

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Российский государственный гидрометеорологический университет»

На правах рукописи

Дун Сянли



Экспрессия генов белков иммунной системы рыб в динамике в ответ на
бактериальные инфекции

03.02.06-ихтиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель

Доктор биологических наук

Юлия Николаевна Лукина

Научный консультант

Кандидат биологических наук,

Василий Александрович Голотин

Санкт-Петербург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 Обзор литературы	10
1.1 Организация иммунной системы рыб	10
1.1.1 Ткани и органы иммунной системы рыб	11
1.1.2 Клеточный иммунитет рыб	13
1.1.3 Гуморальный иммунитет.....	14
1.1.4 Факторы, влияющие на иммунный ответ рыб	17
1.2 Молекулярные механизмы регуляции иммунной системы рыб	18
1.2.1 Структура и функция хемокинов	18
1.2.2 Структура и функция рецепторов маннозы	21
1.3 Типы иммунизации рыб	25
1.4 Краткая характеристика бактериальных заболеваний рыб и методы профилактики и лечения	32
1.5 Сведения о современном состоянии и проблемах аквакультуры	40
в Китае и России.....	40
1.5.1 Современное состояние рыбного хозяйства в Китае	40
1.5.2 Современное состояние аквакультуры в России	47
1.6 Объекты исследования: тепловодный вид марикультуры Китая большой желтый горбыль <i>L. crocea</i> и холодноводный вид лимнокультуры России радужная форель <i>O. mykiss</i>	51
1.6.1 Большой желтый горбыль <i>L. crocea</i>	51
1.6.2 Радужная форель <i>O. mykiss</i>	52
1.6.3 Методы решения проблем рыбоводства.....	53
Глава 2 Материалы и методы исследования	53
2.1 Объекты культивирования и условия содержания	54
2.2 Бактериальные культуры и условия их культивирования	55
2.3 Постановка эксперимента	56
2.4 Молекулярно-генетические исследования	57
2.4.1 Выделение РНК	58

2.4.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	59
2.4.3 Синтез кДНК.....	59
2.4.4 Дизайн праймеров для ПЦР и ПЦР в реальном времени.....	60
2.4.5 ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR).....	60
2.4.6 Анализ первичных последовательностей исследуемых белков.....	62
2.4.7 3D-моделирование белков.....	63
2.5 Статистическая обработка результатов	63
Глава 3 Результаты и обсуждение	65
3.1 Анализ первичных и пространственных структур целевых белков исследуемых рыб.....	65
3.1.1 Организация первичной и пространственной структур хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 большого желтого горбыля <i>L. crocea</i>	65
3.1.2 Особенности строения маннозных рецепторов MRC1, MRC2	71
у большого желтого горбыля <i>L. crocea</i> и радужной форели <i>O. mykiss</i>	71
3.2 Особенности экспрессии генов иммунных белков.....	88
большого желтого горбыля <i>L. crocea</i>	88
3.2.1 Распределение уровней мРНК хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме.....	88
3.2.2 Анализ уровней мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 в модели вибриоза	90
3.2.3 Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов	93
MRC1 и MRC2 в норме.....	93
3.2.4 Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 в модели вибриоза.....	95
3.3 Особенности экспрессии генов иммунных белков.....	98
радужной форели <i>O. mykiss</i>	98
3.3.1 Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов	98
MRC1 и MRC2 в норме.....	98
3.3.2 Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 в модели аэромоноза.....	99
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

Список сокращений

ССL–лиганд хемокина

ССР–рецептор хемокина

Ig–иммуноглобулин

кДа–килоДальтон

МIP-1 α –макрофагальный воспалительный белок-1 α

МIP-1 β –макрофагальный воспалительный белок-1 β

ВИЧ–вирус иммунодефицита человека

IL-1–интерлейкин

TNF- α –ингибитор некроза опухолей (tumor necrosis factor- α)

LPS–липополисахарид

XC, CX3C, CC, CXС– различные подсемейства хемокинов

PLA2R–рецептор фосфолипазы A2 (Antiphospholipase A2 receptor)

MRC–маннозный рецептор (Mannose receptor)

RICIN–богатый цистеином домен (Cysteine-rich domain)

FNI–домен фибронектина типа II (Fibronectin type II domain)

CTLD–лектиноподобный домен С-типа (C-type lectin-like domain)

pH – показатель кислотности (potential of hydrogen)

ДНК–дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК–рибонуклеиновая кислота

ПЦР–полимеразная цепная реакция

dNTP–дезоксирибонуклеозид трифосфат (deoxy-ribonucleoside triphosphate)

pI–теоретическое значение изоэлектрической точки

п.н. (п.о.)– пара нуклеотидов (пара оснований)

а.о. (а.а.)–аминокислотный остаток (amino acid residue)

CRD (EPN) –критический домен распознавания углеводов

LL–двойной гидрофобный лейцин

ВВЕДЕНИЕ

В условиях нарастающей антропогенной нагрузки на водные экосистемы роль аквакультуры в сохранении рыбных ресурсов становится всё более значимой, особенно в странах, обладающих достаточным запасом морских и пресноводных водоемов, пригодных для ее развития – таких как Россия и Китай (Шилин и др., 2009).

Интенсивное развитие аквакультуры влечет проблемы, связанные с инфекционными заболеваниями рыб, которые наносят существенный вред рыбным хозяйствам и аквакультурному сектору мировой экономики в целом.

В диссертационной работе эта проблема рассмотрена на примере двух важных объектов культивирования в Евразийском регионе – большого желтого горбыля (*Larimichthys crocea*) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*).

Большой желтый горбыль (*L. crocea*) – рыба семейства горбылевых, один из основных тепловодных объектов марикультуры прибрежных вод Китая. По мере расширения масштабов выращивания большого желтого горбыля растет необходимость защиты этого объекта аквакультуры от инфекций. Для большого желтого горбыля в промышленных условиях опасность представляют бактериальные заболевания, возбудителями которых являются *Vibrio anguillarum* и *Vibrio harveyi*. В настоящее время эти инфекции значительно ограничивают развитие его аквакультуры.

Радужная форель (*O. mykiss*) – холодноводная рыба семейства лососевых, один из основных объектов аквакультуры в России. Она также подвержена бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям. Патогенная бактерия *Aeromonas salmonicida*, вызывает аэромоноз, который для радужной форели является наиболее распространенной инфекцией, приводящей к большим экономическим потерям.

Для эффективной борьбы против подобных патогенов в настоящее время широко применяются препараты с мощным противобактериальным действием, однако их постепенное накопление в водной среде и в объектах

культивирования оказывает негативное влияние на здоровье человека при употреблении в пищу рыбопродуктов, перенасыщенных антибиотиками.

Чтобы минимизировать этот вред, необходима разработка экологически безопасных методов профилактики и лечения бактериальных болезней рыб. Это, в свою очередь, требует расширения знаний о фундаментальных основах противобактериального иммунитета культивируемых видов.

Данные основы включают изучение противовоспалительных белков иммунной системы рыб. В связи с малой изученностью белков иммунного ответа у рыб, особенно у культивируемых видов, экспериментальные исследования заражения возбудителями, типичных для объектов культивирования инфекциями, являются одним из важных начальных этапов в разработке новых подходов к их лечению и профилактике. Такими белками, например, являются хемокины (CCL) и маннозные рецепторы (MRC). Эти белки выполняют ключевые функции в организме рыб: от связывания патогенов до клеточного сигналинга в различных провоспалительных процессах (East, Isacke, 2002; Zlotnik, Yoshie, 2012).

В настоящей диссертационной работе на основе новых данных по изучению активации генов белков иммунного ответа у культивируемых видов рыб на бактериальные инфекции разработаны экспериментальные модели для определения эффективности будущих новых биологически активных компонентов, укрепляющих иммунитет рыб.

Цель исследования - изучение на молекулярном уровне реакций специфического иммунного ответа приоритетных объектов аквакультуры Китая - большого желтого горбыля *L. crocea* и России - радужной форели *O. mykiss* в моделях их распространенных инфекционных заболеваний.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить особенности и структурно-функциональные взаимосвязи *in silico* первичных и пространственных структур белков-хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у приоритетных

объектов аквакультуры Китая (большого желтого горбыля) и России (радужной форели).

2. Создать *in vivo* модели вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоноза у радужной форели в условиях аквакультуры.

3. Изучить уровни и локализацию экспрессии генов специфического иммунного ответа большого желтого горбыля на примере хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме и в модели вибриоза.

4. Сравнить локализацию и уровни экспрессии генов неспецифического иммунного ответа у большого желтого горбыля и радужной форели на примере маннозных рецепторов MRC1, MRC2 в созданных моделях инфекционных заболеваний.

Научная новизна и теоретическая значимость работы заключается в комплексном исследовании хемокинов и маннозных рецепторов.

Впервые построены *in silico* теоретические пространственные структуры белков иммунного ответа: хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 и маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у приоритетных видов рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры Китая (большой желтый горбыль) и России (радужная форель).

Впервые созданы *in vivo* модели двух бактериальных инфекций на тепловодном и холодноводном культивируемых видах рыб, которые могут служить экспериментальной основой для апробации новых иммуномодуляторов, а также вакцин, повышающих иммунный статус объектов культивирования.

Впервые установлены взаимосвязи между структурой-функцией белков иммунной системы и особенности экспрессии генов белков иммунной системы большого желтого горбыля и радужной форели в норме и при патологии в динамике.

Практическая значимость. Разработанные модели вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоноза у радужной форели могут использоваться в качестве тест-систем для оперативной диагностики этих инфекционных

заболеваний рыб в индустриальных условиях. Полученные данные важны при разработке рекомендаций по профилактике и терапии инфекционных болезней рыб в условиях акакультуры с учетом экологических особенностей объектов культивирования. Разработанные модели инфекционных заболеваний послужат основой для дальнейших исследований, направленных на совершенствование системы мероприятий повышения специфического и неспецифического иммунитета рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры.

Положения, выносимые на защиту:

1. Хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 большого желтого горбыля являются структурно гомологичными белками, что предполагает сходство их функциональных особенностей.

2. Первичные последовательности маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 и их 3D-модели обладают высоким уровнем идентичности у большого желтого горбыля и радужной форели, что подтверждает высокую схожесть этих белков вне зависимости от вида рыб и среды их обитания.

3. Экспрессия генов белков-хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4 значительно возрастает в селезенке, печени и почках у большого желтого горбыля в модели вибриоза, что свидетельствует о ключевой роли этих белков в провоспалительных реакциях.

4. Существенные различия в уровнях экспрессии генов маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в моделях вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоноза у радужной форели свидетельствуют об особенностях иммунного ответа у холодноводных и тепловодных видов рыб.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях: Международная студенческая научно-практическая конференция «Мы говорим на одном языке» (Санкт-Петербург, 2019 г.), Международная научно-практическая конференция «География: развитие науки и образования» (LXXIII Герценовские чтения) (Санкт-Петербург, 2020 г.), Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы гидрометеорологии и мониторинга окружающей

среды на пространстве СНГ» (Санкт-Петербург, 2020 г.), IV Всероссийская конференция и выставка «Гидрометеорология и экология: достижения и перспективы развития 2020» (Санкт-Петербург, 2020 г.), Всероссийская научная конференция «Экологическая деятельность и экологическое просвещение: региональный аспект» (Ленинградский Государственный Университет имени А.С. Пушкина) (Санкт-Петербург, 2020 г.); на расширенных семинарах экологического и океанического факультетов Российского государственного гидрометеорологического университета (2018, 2021 гг.), Ученого совета Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ им. Л.С. Берга») (2019 г.).

Личный вклад автора. Автором обоснована тема, определены цель и задачи исследования, осуществлены сбор материала, разработка и выполнение эксперимента, выполнены статистическая и биоинформационная обработка данных, проведены обобщение и интерпретация результатов, сформулированы выводы.

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 11 научных публикациях, 6 из которых входят в Science Citation Index (SCI) и перечень, рекомендованный ВАК, а также в 5 статьях и тезисах в материалах научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 216 наименований. Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 38 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность консультантам к.б.н. В.А. Голотину, к.б.н. М.Б. Шилину, д.б.н. Чжан Цзяньше и к.б.н. О.В. Апаликовой за помощь в планировании эксперимента и редактировании текста диссертации; д.б.н., профессору А.А. Лукину за содействие в постановке эксперимента; преподавателям Ли Джиджии и Е. Иньин за методическую помощь; д.б.н. У. Чангвэнь и д.т.н. Лу Хуацин за

рекомендации при поступлении в РГГМУ и моральную поддержку во время обучения. Автор выражает признательность сотрудникам Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга) Д.К. Митрюшкиной, М.Н. Киселевой, Т.А. Филатовой и к.б.н. В.А. Богдановой за помощь в поиске русскоязычных статей для написания обзора литературы, а также преподавателям Российского государственного гидрометеорологического университета и Чжэцзянского университета за помощь, обучение и поддержку.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Организация иммунной системы рыб

Принципиальная схема иммунитета рыб имеет много общего с организацией иммунной системы других позвоночных животных. Для противодействия чужеродным патогенным организмам и поддержания нормального функционирования организма и стабильности его собственной внутренней среды иммунная система активизируется посредством неспецифических и специфических механизмов [9].

На способность противостоять различным болезнетворным агентам влияют многие внутренние и внешние факторы биотической и абиотической природы, в частности - физическое состояние рыбы, имеющиеся у неё заболевания, качество и температура воды, медикаменты и гормоны [10].

Иммунная система рыб включает три основные категории иммунных тканей, органов и гуморальных иммунных факторов [11]. Иммунная ткань и иммунные клетки составляют основу защитной системы рыб и являются первой линией защиты рыб от патогенов [12]. Кожа, слизистые оболочки жабр и кишечного тракта являются важными барьерными механизмами, препятствующими проникновению в организм болезнетворных агентов. Вместе с находящимися в пограничном слое защитными веществами они в состоянии предотвратить основную часть заражений. При ослаблении или повреждении внешней защиты микроорганизмы проникают в ткани тела

рыбы, где имеются благоприятные условия для их размножения. В организме рыбы болезнетворные агенты сталкиваются с гуморальными иммунными факторами - множеством растворенных веществ, участвующих в защите, а также с клетками иммунной системы [12].

