 5 дней. В качестве конечной точки наиболее часто используют оценку выживаемости в разные моменты времени. Другие конечные точки включают экспрессию антимикробных белков в ответ на инфекцию и продуцирование лактатдегидрогеназы в качестве маркера повреждения клеток [5,8].

Также существует система учета показателей здоровья, представленная в таблице 2 и на рисунке 2, в которой оценивается состояние здоровья личинок путем присвоения баллов по 4 основным показателям: подвижность личинок, образование коконов, меланизация и выживаемость [8].

Меланизация обычно начинается с характерных черных пятен на личинках кремового цвета. Полная меланизация (черные личинки) коррелирует с гибелью личинок.

Микробная вирулентность также может быть оценена путем измерения пролиферации микроорганизма внутри личинок во время инфекции. Обычно это делается путем нанесения личиночных экстрактов на чашки с агаром для подсчета или с использованием биолюминесцентных микроорганизмов для определения патогенной нагрузки посредством биофотонной визуализации.

Заражение грибковыми агентами можно оценить препарируя личинок. После заражения личинок периодически препарируют и оценивают зараженность спорами тканей кишечника, жирового тела, гемолимфы и слюнных желез с помощью световой микроскопии. Кроме того, в гемолимфе больных гусениц могут быть выявлены многоядерные гемоциты, никогда не наблюдаемые у здоровых особей [1].

Применение личинок большой восковой моли в исследованиях антимикробной активности лекарственных средств охватывает широкий спектр микроорганизмов, перечень которых представлен в таблице 3 [8].

Greater wax moth (Galleria mellonella) as a model object for researching new drugs. Gaidai D., Gaidai E., Makarova M.

ABSTRACT

The review is devoted to greater wax moth (Galleria mellonella) and possibilities of their use in preclinical studies.

First described in late 60's the 3Rs Principle has been considered as generally accepted world standard which makes it possible to reduce the number of laboratory animals used. There are ethical and budgetary hurdles associated with the use of mammals as infection models. Over recent years, G. mellonella has been widely used as an infection model to study bacterial and fungal infections and for assessing the efficacy of novel antimicrobial drugs.

G. mellonella larvae are cheap and easy

to use, they have a short life cycle. The absence of bioethical limitations and possibility of a large-sample allows a greater wax moth to be a model object in such tests as the determination of microbial virulence and pathogenicity of microorganisms and other parasites, the determination of drug LD50 and toxicity of substances, the study of pharmacokinetics, testing the effectiveness of antimicrobial drugs on infected G. mellonella larvae. These characteristics makes them ideal for studies. Although insects lack an adaptive immune response, their innate immune response shows remarkable similarities with the immune response in vertebrates including humans.

Using the G. mellonella as model for antimicrobial activity demonstrate the increasing popularity and cover a wide range of microorganisms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова, Я. Л. Микроспоридиоз пчелиной огневки Galleria mellonella (lepidoptera: pyralidae), вызываемый Vairimorpha ephestiae (microsporidia: burenellidae) / Я.Л. Воронцова, Ю.С.Токарев, Ю.Я. Соколова, В.В. Глупов // Паразитология. -2004. -№3. –С.239-250.
2. Гробов, О.Ф. Болезни и вредители медоносных пчел: Справочник / О.Ф. Гробов, А.М. Смирнов, Е.Т. Попов.— М.:Агропромиздат, 1987. -335с.
3. Жизнь животных в 6 томах. Том 3 Беспозвоночные. // Под редакцией Л. А. Зенкевича — М.: Просвещение, 1969. -575с.
4. Megaw, J. Galleria mellonella as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids / J. Megaw, T.P. Thompson, R.A. Lafferty, B.F. Gilmore // Chemosphere. -2015. -№139. –P.197-201.
5. Mukherjee, K. Galleria mellonella as a model system for studying Listeria pathogenesis / K. Mukherjee, B. Altincicek, T. Hain, E. Domann, A. Vilcinskas, T. Chakraborty // Applied And Environmental Microbiology. -2010. -Vol.76. -№1. -P.310–317.
6. Purygin, P.P. Analysis and antibacterial activity of hemolymph fractions from immunized G. mellonella larvae / P.P. Purygin, S. Sribnaya, K. Buryak // Pharmaceutical Chemistry Journal. -2010. –Vol.44. -№1. –P. 713-726.
7. Russell, W.M.S. The principles of humane experimental technique // London: Methuen & Co. Ltd Survey. -1959. –P. 101-107.
8. Tsai, C.J. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing / C.J. Tsai, J.M. Loh, T. Proft // VIRULENCE. -2016. –Vol.7. -№3. -P.214-229.
9. Vogel, H.A. comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella / H.A. Vogel, B. Altincicek, G. Glockner, A. Vilcinskas // BMC Genomics. -2011. -No.12. -P.308.
10. Zdybicka-Barabas, A. Synergistic action of Galleria mellonella apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria / A. Zdybicka-Barabas, S. Staczek, P. Mak, K. Skrzypiec, E. Mendyk, M. Cytrynska // Biochim Biophys Acta. -2013. –Vol.1828. -P.1449-1456.
11. Электронный ресурс: http://www.fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/edd629e7-6fe8-4bfa-885f-77cd98e21451

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятиях при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.
Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.
Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com