1.1.1 Ткани и органы иммунной системы рыб

Основные иммунные органы и ткани рыб включают: тимус, селезенку, почки и лимфоидную ткань, связанную со слизистыми оболочками. Основное отличие рыб от млекопитающих состоит в том, что в составе иммунных органов рыб отсутствуют костный мозг и лимфатические узлы [13].

Тимус. Тимус считается центральным иммунным органом рыб и играет важную роль в пролиферации и дифференцировке лимфоцитов. Тимус рыб можно рассматривать как функциональный эквивалент вилочковой железы высших позвоночных. Как и у других позвоночных, эта железа развивается из глоточных карманов и является первым лимфоидным органом в процессе индивидуального развития организма рыб. Гистологическая структура железы может отличаться у разных видов рыб, но клеточные компоненты сходны [13].

Железа окружена эпителиальной капсулой. Структура тимуса включает внутреннюю, среднюю и внешнюю области. Внутренняя и средняя области аналогичны внутренней части и коре тимуса высших позвоночных. Внутри железы структура ретикулоэпителиальных клеток поддерживает лимфоциты. Тимус у рыб является основным местом созревания, дифференцировки Т-лимфоцитов и выхода Т-клеток в периферическую кровь [13]. Однако, гормональные циклы, неблагоприятные факторы окружающей среды и старение организма могут привести к дегенеративным изменениям тимуса [14]. Продолжительность нормального функционирования тимуса у разных видов рыб может различаться [15].

Селезенка. У костистых рыб селезенка, расположенная около желудка или кишечника, представляет собой лимфоидную ткань с относительно однородной структурой. Основными функциями селезенки костистых рыб являются удаление высокомолекулярных веществ, деградация и переработка антигенов и выработка антител. Селезенка является основным кроветворным органом, продуцирующим эритроциты, эндотелиальные клетки, ретикулоциты и макрофаги [16].

Почки. Для взрослой рыбы важным лимфоидным органом является почка, которая состоит из трех частей – пронефроса, мезонефроса и метанефроса. В процессе развития пронефрос постепенно теряет выделительную функцию, сохраняя кроветворную и эндокринную функции, и становится кроветворным и иммунным органом [17]. Почка у костистых рыб выполняет ту же функцию, что и лимфатические узлы млекопитающих [18, 19]. При стимуляции антигенами клетки пронефроса и мезонефроса пролиферируют. Существует мнение, что почки рыб могут напрямую эффективно противостоять внешним патогенам, не полагаясь на выработку соответствующих иммунных клеток в ответ на стимуляцию антигеном [20].

По мере того, как организм рыбы растет и развивается, ее иммунные органы также претерпевают значительные изменения. Селезенка и почки взрослых хрящевых рыб значительно отличаются от таковых у костистых рыб: их почки утрачивают кроветворную функцию, селезенка становится лимфатическим органом, в то время как у костистых рыб наблюдается противоположная картина [21]. Исследования показали, что под действием комплекса внешних неблагоприятных факторов селезенка и почки могут производить большое количество меланомакрофагов, синхронизирующих свою активность с лимфоцитами и выработкой антител [22].

Лимфоидная ткань, связанная со слизистой оболочкой. Кроме важных иммунных органов - таких как тимус и почки, у рыб также есть зародышевые лимфоцитарные центры. В слизистых тканях, таких как пищеварительный тракт, кожа и жабры, лимфатическая структура является неполной, поэтому

ее называют слизистой оболочкой. Лимфатическая структура слизистой включает в себя лимфоциты, макрофаги и клетки памяти [23]. В присутствии антигена макрофаги осуществляют фагоцитоз, а секретирующие антитела клетки выделяют антипротеазу, трансфер-фактор, комплемент, лизоцим, хитиназу и другие активные вещества. В совокупности они составляют эффективную линию защиты организма рыбы от патогенных микроорганизмов [24, 25].

1.1.2 Клеточный иммунитет рыб

Клетки рыб, способные участвовать в иммунных реакциях или связанные с ними, как и у других позвоночных, делятся на две категории. Первая категория клеток – это лимфоциты, которые в первую очередь участвуют в формировании специфического иммунитета и играют важную роль в иммунном ответе. Т-клетки и В-клетки представляют собой независимые популяции лимфоцитов [26, 27]. Т-лимфоциты могут напрямую убивать клетки-мишени, а также участвуют в регуляции иммунного ответа, секретируя цитокины. В-лимфоциты обладают биологической функцией секреции антител и имеют поверхностные мембранно-связанные антитела, они функционально тесно связаны с меланомакрофагами и играют синергетическую роль в иммунной защите [28]. Не все виды рыб могут производить В- и Т-лимфоциты одновременно, некоторые производят только В-лимфоциты.

Ко второй категории клеток, отвечающих за иммунитет у рыб, относятся фагоцитарные клетки. Главным образом, это моноциты, макрофаги, различные гранулоциты, и, в меньшей степени, нейтрофилы. Обладая специфической иммунной функцией вспомогательных клеток, они тоже играют важную роль в неспецифической системе защиты [29]. У костистых рыб основными местами образования гранулоцитов являются селезенка и почки. Фагоциты рыб относятся к основным компонентам неспецифического иммунитета. Организм рыбы продуцирует несколько типов макрофагов.

Макрофаги функционируют как часть иммунной системы организма, распознавая и доставляя антигены, регулируя активность лимфоцитов и контролируя их собственную пролиферацию и дифференцировку. Исследования показали, что под воздействием внешних стимулов фагоциты рыб могут поглощать большое количество инородных тел и выделять активные вещества, образуя агрегаты с макрофагами [30].

1.1.3 Гуморальный иммунитет

Иммунная система костистых рыб, как и у других позвоночных, включает неспецифические и специфические системы защиты [31]. Лейкоциты, фагоциты и неспецифические цитотоксические клетки в циркулирующей крови, лизоцим, антипротеаза, фактор переноса, комплемент, С-реактивный белок, интерферон типа I и другие активные вещества участвуют в неспецифическом иммунитете.

Неспецифические гуморальные факторы представляют собой первую линию защиты от вторжения патогенов, включая секретируемые слизистой оболочкой лизоцим, протеазу, лектин, непосредственно клетки слизистой и клетки крови, а также фагоцитарные клетки, расположенные в тканях и органах (рисунок 1).

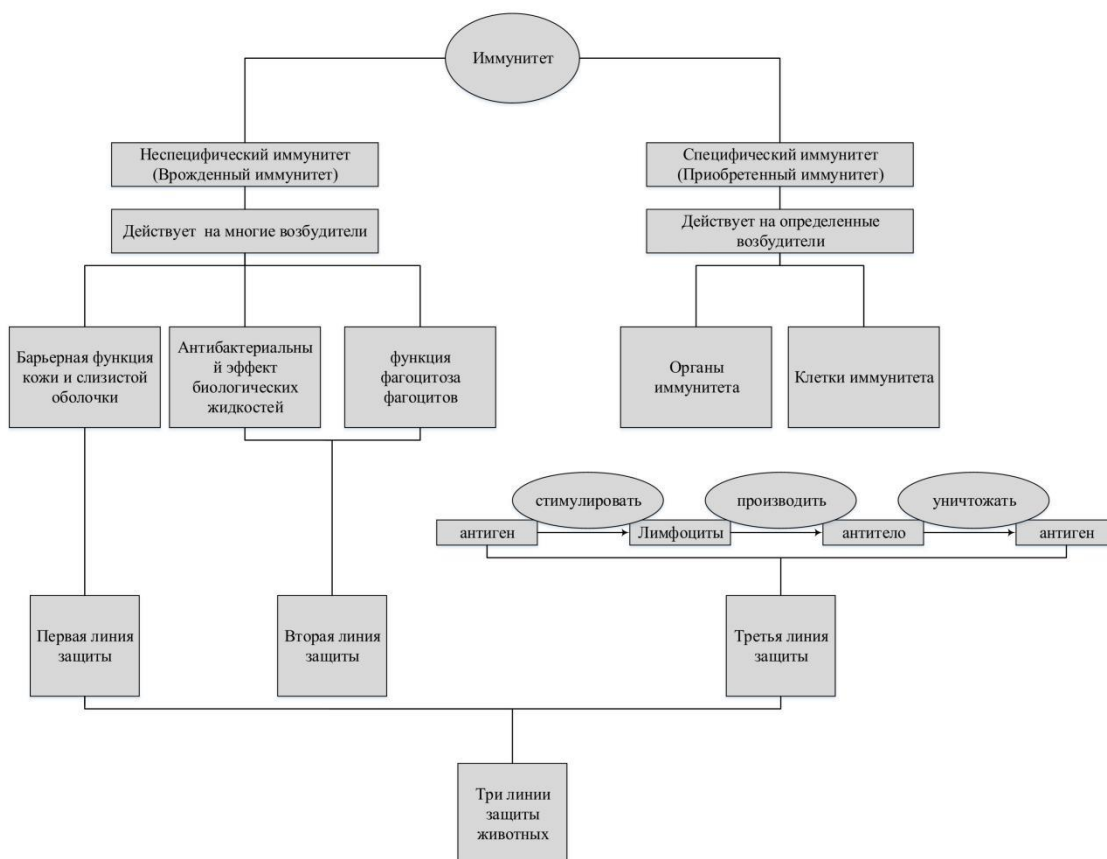


Рисунок 1 - Сходство и различия между специфическим иммунитетом и неспецифическим иммунитетом [39, 40]

Все эти составляющие играют важную роль в неспецифическом защитном механизме рыб [32, 33].

Профилактика инфекционных заболеваний рыб направлена, прежде всего, на активизацию неспецифического гуморального иммунитета [34].

Перечисленные выше секретируемые иммунные факторы по их реакции на микробную инвазию можно разделить на следующие категории:

(1) ингибиторы роста микробов: трансферрин, металлотioneин и интерферон [35];

(2) ингибиторы протеаз, содержащиеся в сыворотке крови рыб, действие которых направлено на поддержание стабильности внутренней среды и регуляцию системы комплемента;

(3) гидролитические ферменты: лизоцим, хитобиаза и хитиназа [36];

(4) лектины и преципитаты;

(5) система комплемента, функционирующая по классическому, альтернативному либо лектиновому механизму [37].

При заражении рыбы патогенами (вирусами, бактериями, паразитами) происходит запуск специфических гуморальных иммунных реакций. Самыми важными в специфическом гуморальном иммунитете являются молекулы иммуноглобулина и Ig-секретирующие клетки (В-клетки). Антитела - глобулины с иммунной функцией, которые продуцируются лимфоцитами, запускают иммунный ответ и специфически связываются с соответствующим антигеном (рисунок 2). В организме рыбы В-клетки присутствуют не только в почках и селезенке, но и в сердце, кишечнике и крови. Доказано, что Ig + В-клетки появляются сначала в почках, а затем в тимусе и селезенке [38].

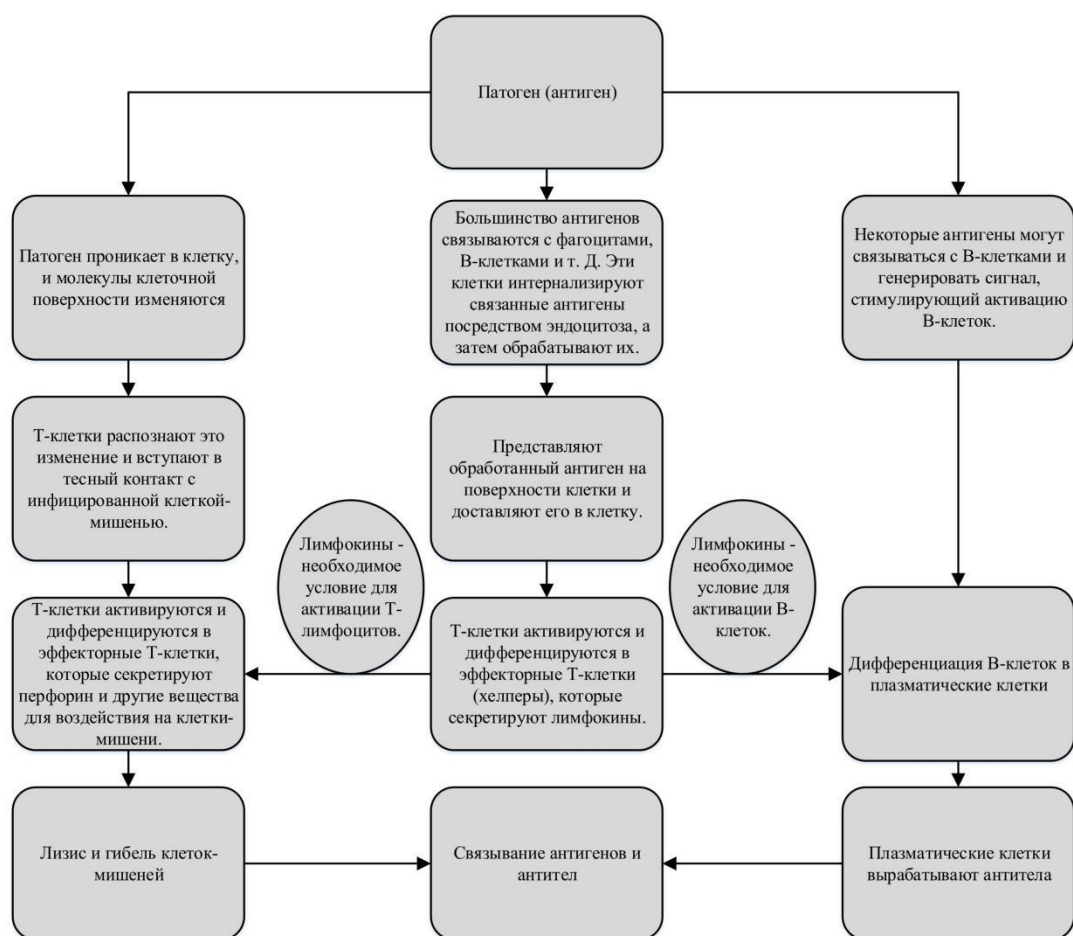


Рисунок 2 - Механизм регуляции и процесс специфического иммунитета [41, 42]

1.1.4 Факторы, влияющие на иммунный ответ рыб

Развитие заболеваний у рыб, выращиваемых в индустриальных условиях, тесно связано с факторами окружающей среды, среди которых следует отметить низкое качество воды, рыбоводные мероприятия, избыточный рост количества рыбоводных хозяйств на ограниченной территории, неизбежно влияющих на качество воды. В связи с этим важно понимать взаимосвязь между хозяином, патогеном и окружающей средой, тем более, что первичное патологическое поражение больных рыб часто сопровождается обширным некрозом кроветворных тканей [43]. Поскольку болезни гидробионтов являются результатом ряда взаимосвязанных событий, при разработке подходов к лечению болезней необходимо учитывать не только влияние патогенов, но и весь комплекс действующих факторов [44].

Возраст, пол, вес, пищевые предпочтения, состояние организма, физиологический статус и условия содержания рыб относятся к факторам, влияющим на характеристики иммунного ответа. С целью выяснения взаимосвязи уровня иммунного ответа с возрастом и весом рыбы ученые в качестве объектов исследований использовали стальноголового лосося и карпа [45, 46]. Эксперименты показали, что в маточном стаде в период нереста внешние антигены не вызывают иммунного ответа. Иммунный ответ подавляется повышением уровня гормонов во время нереста [47].

Известно, что температура является важным фактором в развитии иммунного ответа рыб. Так, тепловодные и холодноводные рыбы имеют свой оптимальный диапазон температуры для развития иммунного ответа. Низкая температура ограничивает высвобождение антител из плазматических клеток. Чем выше температура, тем быстрее развивается иммунный ответ, тем выше титр антител. Оптимальной температурой для развития иммунного ответа у пресноводных видов рыб считается $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ [48]. Это в полной мере укладывается в классические представления о влиянии температуры на биохимические процессы, сформулированные Я. Вант-Гоффом и А. Крогом [49].

1.2 Молекулярные механизмы регуляции иммунной системы рыб

1.2.1 Структура и функция хемокинов

Среди молекул, участвующих в иммунорегуляторных и воспалительных процессах, особое место занимают играют хемокины (от англ. *chemokines*), секретируемые клетками позвоночных белки из семейства цитокинов.

Хемокины (CCL) играют важную роль в воспалительном процессе и развитии неспецифического иммунного ответа, а изучение экспрессии генов хемокинов вносит вклад в понимание механизмов иммунного ответа организма и контроля протекания болезни [50].

Для хемокинов характерны небольшие размеры молекулы - от 8 до 10 килодальтон (кДа) и наличие 4-х цистеинов в консервативном положении, являющихся ключевыми аминокислотами, определяющими трёхмерную структуру белка [51]. Суперсемейство делится на четыре подсемейства по расположению N-концевых цистеиновых остатков. Хемокины CCL входят в подсемейство CC, которое характеризуется двумя соседними остатками цистеина [52].

Хемокины проявляют хемотаксическую активность для моноцитов и базофилов, но не для нейтрофилов или эозинофилов [53]. Белок CCL4 может привлекать моноциты, Т-лимфоциты и эозинофилы, опосредованные рецептором [54, 55], что является одним из механизмов иммунного ответа организма на микроорганизмы [56]. Дендритные клетки (DC) продуцируют множество цитокинов и хемокинов [57, 58] и становятся эффективными антигенпрезентирующими клетками [59]. Зрелые дендритные клетки интенсивно продуцируют CCL3 и CCL4 [60], а CCL3 и CCL4 действуют как хемотаксические факторы для клеток, экспрессирующих рецепторы CCR1, 2, 4 и 5 [61].

CCL4 является природным лигандом корецептора CCR5 основного типа 1 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и может также активировать и усиливать цитотоксичность естественных клеток-киллеров [62]. Было показано, что хемокин CCL4 (он же MIP-1 β - 1 β - воспалительный белок,

синтезируемый макрофагами) необходим в развитии иммунного ответа на инфицирование и развитие воспаления [63].

Ряд белков, включая хемокины CCL2, CCL3 и CCL4, интенсивно синтезируется на начальных стадиях заболевания. Под действием провоспалительных стимулов, таких как IL-1, TNF- α , LPS или вирусы, они активно участвуют в воспалительной реакции, привлекая иммунные клетки к месту воспаления [64].

Из 28 СС хемокинов, исследованных группой Graham G. J. с соавторами, только CCL3 (MIP-1 α : макрофагальный воспалительный белок-1 α) и CCL4 (MIP-1 β) определены как высококислотные и могут образовывать высокомолекулярные агрегаты (600 кДа или выше) [65].

Рецептором CCL2 является CCR2, рецептором CCL3 является CCR1, а рецептором хемокина CCL4 является CCR5. Все дендритные клетки, которые выполняют функцию презентации антигена, легко накапливаются в очаге воспаления и поглощают антиген [66]. CCR2 представляет собой рецептор хемотаксического протеина-1 моноцита (MCP-1). CCR2 специфически связывается с лигандом CCL2 и может участвовать в различных физиологических функциях, таких как рост и развитие клеток, дифференциация, апоптоз и другие.

Рецептор CCR1 экспрессируется на поверхности множества воспалительных клеток, таких как макрофаги, Т- и В-лимфоциты. При воспалительных заболеваниях рецептор CCR1 может связываться с хемокиновыми лигандами, включая CCL3. Воспалительные клетки могут производить хемотаксис и проявлять активность за счет стимуляции рецептора CCR1, а затем вызывать множество биологических эффектов, таким образом, принимая участие в регуляции различных воспалительных процессов [67].

Белок CCR5, как было показано К.Э. Балашовым с соавторами [68], экспрессируется в моноцитах, макрофагах и лимфоцитах. А его лиганды обладают хемотаксисом, пролиферацией и иммунными эффектами. Таким

образом, показан механизм участия CCR5 в процессе иммунных заболеваний [68]. Также установлено, что CCR5 играет роль в опосредованной презентации антигена дендритных клеток и активации Т-клеток. Показано, что CCL3 и CCL4 оказывают влияние на межклеточные взаимодействия, включая процесс метастазирования опухолей, регулируя агрегацию лейкоцитов и фибробластов, экспрессирующих фактор роста гепатоцитов [69]. Установлено, что при соединении рецептора хемокина с хемокиновым лигандом происходит активация множества воспалительных клеток, экспрессирующих рецептор, что доказывает его роль в патогенезе воспалительных заболеваний [70].

Лиганды хемокина подразделяются на четыре типа в зависимости от их структуры (СХС, СС, СХЗС и ХС).

Белки CCL, как упоминалось выше, относятся к подсемейству СС хемокинов. Представители лигандов СС-типа белки CCL17, CCL21 и CCL24 считаются двойными хемокинами и гомеостатическими хемокинами. Эти определения отражают разделение хемокиновых лигандов на функциональные группы, что описано в исследованиях А. Злотника и О. Йоши [7]. Было установлено, что CCL22 и CCL17 имеют один и тот же рецептор CCR4, который экспрессируется Т-клетками в воспаленных тканях. CCL17 синтезируется в эндотелиальных клетках микрососудов кожи, в отличие от белка CCL22, который вырабатывается дендритными клетками дермы. По данным исследований других авторов, хемокины CCL17 и CCL22 взаимодействует с CCR4 на Т-клетках [71]. Согласно Б. Мозеру с соавторами [72], хемокины CCL21 и CCL24 выполняют функцию гомеостаза, включая контроль локализации субпопуляций лимфоцитов и дендритных клеток [72]. Рецептором CCL21 является CCR7, который участвует в процессе перемещения лимфоцитов и дендритных клеток во вторичные лимфоидные ткани. CCR7 вырабатывается в зоне Т-клеток вторичных лимфоидных тканей и венул эндотелия (HEV). Таким образом, CCL21 направляет лимфоциты и дендритные клетки, экспрессирующие CCR7, в лимфатические узлы и зоны

T-клеток через HEV и афферентные лимфатические узлы. Об аналогичной функции CCL24 сообщалось в других исследованиях [72].

К настоящему времени известны исследования экспрессии генов хемокинов у рыб, в частности у меченосца (*Xiphophorus hellerii*), когда последовательности кДНК двух генов CCL4 и CCL19 изучали с помощью флуоресцентной количественной ПЦР. Их экспрессия была проанализирована в 8 органах и тканях, включая печень и селезенку до и после инфицирования *Aeromonas hydrophila* [73]. Этот феномен экспрессии хемокинов в большинстве тканей был обнаружен также у белого амура (*Stenopharyngodon idella*) [74], айю (*Plecoglossus altivelis*) [75], кобии (*Rachycentron canadum*) [50], канального сомика (*Ictalurus punctatus*) [76], и тропического сома (*Miichthys miiuy*) [77]. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что у здоровых рыб хемокины синтезируются в различных тканях, на основании чего можно предположить, что большинство хемокинов подсемейства CC у рыб экспрессируются в широком спектре органов и тканей.

1.2.2 Структура и функция рецепторов маннозы

Семейство маннозных рецепторов принадлежит к суперсемейству лектинов С-типа. Оно состоит из четырех компонентов, включая маннозный рецептор (MR), рецептор фосфолипазы А2 М-типа (PLA2R), белок DEC-205 и эндоцитарный рецептор Endo180 [6, 78]. На основе анализа и предсказания последовательности генома человека был сделан вывод, что семейство маннозных рецепторов ограничено только перечисленными белками [79]. Все структурные особенности этих четырех членов схожи. Эти белки включают N-концевой домен, область, обогащенную цистеином (RICIN, Cysteine-rich domain), единственный домен фибронектина типа II (FNII, Fibronectin type II domain), 8 -10 лектин-подобных доменов С-типа (CTLД, C-type lectin-like domains) и трансмембранный домен (cytoplasmic domain) [80].

Было обнаружено, что маннозные рецепторы выполняют множество функций. Так, MR выполняет важную неспецифическую иммунную функцию, молекулы PLA2R участвуют в эндоцитозе, DEC-205 может играть роль в презентации антигена, белок Endo180 связан с ремоделированием внеклеточного матрикса [6, 81].

Маннозный рецептор MRC играет важную роль в стабилизации внутренней среды и выявлении патогенов. Этот белок представляет собой мульти-лектиновый рецептор. Он не только распознает различные молекулы на клеточной поверхности или клеточной стенке патогенов, но также участвует в эндоцитозе для поддержания стабильности внутренней среды. Показано, что MRC выполняет функцию презентация антигена: способствует высвобождению цитокинов и активации Т-клеток, играющих роль специфического иммунного ответа [6].

К настоящему времени, несмотря на подробное изучение структуры многочисленных белков разных семейств рецепторов маннозы, многие их функции нуждаются в более глубоком осмыслении [82, 83].

Функции доменов пептидной цепи семейства рецепторов маннозы.

В семействе MR аминокислотные последовательности его четырех членов имеют очень высокое сходство (идентичность последовательностей от 25% до 30%), но они имеют очевидные различия в комбинации сахаров. Белок MRC богат цистеиновыми участками и обладает способностью связывать гликопротеины. Он может связываться с гликопротеинами с тетрасульфатированным N-ацетилгалактозамином на конце [84]. Однако анализ последовательности этой области показал, что у трех членов семейства маннозных рецепторов такая способность связываться с сульфатированными сахарами отсутствует [85].

Область фибронектина типа II (FNII).

Среди членов семейства маннозных рецепторов область фибронектина типа II (FNII) является высоко консервативной, с идентичностью аминокислотной последовательности до 44-63%. Все рецепторы содержат

ароматические остатки Trp40, Phe19 и четыре остатка цистеина [86]. Предполагается, что основная функция FNII заключается в соединении с коллагеном, но его молекулярный механизм недостаточно изучен. Исследования доказали, что для того, чтобы PLA2R (рецептор фосфолипазы A2) сочетался с коллагеном типа I и типа IV, необходима зона FN II. Если этот домен удалить, белок теряет связывающую активность [87].

Лектинподобные области С-типа (CTLD).

Лектинподобные области С-типа (CTLD) представляют собой области распознавания углеводов. Члены семейства MR содержат несколько CTLD. Однако не все CTLD обладают лектиновой активностью С-типа. Было показано, что среди 8 CTLD MRC только CTLD4 и CTLD5 имеют аминокислоты, необходимые для активности Ca^{2+} -зависимого связывания с углеводами [88]. Также было установлено, что MRC содержит пептидные фрагменты различных CTLD, но фрагменты CTLD1-3 обладают невысокой способностью связывать гликопротеины, а CTLD4-8 имеют более высокую активность по связыванию гликопротеинов, CTLD4 обладает особенно высокой способностью связываться с маннозой [89]. При этом необходимо, чтобы два Ca^{2+} участвовали в процессе связывания, и один Ca^{2+} был расположен в консервативном сайте связывания [90]. Хотя CTLD4 можно комбинировать только с моносахаридами. Лиганду, связывающему белок MRC, требуется участие CTLD4-8. FNII является наиболее консервативным доменом в семействе MRC и может связываться с коллагеном. У других доменов эта способность отсутствует [84]. Уровень экспрессии MRC тесно связан с функцией макрофагов [86]. Было показано, что поверхностные белки A и D могут увеличивать экспрессию MRC на поверхности макрофагов [91].

Трансмембранный домен.

В молекулах семейства MR цитоплазматическая область содержит два цитоплазматических мотива (cytoplasmic tail): мотив остатка тирозина и мотив двойного гидрофобного остатка. Предположительно, эти два фактора

имеют определенную связь с эндоцитозом членов семейства рецепторов маннозы, и соответствующие эксперименты это подтвердили [92].

Исследования маннозных рецепторов у рыб.

Белки маннозных рецепторов MRC наиболее подробно исследованы у людей и на мышах, однако об исследованиях MRC у рыб информация немногочисленна. MRC1 и MRC2 - это подтипы маннозных рецепторов MR. Состав и структура MRC1 такие же, как и у MR: один домен RICIN, один FNII, 8 доменов CTLD и цитоплазматический домен [93]. Как и MR, он выполняет функцию врожденного иммунитета [81]. MRC1 распознает полисахариды на поверхности патогенов, вирусов, бактерий, дрожжевых грибов и паразитов [94].

При бактериальной инфекции цитокины всегда участвуют во врожденном иммунном ответе. Сообщается, что MRC1 участвует в синтезе провоспалительных цитокинов, например, IL-1 β и TNF- α , посредством связывания как нативных, так и синтезированных лигандов [95]. Интересно, что, несмотря на наличие схожих доменов, таких как FNII, 8 CTLD и цитоплазматические домены, эти два типа рецепторов маннозы, MRC1 и MRC2 имеют функциональную дифференциацию. Установлено, что по сравнению с белком MRC1, который участвует во врожденном иммунном ответе, MRC2 индуцирует деградацию лизосомных белков [96]. Исследования доменов маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 и их функций у рыб немногочисленны [82].

Белки MRC1 и MRC2 имеют типичную для маннозных рецепторов первичную структуру: один богатый цистеином домен (RICIN), один домен фибронектина типа II (FNII), 8 лектин-связывающих доменов С-типа (CTLD) и трансмембранный домен [97].

Как уже упоминалось, маннозный рецептор (MRC) является важным фактором в системе врожденного иммунитета [98]. Маннозный рецептор располагается на макрофагах, дендритных клетках и поверхности макрофагов. Эти белки заслуживают пристального внимания благодаря их

роли в поддержании гомеостаза, индукции цитокинов, идентификации патогенов и презентации антигена. Исследования лекарственных препаратов, нацеленных на маннозные рецепторы и молекулярных вакцин, показали очень хорошие перспективы их применения [99]. В геномах данио (*Danio rerio*), лаврака (*Dicentrarchus labrax*), тилапии (*Oreochromis niloticus*) и канального сомика (*Ictalurus punctatus*) предсказаны структуры генов маннозных рецепторов [100]. Были установлены частичная последовательность гена рецептора маннозы у белого амура (*Stenopharyngodon idella*) (JX391027) и кодирующая последовательность гена рецептора маннозы черного амурского леща (*Megalobrama amblycephala*) (JQ345719) [101]. Есть мнение, что изучение маннозных рецепторов рыб имеет большое значение для глубокого понимания их физиологических функций, включая их роль в иммунных механизмах рыб, а также для разработки новых целевых лекарств и молекулярных вакцин [102].

Известны исследования функции и особенностей гена рецептора маннозы черного амурского леща (*Megalobrama amblycephala*), косатки-скрипуна (*Tachysurus fulvidraco*) и белого амура (*Stenopharyngodon idella*) [103]. Результаты исследований показали, что функция рецептора маннозы направлена на поддержание гомеостаза [104, 105], причем предполагается, что молекула рецептора маннозы играет роль посредника в процессе фагоцитоза [106].

По данным секвенирования генома были предсказаны структуры генов MRC рыб данио (*Brachydanio rerio*) (XM_682847) [107], тилапии (*Oreochromis niloticus*) (XP_003439398.1) [102], последовательности MRC морского окуня (*Dicentrarchus labrax*) (CBN82067) [90], канального сомика (*Ictalurus punctatus*) (DQ399494) [108].

1.3 Типы иммунизации рыб

Роль вакцин в профилактике инфекционных заболеваний в аквакультуре.

Опережающая вакцинация является одним из наиболее важных и,

вероятно, приоритетных подходов к профилактике и борьбе с инфекционными заболеваниями рыб. Специалисты приходят к заключению, что лечение многих бактериальных инфекций гидробионтов исключительно антимикробными препаратами в перспективе становится невозможным [109]. В последнее время в вакцинации рыб наблюдается значительный прогресс. Исследователи разрабатывают технологии однократной иммунизации больших объемов посадочного материала и подходы к созданию мультивалентных вакцин [110].

Вакцинация в настоящее время широко применяется практически у всех сельскохозяйственных животных с целью выработки «коллективного» иммунитета. В аквакультуре вакцинация снижает использование антибиотиков и защищает рыбу от инфекционных заболеваний. Это также позволяет избежать риска возникновения устойчивости к лекарственным препаратам. При этом лицензирование и регистрация новой вакцины, как предполагается, требуют меньше времени, чем в случае новых антибиотиков [111].

Есть несколько важных моментов, которые следует учитывать перед применением вакцинации у рыб: виды рыб, подлежащие вакцинации; состояние иммунной системы рыб; жизненный и производственный циклы в аквакультуре; перечень заболеваний, необходимых для контроля в аквакультуре; сезонность заболеваний (например, сезонные заболевания в рыбноводном садке); технология процессов ведения рыбноводного хозяйства, характеристики водной среды (температура и соленость), стрессовые факторы, особенности кормления/питания и экономическая выгода [112].

В 1942 г. в Буэнос-Айресе (Аргентина) впервые была проведена вакцинация против инфекции *Aeromonas salmonicida* [8]. Это стало важным событием в развитии теоретических принципов и технологий аквакультуры.

Эффективность большинства вакцин такова, что они не полностью предотвращают заболевание [108]. Антигены в большинстве обычных вакцин настолько слабы, что не могут вызвать устойчивый иммунитет у реципиента.

Именно поэтому разрабатываются стратегии создания новых эффективных типов вакцин [113].

Одной из главных задач на ближайшие годы станет разработка и внедрение вакцин для выработки иммунитета на внутриклеточные вирусные и бактериальные патогены. Важную роль в таких случаях будут играть ДНК-вакцины [114].

Виды вакцин для аквакультуры.

Современные вакцины классифицируются на цельновирусные, аттенуированные, ДНК-вакцины, синтетические пептиды, рекомбинантные векторные, генетически модифицированные и субъединичные вакцины.

Цельновирусные вакцины - наиболее распространенные в настоящее время. Вакцины этого типа производят путем уничтожения инфекционного агента, используя его затем для индуцирования иммунного ответа в качестве антигена. Большинство коммерческих вакцин, используемых в настоящее время в аквакультуре, являются вакцинами «убитого» типа. Преимущества этих вакцин заключаются в следующем: они просты в разработке, стабильны при хранении и относительно не дороги. Они считаются безопасными из-за отсутствия проблем с вирулентностью [115]. Этот тип вакцин эффективен, в частности, в профилактике инфекционного вирусного гемопоезического некроза [116].

Аттенуированные вакцины - обычные вакцины, которые используются в пищевых продуктах животных и людей для предотвращения заболеваний [117]. Технология их производства направлена на физическое и химическое ослабление болезнетворных агентов вплоть до утраты их вирулентности, но не убивая их. Лабораторные исследования показали эффективность живых вакцин на рыбах [118]. Аттенуированный организм реплицируется в целевом хозяине без каких-либо клинических признаков, однако при этом он индуцирует развитие клеточного и гуморального иммунитета [119].

ДНК-вакцины представляют собой новый тип вакцин, которые являются результатом прогресса молекулярной биологии. Для разработки

ДНК-вакцины нет необходимости использовать патоген. В этом случае необходим ген, кодирующий антиген патогенного организма, который и составляет основу вакцины [120].

Преимущество ДНК-вакцины заключается в том, что она основана на очищенной плазмидной ДНК, несущей только один или несколько генов патогена, что делает его неспособным размножиться в организме хозяина, не несет риска передачи реальной болезни с помощью вакцины. Поэтому ДНК-вакцины считаются более безопасными, чем обычные вакцины, то есть инактивирующие весь вирус, или аттенуированный живой вирус. Эти вакцины не используют адьюванты для введения, как обычные вакцины, что делает их свободными от побочных эффектов после вакцинации. Кроме того, ДНК-вакцины не содержат неизвестных примесей, обычно встречающихся в цельных типах вакцин [121].

ДНК-вакцины нашли применение в вакцинации авкакультурных лососей против вируса инфекционного гемопоэтического некроза [122] и вируса геморрагической септицемии [123]. ДНК-вакцины были также опробованы для профилактики весенней виремии вируса карпа.

После подтверждения эффективности ДНК-вакцин, разработанных для лечения вирусных заболеваний рыб, были предприняты попытки разработать ДНК-вакцину как профилактическое средство против бактерии *Renibacterium salmoninarum*, вызывающей заболевание почек лосося. Однако эта вакцина не была признана эффективной [121].

Рекомбинантные векторные вакцины. Разработка рекомбинантных векторных вакцин является результатом биотехнологического прогресса. Рекомбинантные вакцины получают путем использования только иммуногенных областей патогена и экспрессии его в организме хозяина. Белки, представляющие собой иммуногенную часть патогенного чужеродного организма, производятся в больших количествах вне организма, затем очищаются для использования в качестве вакцины. При подборе вектора принимают во внимание, прежде всего, такие факторы, как

возможность наработки белка в больших количествах и эффективность экспрессии белка антигена. Вирусы, вызывающие инфекционную анемию или гепатопозитический некроз, были экспрессированы в векторах в качестве вакцины для защиты аквакультурного лосося [124].

Субъединичные вакцины. При наличии сложностей в культивировании патогенного организма нарабатывается только его иммуногенная часть, которая затем используется в качестве вакцины. Субъединичные вакцины безопасны для использования, но их иммуногенная природа очень слаба по сравнению с вакцинами на основе инактивированного патогена. Поэтому для повышения иммуногенности необходимы адъюванты [124].

Генетически модифицированные вакцины. Пассирование организмов *in vitro* приводит к накоплению генных мутаций, которые вызывают ослабление патогена. Генетически микроорганизмы могут быть ослаблены молекулярными подходами, которые включают удаление генов, ответственных за их патогенность. Живая аттенуированная вакцина будет размножаться до более низкого титра и может стимулировать гуморальный и клеточный иммунитет. Как одно из средств профилактики аэромоноза лососей в настоящее время нашла свое применение генетически модифицированная вакцина к *Aeromonas salmonicida* [125].

Синтетические пептидные вакцины производятся из коротких последовательностей аминокислот, полученных синтетическим путем, в качестве антигенов [126]. Исследования показали, что вакцинация рыбы пептидами менее практична из-за отсутствия специфичного иммунного ответа рыбы на различные антигены и недостаточно сильна и, следовательно, требует молекулы-носителя [108]. Подобные вакцины были опробованы для профилактики таких инфекционных заболеваний, как нодавироз, вирусная геморрагическая септицемия, рабдовирус и бирнавирус [108].

Коммерчески доступные в настоящее время вакцины. К настоящему времени во всем мире для использования в аквакультуре одобрено множество вакцин (таблица 1).

Таблица 1 - Коммерческие вакцины [126]

	Название вакцины	Виды рыб, подлежащие вакцинации	Заболевание	Ссылка на литературу
1.	<i>Aeromonas salmonicida Bacterin</i>	Лососевые	Фурункулез	[127]
2.	<i>Arthrobacter Vaccine Salmonids Columnaris disease</i>	Лососевые	Колумнариоз	[128]
3.	<i>Vibrio Anguillarum-Ordalii</i>	Лососевые	Вибриоз	[129]
4.	<i>Infectious Salmon Anemia Vaccine</i>	Лососевые	Инфекционная анемия лосося	[130]
5.	<i>Yersinia Ruckeri Bacterin</i>	Лососевые	Иерсиниоз	[131]
6.	<i>Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vaccine</i>	Лососевые	Инфекционный некроз гемопоэтической ткани	[132]
7.	<i>Edwardsiella Ictalurii Vaccine</i>	Сом	Эдвардсиеллез	[133]
8.	<i>Flavobacterium Columnare Vaccine</i>	Сом	Колумнариоз	[134]
9.	<i>Vibrio anguillarum-Ordalii</i>	Радужная форель	Вибриоз	[129]
10.	<i>Vibrio salmonicida Bacterin</i>	Лососевые	Вибриоз	[135]
11.	<i>Vibrio anguillarum-salmonicida Bacterin</i>	Лососевые	Вибриоз	[135]
12.	<i>Edwardsiella ictaluri Bacterin</i>	Сом	Кишечная септицемия	[136]
13.	<i>Spring viremia of carp virus</i>	Обыкновенный карп	Весенняя виремия карпа	[137]
14.	<i>Koi herpes virus (KHV)</i>	Карп кои	Болезнь, вызванная вирусом герпеса Кои	[138]
15.	<i>Biofilm and free-cell vaccines of Aeromonas</i>	Индийские крупные карпы	Водянка	[139]

	<i>hydrophila</i>			
16.	<i>Streptococcus agalactiae (group B) vaccine</i>	Тилапия	Стрептококкоз	[140]
17.	<i>Betanodavirus</i>	Окунь	Бетанодавирусная болезнь	[108]
18.	<i>Enteric Redmouth (ERM) vaccine</i>	Лососевые	Кишечные заболевания красный рот	[141]
19.	<i>Pasteurella vaccine</i>	Лососевые	Пастереллез	[142]
20.	<i>Aeromonas hydrophila vaccine</i>	Лососевые	Подвижная септицемия <i>Aeromonas</i>	[143]
21.	<i>Carp Erythrodermatitis</i>	Карп	Эритродермит	[144]
22.	<i>Piscirickettsia salmonis vaccine</i>	Лососевые	Пискирикетсиоз	[113]
23.	<i>Gaffkaemia vaccine</i>	Омары	Гаффкемия	[145]
24.	<i>Nodavirus vaccine</i>	Сибасс	Вирусный нервный некроз	[146]
25.	<i>Pancreas disease virus vaccine</i>	Лососевые	Заболевания поджелудочной железы	[147]

В последние годы исследования генно-инженерных вакцин для рыб достигли большого прогресса. Однако, в процессе исследований и отработки процедуры их применения разработка генно-модифицированных вакцин также сталкивается с рядом проблем, которые требуют решений [148].

Некоторые из генно-модифицированных вакцин для рыб, разработанные в 1990-х гг., были апробированы в рыбоводстве и позволили получить огромные экономические и социальные преимущества. За предыдущее десятилетие в таких странах, как Норвегия, Чили и Япония, разработка и производство генно-модифицированных вакцин сформировались как полноценная промышленная система [149]. В Китае была разработана и

внедрена генно-модифицированная вакцина против геморрагической болезни амура [148].

Иммунологи и вакцинологи тесно сотрудничают, чтобы объединить фундаментальную науку с прикладной, создавая предпосылки для разработки новых эффективных вакцин. Исследования последних лет показали, что живые вакцины также обладают большим потенциалом, и будущие исследования будут также сосредоточены на разработке живых вакцин [150]. Таким образом, существует множество методов и подходов для создания вакцины, но разные типы вакцин имеют одинаковые иммунные принципы.

1.4 Краткая характеристика бактериальных заболеваний рыб и методы профилактики и лечения

На все физиологические процессы в организме рыбы влияют факторы окружающей среды. Прежде всего, это температура воды, поскольку рыба относится к холоднокровным организмам, и, фактически, температура ее тела соответствует температуре окружающей ее воды.

Качество воды также является одним из важнейших факторов, влияющих на физиологию рыб, поскольку через жабры между кровью рыбы и водой происходит газообмен и постоянный обмен химическими веществами, растворенными в воде с одной стороны и продуктами метаболизма рыбы – с другой. Вода же является и источником заражения рыбы бактериальными патогенами.

Отклонения в параметрах водной среды приводят к развитию стресса и снижению адаптации организма рыбы, что создает условия для развития различных болезней. Болезни можно охарактеризовать как реакцию организма на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, включая различные виды бактерий, вирусов и паразитов.

В процессе развития аквакультуры инфекционные заболевания, вызываемые вирусами, бактериями и паразитами, становятся всё более частыми и тяжелыми [151, 152]. В частности, инфекции, вызванные

бактериями, приводят к большим экономическим потерям в секторе аквакультуры [153, 154]. Известно, что вспышки заболеваний наносят непоправимый урон также диким популяциям морских и пресноводных видов рыб [153].

Бактериальные болезни. Среди бактериальных болезней рыб наиболее известны бактериальная геморрагическая септицемия, аэромоноз, вибриоз, микобактериоз, миксобактериоз, фурункулез и ряд других (табл. 2). Многие из них чаще всего проявляются в аквакультуре, а также при содержании рыб в аквариумах, например, вибриоз [126, 153].

Таблица 2 - Бактериальные болезни рыб [153]

Патоген	Вид-мишень для патогена	Название болезни
Сем. <i>Vibrionaceae</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , представлена 3 подвидами	Лососевые рыбы, золотой карась, карп, плотва, елец, голавль, линь, щука, окунь, бычок-рогач, канальный сомик, речная минога, хариус, сиг, угольная рыба и другие пресноводные, аквариумные рыбы.	Фурункулез
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>		
Сем. <i>Vibrionaceae</i> , род <i>Aeromonas</i> , представлен 7 видами:	Все виды рыб. Наиболее устойчивы караси, растительноядные рыбы	Аэромоноз
<i>A. caviae</i>		
<i>A. schubertii</i>		
<i>A. eucrenophila</i>		
<i>A. hydrophila</i>		
<i>A. media</i>		
<i>A. sobria</i>		
<i>A. veronii</i> .		
род <i>Pseudomonas</i>		Псевдомоноз

<i>Ps. fluorescens</i>	Карповые	
<i>Ps. putida</i>		
<i>Ps. cyprinisepticum</i>		
<i>Ps. intestinalis</i>		
<i>Ps. dermoalba;</i>		
<i>Ps. fluorescens</i>	Лососевые	
<i>Ps. chlororaphis</i>		
<i>Ps. aureofaciens</i>	Угри	
<i>Ps. anguilliseptica</i>		
Род <i>Vibrio</i>	Лососевые, угри, солонатоводные виды рыб	
<i>V. anguillarum</i>		
<i>V. parahaemolyticus</i>		
<i>V. alginolyticus</i>		
<i>V. ordalii</i>		
<i>Yersinia ruckeri</i>	Лососевые	Йерсиниоз
	Сиг	
	Большеротый американский окунь	
	Жирноголовый гольян	
	Окунь	
	Ленский осетр	
	Сиг	
	Большеротый американский окунь	
	Жирноголовый гольян	
	Окунь	
	Ленский осетр	

Аэромоноз. Болезнь вызывают семь видов рода *Aeromonas*. Наиболее часто заболевание вызывается *Aeromonas salmonicida* ssp. Бактериальное

заболевание почек, вызываемое *A. salmonicida* ssp., описано, в числе прочих, у дикого и искусственно выращенного лосося в аквакультуре Норвегии [155].

Острое течение болезни приводит к массовой гибели рыб. Среди клинических проявлений: серозно-геморрагическое воспаление кожного покрова, увеличение брюшка, водянка, пучеглазие, ерошение чешуи. Подострое течение характеризуется наличием асцита у больных рыб, серозно-геморрагическим дерматитом с образованием язв на коже. Может развиваться некроз плавников. Рыбы малоподвижны, держатся у поверхности воды и плохо реагируют на внешние раздражители. Нарушается координация движений. Вспышки аэромоноза приводят к серьезным экономическим потерям [156].

В прошлом профилактика и лечение заражения *A. salmonicida* ssp. опирались, главным образом, на применение антибиотиков. Угроза, которую представляет аэромоноз для аквакультуры, стимулирует изучение факторов бактериальной вирулентности и механизмов в основе защитных реакций хозяина [157]. Инъекционная вакцинация коммерческими бактериальными вакцинами с адьювантом на основе минерального масла имеет определенный успех в предотвращении болезни, но в аквакультуре радужной форели до сих пор происходят вспышки аэромоноза [158]. Разработана вакцина на основе нуклеиновой кислоты, рекомбинантная субъединичная вакцина против *A. salmonicida* ssp [159].

Фурункулез. Болезнь вызывают подвиды *A. salmonicida*. Основными клиническими признаками являются поражение внутренних органов, включая генерализованную септицемию, воспаление кишечника, некроз почек, геморрагическое воспаление печени, миокарда и внутренней стенки брюшной полости. При хронической форме, помимо развития септического процесса, появление под кожей и в мышцах флюктурирующих опухолей - «фурункулов». При прорыве такого фурункула образуется язва.

Пастереллёз. Бактерии *Pasteurella* наносят значительный ущерб как марикультуре, так и естественным популяциям рыб [160]. Внешние

патологические признаки пастереллёза обычно не очевидны, а поверхностные поражения у больных рыб, как правило, отсутствуют. Однако при вскрытии у рыб выявляются сепсис и некроз в большинстве внутренних органов, а цвет селезенки и почек бледнеет. Сообщалось, что введенные внутрибрюшинно рыбе внеклеточные продукты *P. piscicida* вызывают токсикоз [153]. В настоящее время разработаны эффективные методы борьбы с этим заболеванием, важнейшими из которых являются профилактические вакцины [154].

Микобактериоз. Заболевание зарегистрировано более чем у 120 видов морских, пресноводных и аквариумных рыб. В большинстве случаев наблюдаются дефекты чешуи, сломанные плавники, неровности, а иногда и язвы. Серые узелки обнаруживаются в печени, но нередко в почках и селезенке, иногда наблюдается скопление экссудата в плавательном пузыре и в полости тела больных рыб [153]. В дикой природе это микобактериальное заболевание регистрируется у тихоокеанских лососей (кижуча и нерки), а также у радужной форели. В настоящее время для лечения этого заболевания в основном используются антибиотики [161].

Бактериальный сепсис. Это инфекционное заболевание рыб характеризуется самым большим ареалом, самой широкой эпидемической зоной, самым продолжительным эпидемическим сезоном и наибольшим ущербом. Заболевание в основном вызывается двумя патогенами: *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas sobria*. Заболевание часто возникает в водоемах с низким содержанием кислорода и с большим количеством вредных веществ. Профилактические методы при заболевании заключаются, прежде всего, в усилении режима и качества кормления с применением профилактических препаратов [162]. Воду обрабатывают дезинфицирующими средствами, а затем для улучшения её качества используют «полезные» бактерии, например, фотосинтезирующие. Одновременно добавляют в корм усилители иммунитета.

Прежде всего, у заболевшей рыбы требуется проведение диагностики паразитов. При их наличии должны быть проведены антипаразитарная терапия и дезинфекция воды; качество воды может быть повышено фотосинтезирующими бактериями [163, 164].

Энтерит. Возбудителем энтерита является *Aeromonas punctata*, который является условным патогеном. В здоровой рыбе заболевание не проявляется, но при ухудшении качества воды, снижении концентрации кислорода в воде и ухудшении качества корма иммунитет рыбы будет снижаться, и заболевание проявит себя. Заболевание обычно возникает при температуре воды выше 18 °C [165, 166].

Болезнь жаберной гнили (миксобактерии). Поражение миксобактериями происходит как в пресноводной аквакультуре, так и в марикультуре. Болезнь характерна для морского леща, тихоокеанского лосося, угря, форели и многих других видов рыб европейских стран и Японии. Миксобактерии патогенны для морских, солоноватоводных и пресноводных рыб [153]. Заболевание обычно возникает при температуре воды от 15 °C до 30 °C; чем выше температура воды, тем больше вероятность его проявления [167].

Псевдомоноз (краснуха карпов). Болезнь вызывает неспороносная палочка *Pseudomonas flecorecens*, которая является условным патогеном. При механической травме рыбы или паразитарных инвазиях возможно заражение этой инфекцией. Заболевание может возникать в любое время года. Метод профилактики и лечения краснухи в основном такой же, как и при жаберной гнили [168].

Йерсениоз. Болезнь вызывает бактерия *Yersinia ruckeri*. Клиническим признаком является красный рот (*Redmouth*), в основном встречается у радужной форели, но также отмечена у морского окуня и леща [169]. Острая форма течения болезни выражена в потемнении кожных покровов, воспалении и эрозии покровов в ротовой полости, на жаберных крышках и у основания плавников. В глазном яблоке наблюдаются серповидные кровоизлияния, экзофтальм.

Вибриоз. Встречается у десятков видов морских и солоноватоводных рыб, но может поражать и пресноводные виды, некоторые из которых являются объектами аквакультуры в десятках разных стран, таких как Италия, Канада, Китай, Мексика, Норвегия, Россия, США, Япония и др. Среди жертв вибриоза – лососевые, окуневые, тресковые, сельдевые и многие другие группы рыб. Возбудитель вибриоза – бактерия *Vibrio anguillarum*, которая впервые была выделена из больных угрей в конце XIX века. В последующие десятилетия значительные эпизоотии вибриоза наблюдались в разных странах мира среди самых различных видов рыб [170]. Бактерия *V. anguillarum* является патогенной более чем для 90 видов. В 70-е годы XX-го столетия вибриоз часто обнаруживали у тресковых, а несколько позже – также у сельдевых рыб в Северной Атлантике.

Исследования показали, что оптимальная температура для его развития колеблется в пределах от 15 °С до 25 °С. При 5 °С и 34 °С рост вибриона приостанавливается, при 40 °С бактерии погибают в течение 4-10 мин.

Клиническая картина вибриоза у разных видов рыб отличается. В то же время есть типичные признаки: на поверхности тела, жаберных крышках, плавниках, вокруг глаз выражены кровоизлияния, повреждения красноватого цвета, а в ряде случаев язвы, проникающие вглубь мускулатуры. Происходит поражение внутренних органов, прежде всего - кроветворных, что приводит к анемии больных рыб [171].

У большого желтого горбыля после заражения вибрионом печень приобретает белесый оттенок и увеличивается в размерах в 1,5–2 раза; кишечник также меняет цвет, приобретая серый оттенок; наблюдаются признаки воспаления; кожа изъязвляется (рисунок 3).

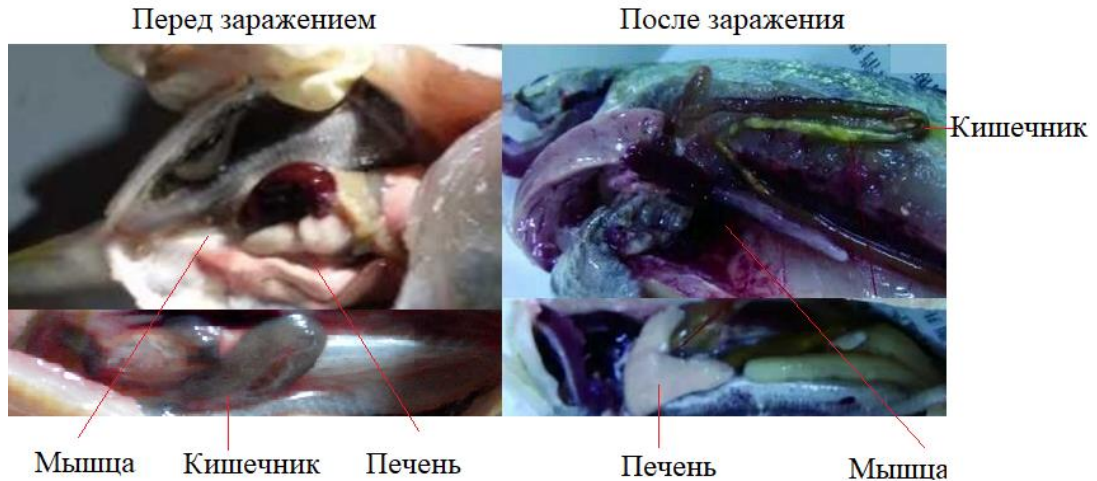


Рисунок 3 - Морфологические признаки заражения *V. anguillarum* у большого желтого горбыля [81]

Для вибриоза характерна высокая летальность. После заражения *V. anguillarum* рыба погибает в течение нескольких дней. Развитию вибриоза способствуют температурный стресс, загрязнение вод промышленными стоками и пестицидами, эвтрофикация водоёмов, высокие плотности посадки рыб.

Экономические потери от вибриоза в рыбоводных хозяйствах Японии достигают 18–30 миллионов долларов ежегодно [172]. Финансовые затраты на профилактику и лечение вибриоза, как правило, довольно высоки.

Исследования, направленные на понимание и контроль вирулентности *V. anguillarum*, обладают высоким приоритетом в международных проектах по изучению водных ресурсов [173].

В настоящее время разработаны эффективные методы борьбы с этим заболеванием, среди которых наибольшее значение имеет профилактическая вакцинация. Важной мерой представляется и селекция рыб на устойчивость к данному заболеванию [153].

В Китае *V. anguillarum* поражает большого желтого горбыля, что наносит значительный ущерб искусственному выращиванию этого ценного вида в аквакультуре [81].

Следует отметить, что бактерии родов *Aeromonas*, *Proteus*, *Vibrio* и *Pseudomonas* вызывают множество сходных клинических симптомов у разных рыб.

В последние полвека частой проблемой в морских хозяйствах во многих странах мира стали вызываемые у пресноводных и морских рыб стрептококковые инфекции. Впервые вспышка стрептококкоза была зарегистрирована в 1958 г. у радужной форели на рыбноводном хозяйстве в Японии, а в дальнейшем его стали регистрировать у многих видов рыб, в том числе атлантического лосося, желтохвоста, камбалы в Австралии, Англии, Израиле, Испании, Италии, Саудовской Аравии, США, ЮАР [153].

1.5 Сведения о современном состоянии и проблемах аквакультуры в Китае и России

1.5.1 Современное состояние рыбного хозяйства в Китае

Рыбоводство и рыбный промысел – исторически важные части экономики Китая. Разведение рыб в пресноводных озерах и прудах в Китае насчитывает, по меньшей мере, 4 тысячи лет. В 599 г. до н.э. Фан Ли опубликовал первое известное нам пособие по разведению рыб, в котором сообщил, что китайские рыбоводы разработали способ переноса икры культивируемого вида из водоема в водоем. Во время нереста в нерестовый пруд вносились еловые ветки; выметанная на них икра в дальнейшем могла транспортироваться [1].

В настоящее время рыбноводство – одна из самых быстрорастущих отраслей в крупномасштабном сельском хозяйстве Китайской Народной республики, и стоимость его продукции продолжает расти [174]. При этом, в пресноводной аквакультуре всё разнообразие видов ограничено, главным образом, четырьмя основными объектами разведения: толстолобик белый (*Hypophthalmichthys molitrix*), толстолобик пестрый (*Hypophthalmichthys nobilis*), амур белый (*Stenopharyngodon idella*) и амур черный (*Mylopharyngodon piceus*) (рисунок 4) [174].



Рисунок 4 - Основные представители промысловых пресноводных видов рыб Китая

Основные виды, культивируемые в условиях морской аквакультуры в Китае: большой желтый горбыль (*Larimichthys crocea*), тюрбо (*Scophthalmus maximus*), морской окунь (*Lateolabrax japonicus*), группер (*Epinephelus* ssp), красный горбыль (*Sciaenops ocellatus*), красный морской горбыль (*Pagrus major*), кобия (*Rachycentron canadum*), иглобрюхие (*Tetraodontidae*), морская камбала (*Pleuronectes platessa*) и желтохвост (*Seriola quinqueradiata*). Добыча этих 10 ключевых видов рыб в Китае очень высока (рисунок 5) [175].



Рисунок 5 - Наиболее важные морские промысловые виды рыб Китая

Основными провинциями пресноводного рыбоводства во внутренних водоемах Китая являются Хубэй, Цзянсу, Гуандун, Хунань, Аньхой, Цзянси, Шаньдун (рисунок 6) [175].

Основные провинции морской аквакультуры - Шаньдун, Фуцзянь, Гуандун, Ляонин и Чжэцзян (рисунок 7) [176].



Рисунок 6 - Основные районы лимнокультуры в Китае («красный треугольник»)



Рисунок 7 - Основные районы марикультуры в Китае («красная рыбка»)

Способы разведения пресноводных рыб.

В соответствии с технологиями выращивания, в Китае существует пять основных типов пресноводного рыбоводства: разведение рыбы на рисовых полях, разведение рыбы в проточных системах, заводское рыбоводство, разведение рыбы в прудах и разведение рыбы в садках (рисунок 8) [177].

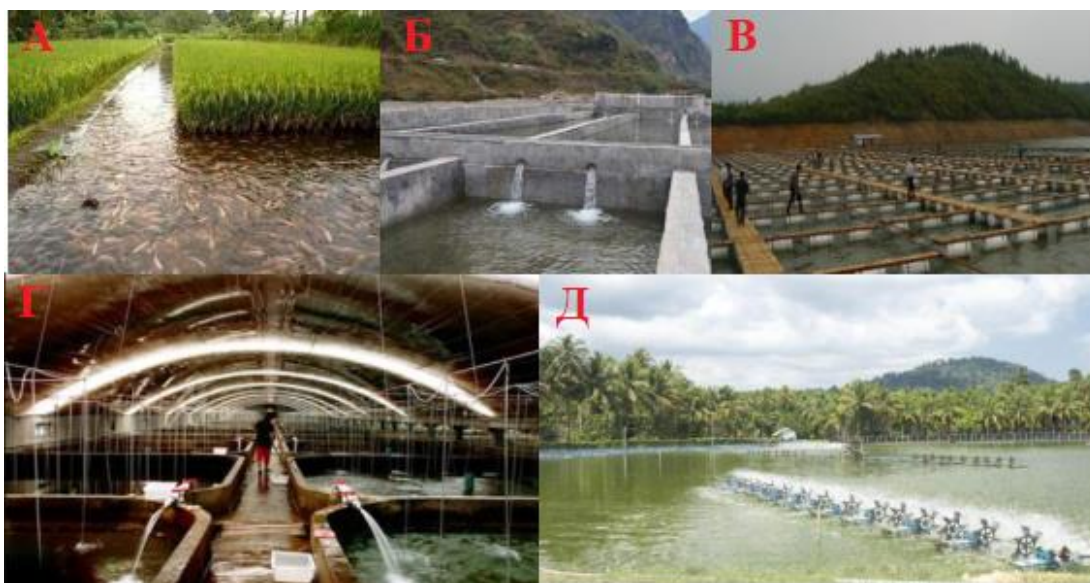


Рисунок 8 - Основные способы разведения пресноводных рыб в Китае: А - разведение рыбы на рисовых полях; Б - разведение рыбы в проточных системах; В - разведение рыбы в садках; Г - заводское рыбоводство; Д - разведение рыбы в прудах

Способы разведения морских рыб.

(1) Наземный рыбоводный завод является материальным воплощением концепции интенсивной аквакультуры. Он имеет следующие преимущества:

- передовые средства и оборудование для разведения;
- эффективное управление;
- контролируемая среда содержания рыб;
- отсутствие зависимости от ресурсов определенного географического пространства;
- контролируемый выпуск молоди;
- гарантированное качество продукции.

(2) Садковое рыбоводство в море осуществляется с использованием наплавных садков, представляющих собой достаточно дорогие конструкции (рисунок 9). Нередко их размеры и стоимость оказываются сопоставимы с таковыми морских судов. Размещение комплексов таких садков в прибрежных акваториях изменяет весь облик береговой зоны, придавая ей окультуренный, «цивилизованный» вид [1].

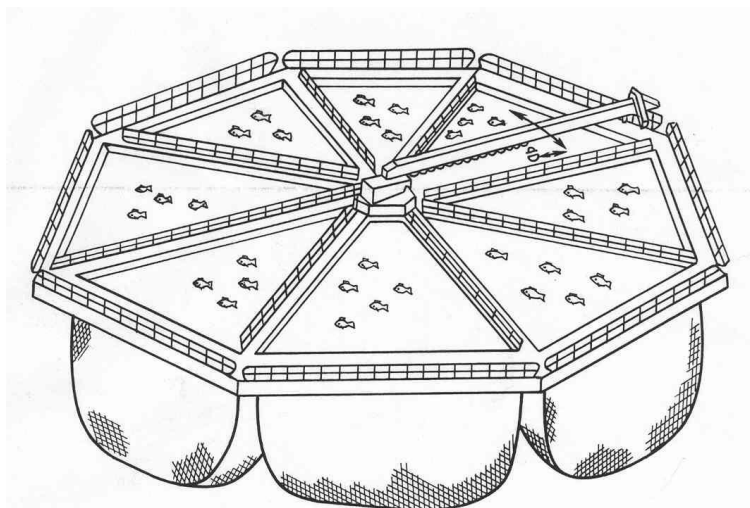


Рисунок 9 - Садковые комплексы фирмы Джиян Кейдж [1]

(3) Рыбоводство в прибрежных прудах: может осуществляться в мелководных солоноватых прудах или в приливно-отливной зоне на специальных гидробиотехнических сооружениях [1].

В последние годы Китай провел исследования глубоководных районов Тихого океана и расширил сектор глубоководной марикультуры (рисунок 10) [175].

Прибрежное рыболовство и прибрежная марикультура в Китае формируют подавляющее большинство улова, тогда как рыболовство и рыбоводство в удаленных акваториях составляет лишь очень небольшую долю [178].

В связи с увеличением рыбопромысловых мощностей состояние морских рыбных ресурсов Китая в последние годы претерпело серьезные изменения. Произошло сокращение объемов промысла рыбных ресурсов.

Промысел некоторых традиционных рыболовных объектов сокращен [179]. Так, в целях защиты морских рыбных ресурсов китайское правительство ввело в действие систему моратория на летнюю рыбную ловлю вдоль всего побережья Китая [180].

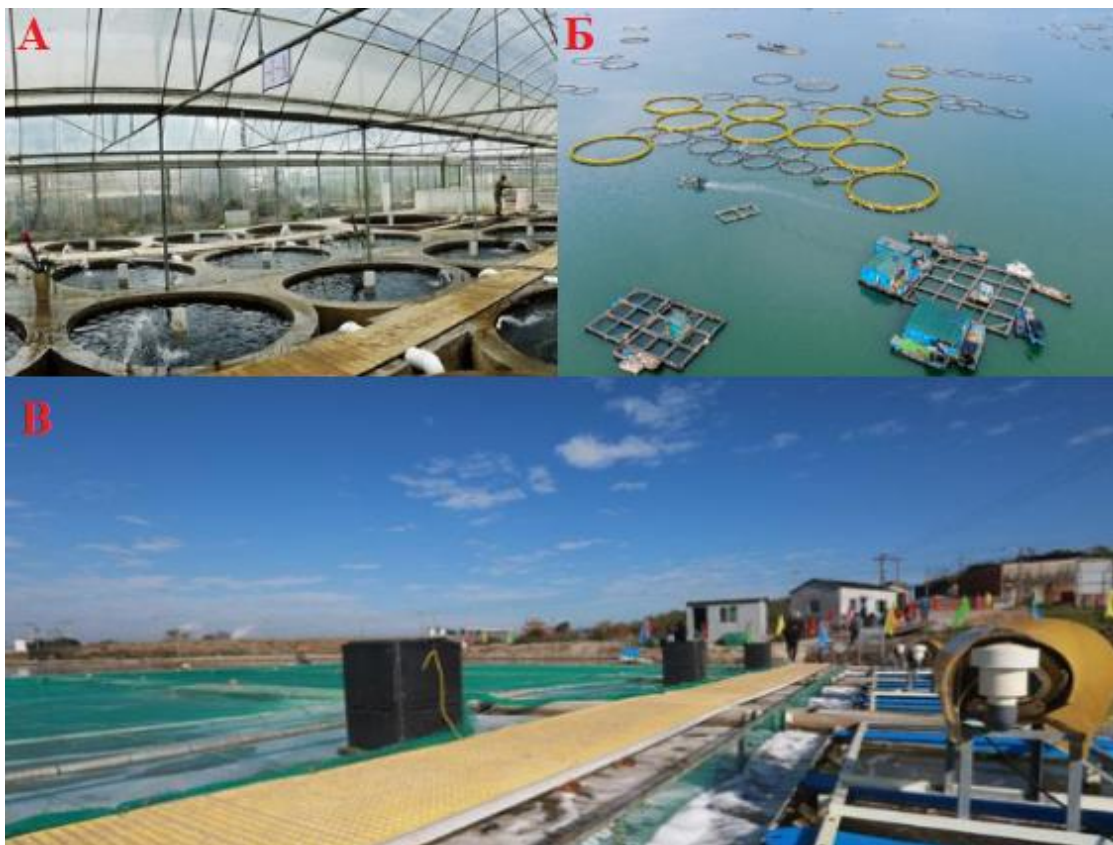


Рисунок 10 - Основные способы разведения морских рыб в Китае: А - наземный рыбоводный завод; Б - садковое рыбоводство в море; В - рыбоводство в прибрежных прудах

В ключевых внутренних рыболовных районах реализован общенациональный план «нулевого увеличения» объемов рыболовства [181].

В настоящее время во всем мире, в том числе и в Китае, происходит ухудшение качества водной среды. Загрязнение воды, эвтрофикация, «красный прилив» влекут за собой гибель большого количества водных организмов (рисунок 11) [182]. Что касается пресных водоемов, то в некоторых реках вода не соответствует стандартам качества, что создает серьезную угрозу для рыбного хозяйства [183].

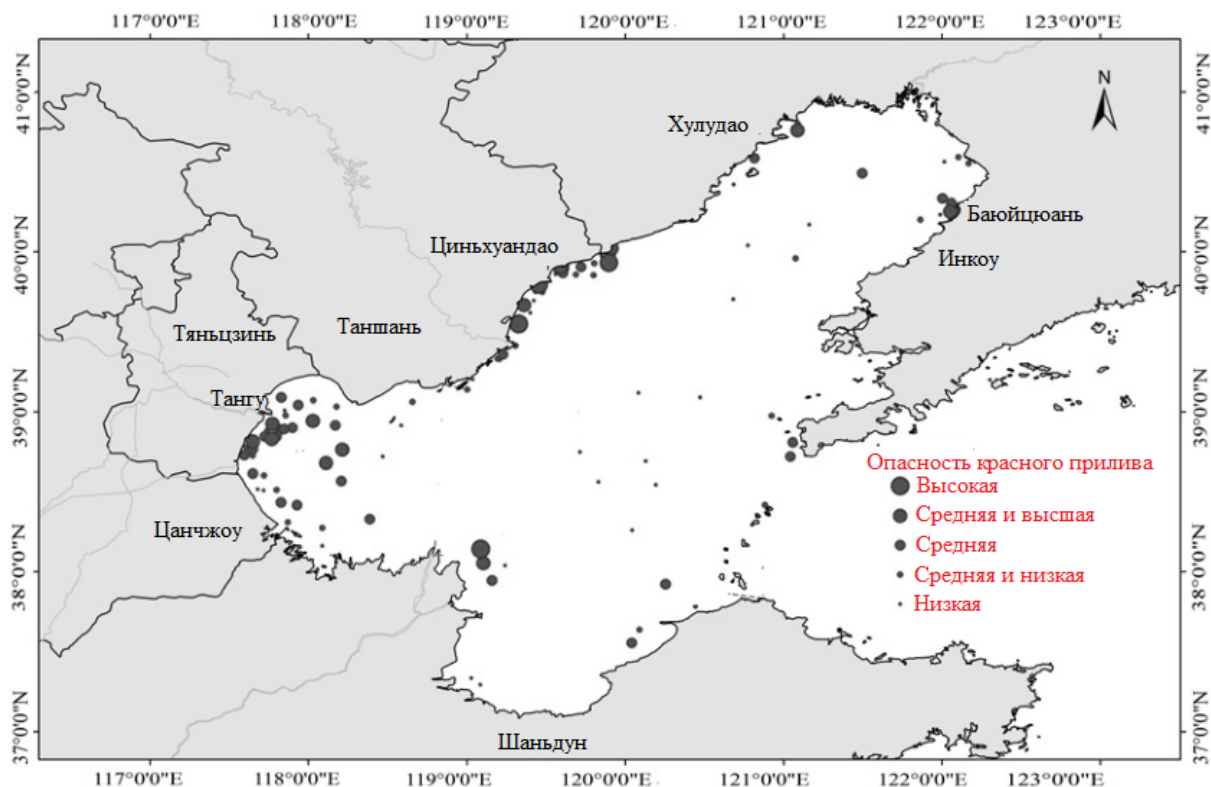


Рисунок 11 - Карта рисков проявления «красного прилива» в Бохайском море в Китае (1952~2016 г) [182]

Использование в условиях аквакультуры антибиотиков и химических препаратов в ответ на заражение рыб бактериями, вирусами и паразитами приводит к повышению устойчивости патогенов к лекарственным препаратам, сохранению остатков лекарств в организме рыбы, причем антибиотики вызывают загрязнение также водной среды. Длительное потребление человеком рыбопродукции, насыщенной лекарственными препаратами, наносит вред здоровью потребителя.

Китайские эксперты предлагают следующие подходы к решению проблем рыбного хозяйства в Китае.

(1) Исследования по всестороннему освоению морских ресурсов, энергичное продвижение высокоэффективной и интенсивной аквакультуры и «экологически чистых» способов культивирования, расширение исследований в области технологий получения рыбопродукции высокого качества, формирование оптимальной для рыболовства и рыбоводства

водной среды, профилактика заболеваний объектов аквакультуры, повышение качества кормов для культивируемых рыб [178].

(2) Поиск и внедрение новых технологий, ориентированных на освоение глубоководных морских акваторий; выведение марикультуры за пределы береговой зоны.

(3) Оптимизация структуры производства, обеспечение высококачественными водными продуктами внутреннего и внешнего рынков и удовлетворение потребности населения в повышении уровня жизни, включая, в первую очередь, увеличение доходов рыбаков и рыбоводов [184].

(4) Продвижение модели экологически безопасной аквакультуры, укрепление управления отраслью аквакультуры, разумное планирование расположения и деятельности аквакультуры, усиление надзора и управления интродукцией, производством и использованием посадочного материала, кормов, лекарственных препаратов. Изыскание ресурсов для поддержания здорового развития отрасли аквакультуры [182].

(5) Сочетание культивирования традиционных объектов с поиском новых перспективных видов, отвечающих запросам рынка.

(6) Разработка антибактериальных и противовирусных вакцин для защиты здоровья культивируемых рыб. Расширение работ по разработке и внедрению ДНК-вакцин для предотвращения загрязнения водной среды, защиты окружающей среды и здоровья человека [185].

1.5.2 Современное состояние аквакультуры в России

В России ежегодный улов рыбы в настоящее время составляет в среднем 3 – 3,2 млн т; при этом доля аквакультуры не превышает 5%, что существенно ниже мировых показателей. Так, если в Китае производство аквакультуры ежегодно превышает 30 млн т продукции, более половины которой приходится на марикультуру, то в России – не более 100 тыс. т, причем в основном – за счет пресноводной рыбы [186], хотя по экспертным

оценкам потенциальные возможности российской марикультуры составляют до 2 млн т в год.

Россия располагает крупнейшим в мире водным фондом внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей, использование которого носит комплексный многоотраслевой характер [187]. Природно-климатические ресурсы, научно-технический и кадровый потенциал аквакультурного сектора рыбохозяйственного комплекса признаются национальным достоянием России. Эффективное использование этого достояния должно создать необходимые предпосылки для повышения уровня жизни населения страны и социально-экономического развития регионов (рисунок 12).



Рисунок 12 - Распределение основных рыбопромысловых зон в России (значок «красная рыбка» обозначает зоны морского промысла)

Стратегическая задача развития аквакультуры России – надежное обеспечение населения страны продукцией отечественного производства различного ассортимента высокого качества по ценам, доступным для населения с различным уровнем доходов, при сохранении экологической безопасности морских и пресноводных экосистем.

В качестве основных подходов и направлений российской аквакультуры на современном этапе можно выделить:

- пастбищную аквакультуру (включая воспроизводство лососевых рыб на заводах Дальнего Востока и Северо-Запада России, осетровых рыб в бассейнах Каспийского и Азовского морей, сиговых рыб в Обь-Иртышском и Ладожском бассейнах, растительноядных рыб в водохранилищах Южного федерального округа);

- прудовую аквакультуру, специализирующуюся в основном на поликультурном выращивании карповых и растительноядных рыб в Южном, Центральном и Приволжском федеральном округах;

- товарное рыбоводство (включая садковое выращивание форели в Республике Карелия и Ленинградской области, бассейновое выращивание форели в Южном федеральном округе, подращивание осетровых рыб и их гибридов на подогретых водах тепловых и атомных электростанций);

- марикультуру (выращивание двустворчатых моллюсков в Приморье, на Черном и Белом морях, морского ежа в Приморье, водорослей на Дальнем Востоке, Белом и Баренцевом морях, промысел акклиматизированного камчатского краба на Баренцевом море);

- рекреационную аквакультуру.

Потенциальные возможности российской аквакультуры оцениваются в 1,3 – 1,7 млн т в год [186]. Основными факторами, стимулирующими развитие аквакультуры в России, являются:

- возрастающий спрос на продукцию;

- повышение доходов и расширение рациона питания населения;

- поиск потенциальными инвесторами новых способов ведения бизнеса с целью самореализации;

- принятие Россией Закона об устойчивом развитии и разработка региональных концепций устойчивого развития.

Основными морскими промысловыми видами в России являются минтай (*Theragra chalcogramma*), лосось (*Salmo, Oncorhynchus*), гребешок (*Azumapesten*), камбала (*Paralichthys olivaceus*), чёрный палтус (*Reinhardtius hippoglossoides*), обыкновенный краб-стригун (*Chionoecetes opilio*), дальневосточный окунь (*Pleurogrammus azonus*), скумбрия (*Pneumatophrus japonicus*) и др. [188].

Будучи основана на комплексном использовании природно-ресурсного и социального потенциала прибрежных зон морских и пресноводных водоемов, аквакультурная деятельность направлена на решение следующих важнейших задач устойчивого развития:

- обеспечение населения продуктами питания;
- использование биопродукции в качестве сырья для промышленности;
- увеличение занятости населения прибрежных территорий;
- рост самосознания населения, развитие чувства «причастности к месту»;
- снижение продовольственной зависимости прибрежных территорий от импорта;
- сохранение разнообразия прибрежных биологических сообществ;
- контроль и поддержание высокого качества водной и околотоводной среды.

1.6 Объекты исследования: тепловодный вид марикультуры Китая большой желтый горбыль *L. crocea* и холодноводный вид лимнокультуры России радужная форель *O. mykiss*

1.6.1 Большой желтый горбыль *L. crocea*

Большой жёлтый горбыль (*Larimichthys crocea*) — род лучеперых морских рыб семейства горбылёвых. Большой жёлтый горбыль относится к основным промысловым видам в северо-западной части Тихого океана, главным образом - в Китае. Большой желтый горбыль в основном распространен в Восточно-Китайском море, Южно-Китайском море, Тайваньском проливе и других прибрежных акваториях Китая [189]. Большой желтый горбыль - одна из самых экономически ценных рыб и традиционный объект марикультуры в Китае. В последние годы аквакультура большого желтого горбыля быстро развивается в таких прибрежных районах, как Фуцзянь, Гуандун и Чжэцзян. Однако, с увеличением объема промысла и совершенствованием методов ловли природные ресурсы большого желтого горбыля постепенно сокращаются. Крупные промысловые участки лова желтого горбыля, такие как в устье Миньцзян в провинции Фуцзянь и в городе Чжоушань в провинции Чжэцзян, были закрыты для промысла [190]. Уже середине-концу 1980-х годов было сложно поймать крупного желтого горбыля в прибрежных районах Китая. В 1980-х годах, с развитием морской аквакультуры, специалисты применили различные методы селекции перспективных пород горбыля методами искусственного скрещивания, включая методы гибридизации и выпуск рыбы в море, при этом увеличивалось производство морской культивируемой рыбы [191]. Хотя ресурсы большого желтого горбыля в определенной степени восстановились, и в 2013 г. его производство в Китае достигло 100 000 т [192], но численность рыбы в природной популяции серьезно сокращается [189].

1.6.2 Радужная форель *O. mykiss*

Радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmonidae*) - представитель семейства лососевых. Лососевые рыбы представляют собой идеальный объект для аквакультуры, так как чрезвычайно пластичны, вариабельны относительно условий среды, отличаются широким спектром питания и используют буквально любой минимальный шанс, предоставляемый им природной экосистемой или человеком для реализации жизненного цикла (рисунок 13).



Рисунок 13 - Форелевые хозяйства Ленинградской области в районе шхер Ладожского озера

Форель - холодноводная рыба. Наиболее благоприятные для форели параметры окружающей среды - температура воды 14–20°C и содержание кислорода 7–8 мг/л. Радужная форель предпочитает чистые прозрачные водоемы [193]. В настоящее время радужную форель относят к виду *Oncorhynchus mykiss*, второе часто используемое в России название *Parasalmo mykiss*. В естественных условиях форель обитает в России — на Камчатке и Шантарских островах, а также в пресноводных районах североамериканского побережья Тихого океана от Аляски до южного Орегона [102].

Разведение лосося и форели в настоящее время является наиболее быстрорастущей и коммерциализированной отраслью международного рыбоводства и символом индустриализации аквакультуры в мире [194, 195]. Технологическое развитие лососевых и форелевых хозяйств является

эффективной гарантией развития их успешного развития. По мере быстрого развития аквакультуры лосося и форели, экологические проблемы, защита окружающей среды, производственная сертификация и т. д. не уменьшают своей актуальности. Особенно в России, как одной из основных стран выращивания лосося и форели, развитие селекционных технологий и разработка новых мер профилактики болезней лососевых видов очень актуальны [196].

1.6.3 Методы решения проблем рыбоводства

В настоящее время в России и Китае ведутся интенсивные исследования по всестороннему освоению морских и пресноводных рыбных ресурсов, осуществляется энергичное продвижение высокоэффективной аквакультуры, внедряются методы экологически безопасного получения качественных водных продуктов, усиливаются исследования в области контроля экологической среды рыбоводства, профилактики заболеваний культивируемых рыб, оптимизации рациона и состава кормов [185].

Автор диссертации представляет результаты исследования экспрессии молекул маннозных рецепторов большого желтого горбыля и радужной форели, а также хемокинов большого желтого горбыля в процессе иммунного ответа на бактериальную инфекцию. Анализируется иммунный механизм для подготовки теоретической и экспериментальной модели к будущей разработке генетических вакцин. Результаты исследования будут способствовать развитию аквакультуры как в Китае, так и на Северо-Западе России, в частности - в Ленинградской области.

Глава 2 Материалы и методы исследования

Работа выполнена на основе междисциплинарного подхода с использованием современных методик из различных отраслей знания (ихтиология, иммунология, генетика, молекулярная биология, экология, математическая статистика и анализ данных). Для успешного выполнения

запланированного исследования были использованы два взаимодополняющих методических подхода. С одной стороны – это фундаментальное изучение исследуемых белков иммунной системы рыб – хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2: изучение особенностей их первичных и пространственных структур современными методами биоинформатики и 3D-моделирования. С другой – практическое изучение уровней экспрессии генов белков иммунного ответа в норме и при патологии в моделях различных бактериальных инфекций у тепловодных видов Китая и холодноводных видов России.

Применение комбинированных методов исследования позволяет комплексно рассмотреть ряд особенностей иммунологии рыб и, в частности, сравнить реакции белков иммунной системы холодноводных и тепловодных видов – что выводит научный поиск по теме диссертации на важные экологические обобщения.

2.1 Объекты культивирования и условия содержания

Для проведения экспериментов по изучению иммунного ответа на бактериальные инфекции использовали следующие виды рыб: большой жёлтый горбыль (*Larimichthys crocea*) (рисунок 14) и радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmonidae*) (рисунок 15).

Большой жёлтый горбыль выращен на базе гавани Шачэн (провинция Фуцзянь, Китай) в танках с морской водой объемом 16 л, температурой 20 °С, насыщение кислородом 10.8 мг/л, значением рН=7.4, жёсткостью воды 8 ДН. Для эксперимента отбирали особи с линейными размерами от 12 до 14 см, средней массой тела 180 г.

Форель выращивали в Федеральном селекционно-генетическом центре рыбоводства (Россия, Санкт-Петербург, Ленинградская область), в танках с проточной водой объемом 1000 л, температурой воды 10°С, насыщение кислородом 11 мг/л, значением рН=7.4, жёсткостью воды 10ДН. Для эксперимента отбирали особи с линейными размерами 16-18см, массой 280г.



Рисунок 14 - Большой желтый горбыль (*Larimichthys crocea*)



Рисунок 15 - Радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*)

2.2 Бактериальные культуры и условия их культивирования

Возбудители бактериальных инфекций рыб *Vibrio anguillarum* и *Aeromonas salmonicida* spp. были использованы для заражения *L. crocea* и *O. mykiss*, соответственно.

Штамм бактерии *V. anguillarum* (ATCC 43308) был получен из лаборатории микробиологии Института морского рыболовства (Чжэцзян, Китай) в среде, содержащей на 1 литр среды: триптон - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г, NaCl - 10 г, порошкообразный агар - 15 г. Штамм культивировали в объеме среды 200 мл в конических колбах объемом 1л при температуре 28 °С, при перемешивании в режиме 150-200 об/мин. Для эксперимента бактерии культивировали до достижения мутности (оптической плотности при 600 нм) равной 10^8 клеток / мл.

Штамм бактерии *A. salmonicida ssp.* для эксперимента культивировали до достижения мутности (оптической плотности при 600 нм) равной 10^8 клеток / мл.

2.3 Постановка эксперимента

Бактериальное инфицирование рыб. Общий экспериментальный пул (всего 180 особей) большого желтого горбыля при проведении эксперимента разделили на три группы: 60 особей в качестве отрицательного контроля (вводили 300 мкл раствора PBS), 60 особей в качестве положительного контроля (вводили 300 мкл раствора poly I: C (0,5 мг/100 г), 60 особей были инфицированы введением культуры бактерии *V. anguillarum* в растворе PBS концентрацией 10^8 колониобразующих единиц (CFU/мл) в объеме 300 мкл. После инфицирования рыб выдерживали в аквариуме (танке) в течение 6 периодов времени: 6 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч и 72 ч.

Для эксперимента по инфицированию радужной форели бактерией *A. salmonicida ssp.* 60 особей были разделены на две группы: контрольная группа (30 особей, вводили по 500 мкл PBS) и группа, которую инфицировали бактериями в растворе PBS, вводя по 500 мкл концентрацией 10^8 CFU/мл, затем радужную форель выдерживали в танке в течение 6 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч и 72 ч.

Отбор и фиксирование тканей. В отмеченные выше временные точки из танков отлавливали по 3 особи из каждой группы рыб и отбирали образцы тканей из органов: печень, почки и селезенка, мышцы, сердце, жабры, кишечник и мозг. Органы помещали в микроцентрифужные пробирки, содержащие фиксатор РНК для защиты РНК от деградации при кратковременном хранении до момента выделения РНК из образцов. Отобранные органы сохраняли в центрифужной пробирке в растворе для консервации РНК. Хранение осуществляют в жидком азоте, в холодильнике (температура: -80 °C).

2.4 Молекулярно-генетические исследования

Для проведения экспериментов были использованы:

- 6 × буфер для отбора проб (артикул товара: 9156, Takara, Япония);
- раствор для консервирования образцов РНК (артикул товара: CW0592B, Kangwei Century, Китай); RNAiso Plus (артикул товара: D9109, Takara, Япония);
- TRIzol RNA Isolation Reagents – реагенты для выделения РНК (артикул: 9108-1, Takara, Япония);
- RNase Free Water - для растворения и разбавления РНК (артикул товара: 9012, Takara, Япония);
- буфер TE - для растворения и разбавления нуклеиновых кислот (артикул товара: N33122, Shanghai Double Helix, Китай);
- агароза - для проведения горизонтального электрофореза (артикул товара: 92734, BioWest, Испания);
- 50× TAE - концентрат буфера для проведения ДНК-электрофореза (артикул: N11164, Шанхай, Китай);
- EtBr - для визуализации нуклеиновых кислот в агарозном геле (артикул: 2240A, Takara, Япония);
- набор для синтеза кДНК (cDNA Synthesis Kit) - для синтеза первой цепи кДНК (артикул товара: H6110A, Takara, Япония);
- 2 × Taq MasterMix – готовая реакционная смесь для проведения ПЦР (артикул товара: CW0716A, Kangwei Century, Китай);
- SYBR®Premix ExTaq™ - готовая реакционная смесь для проведения ПЦР в реальном времени (артикул товара: DRR420S, Takara, Япония);
- MS-222 (анестезирующие средства) - для обезболивания и успокоения рыб (артикул : 212-956-8, Нанкин Бермудские биотехнологии Co., Ltd., Китай);
- вода DEPC (diethyl pyrocarbonate) - для растворения осаждения РНК, различных реакционных систем, содержащих РНК – таких, как обратная

транскрипция, отжиг миРНК и т. д. (артикул: D8210, Пекинская технология Soleibao, Китай);

- GelRed - красители нуклеиновые кислоты (артикул: 42114, открытая биология Co., Ltd, Китай);

- Tricaine methanesulfonate – препарат для обезболивания и успокоения рыб и других холоднокровных животных (артикул: Finquel, TR 12091, Химический отдел рыбного хозяйства, Россия);

- общие реактивы, необходимые для молекулярной биологии - изопропанол, хлороформ, этанол (марки химически чистые и выше, Шанхайский тест Sinopharm, Китай).

2.4.1 Выделение РНК

Для выделения РНК из отобранных тканей, фиксированных с ингибитором РНКаз, использовали реагент TRIzol. Небольшое количество ткани измельчали в ступке в жидком азоте, затем помещали в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл с реагентом TRIzol, после чего инкубировали на льду в течение 30 минут. Для разделения смеси на фазы в пробирку добавляли 200 мкл хлороформа в расчете на 1 мл реагента и интенсивно перемешивали. Затем смесь центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут при 4 °С.

В водную фазу приливали 500 мкл изопропанола, инкубировали ночь при температуре -20 °С, после чего снова центрифугировали при тех же условиях. Образовавшийся преципитат РНК промывали три раза 75% этанолом, затем высушивали преципитат при комнатной температуре и растворяли в необходимом количестве деионизованной воды, свободной от РНКаз.

Абсолютную концентрацию выделенной РНК определяли с помощью прибора Nanodrop2000.

2.4.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для детального определения и визуализации нуклеиновых кислот, определения длин полученных ПЦР-продуктов, использовали метод гель-электрофореза в 1% агарозном геле. В качестве электрофоретического буфера использовали трис-ацетатный буфер ТАЕ (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА, рН 8,0), флуоресцентный краситель бромистый этидий из расчёта 0,5 мкг на 1 мл раствора. Для нанесения образцов нуклеиновых кислот использовался буфер, содержащий 0,2% красителя Понсо-С и 30% глицерина. Градиент напряжённости электрического поля при электрофорезе составлял 5 В/см. Электрофореграммы анализировали с помощью системы анализа изображений (трансиллюминатора) прибор (Universal Hood II, США Bio-Rad). Длину фрагментов нуклеиновых кислот определяли путём сравнения со стандартными олигонуклеотидами с длинами от 250 до 10000 пар оснований.

2.4.3 Синтез кДНК

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора для синтеза кДНК (Тоубо, Япония) [81]. Образцы РНК нормализовали по концентрации до 100 нг/мкл в соответствии с показаниями прибора Nanodrop.

В качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК брали 5 мкл нормализованной суммарной РНК, добавляли к ней 1 мкл 3'-праймера Oligo (dT), нагревали полученную смесь до температуры 70°C в течение 2 минут (отжиг праймера), а затем охлаждали до 42°C (температурный оптимум ревертазы). К полученной смеси добавляли 2 мкл 5X буфера, 0,65 мкл 50X дНТФ, 0,5 мкл DTT, 0,5 мкл PlugOligo и 1 мкл ревертазы (суммарный объём реакции 10 мкл). Смесь инкубировали при температуре 42°C в течение часа. По окончании реакции пробирки с реакционной смесью охлаждали до температуры 4°C. Хранение полученных образцов осуществляли при температуре -20 °C.

Для синтеза второй цепи и амплификации двухцепочечной кДНК в качестве матрицы брали 0,8 мкл разбавленного в 5 раз раствора, содержащего первую цепь кДНК, добавляли 0,6 мкл 10X Taq буфера, 2 мкл 10X dNTP, 0.8 мкл ПЦР праймера-R (CCL2/3/4), 0.8 мкл ПЦР праймера-F (CCL2/3/4), 14,8 мкл H₂O и 0,2 мкл 50X кTaq-полимеразы (суммарный объём реакции 20 мкл).

Профиль реакции: предварительный прогрев 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 с; 60 °С – 30 с; 72 °С – 30 с. Количество циклов реакций 25-30. Качество полученной суммы двухцепочечных кДНК проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Хранение полученных образцов суммарной кДНК осуществляли при температуре -20 °С.

2.4.4 Дизайн праймеров для ПЦР и ПЦР в реальном времени

Выравнивание множественных последовательностей генов хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 с генами других видов для поиска консервативных областей проводили с программным обеспечением Bioedit.

Дизайн оптимальных специфических праймеров для ПЦР при клонировании и идентификации целевых генов осуществляли с использованием программы Primer 5.0 (<http://primer3.ut.ee/>).

2.4.5 ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR)

Для анализа экспрессии мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 большого желтого горбыля для qRT-PCR в амплификаторе (Prism® 7500, Американские прикладные биосистемы) был использован набор премиксов SYBR ExTaq (Takara, Япония). Для анализа экспрессии мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 большого желтого горбыля в отобранных органах после проведения экспериментов по заражению проводили ПЦР в реальном времени в объеме 20 мкл (12,5 мкл TB Green; 0,5 мкл (концентрация:10 $\mu\text{mol/L}$) праймера-F-CCL2/3/4 (прямого); 0,5 мкл (концентрация:10 $\mu\text{mol/L}$)

праймера-R-CCL2/3/4 (обратного) (таблица 3); 2 мкл (концентрация: 100 мг / мкл) кДНК матрицы; 2,5 мкл ROX Reference Dye II и 9,5 мкл DEPC воды). Проведение реакции без матрицы использовали в качестве отрицательного контроля. Все реакции проводили в триплетах при следующих условиях: 95 °С - 10 сек, (95 °С - 5 сек и 40 с при 58 °С – 40 сек, 30 с при 72 °С – 30 сек) x40 циклов, 72 °С - 2 мин.

Для анализа экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 большого желтого горбыля количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) была проведена на приборе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора SYBR premix ExTaq Kit (Takara).

Флуоресцентная реакционная смесь для ПЦР в реальном времени на 20 мкл имела следующий состав: 10 мкл буфера SYBR Premix ExTaq, 0,4 мкл праймера ROXII (прямой), 0,4 мкл праймера ROXII (обратный), 0,8 мкл матрицы кДНК и 8 мкл воды DEPC.

Реакцию без матрицы использовали в качестве отрицательного контроля. Все образцы были проанализированы в трех лунках с использованием следующих условий: 10 с при 95 °С, затем 40 циклов при 95 °С в течение 5 с и при 58 °С в течение 40 с. Экспрессию β -актина использовали в качестве внутреннего контроля для анализа экспрессии мРНК MR. Кривую диссоциации анализировали после термоциклирования, чтобы определить, амплифицировался ли отдельный ампликон определенного размера.

Для анализа экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 радужной форели использовали набор (RR820A, Takara, Япония) для проведения qRT-PCR в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в объеме 20 мкл: 10 мкл SYBR Premix, ROX Dye 0,8 мкл, 0,8 мкл (концентрация:10 $\mu\text{mol/L}$) праймера-F-MRC1/2 (прямого), 0,8 мкл (концентрация:10 $\mu\text{mol/L}$) праймера-R-MRC1/2 (обратного) (таблица 3), 2 мкл кДНК матрицы и 6 мкл dH₂O (Takara, Япония). ПЦР-амплификацию проводили по следующей схеме: 95 °С - 30 сек, (94 °С - 5 сек, 60 °С - 30 сек) x 40 циклов, 96 °С - 10 сек, кривая плавления от 65 °С до 95 °С с пошаговым увеличением температуры

отжига 0,5 °C в течение 5 с + считывание с планшета, конец. Экспрессию β -актина использовали в качестве внутреннего контроля для всех реакций.

Таблица 3 - Используемые в работе праймеры

Праймеры	Последовательности (5'-3')	Размер ПЦР-фрагмента
<i>L. crocea</i> -CCL2-F	ACCTTAGTCTCACTCTTCCT	228 п.о.
<i>L. crocea</i> -CCL2-R	CAGATTCTCTTGCCTTTTAT	
<i>L. crocea</i> -CCL3-F	TTTTGTTTAGATTGTCTTTAC	236 п.о.
<i>L. crocea</i> -CCL3-R	TTTTCATCACTCTTCTCGGGT	
<i>L. crocea</i> -CCL4-F	CAGTCACATCCTTCTGCTTTG	240 п.о.
<i>L. crocea</i> -CCL4-R	ACAGATGCGACGAGACTTTTG	
<i>L. crocea</i> -MRC1-F	GATGGGGCTTGGAAGACAG	230 п.о.
<i>L. crocea</i> -MRC1-R	AGGTAGGTAAGGGCACAGGAG	
<i>L. crocea</i> -MRC2-F	AGAGAACGGATTTGTATGGG	180 п.о.
<i>L. crocea</i> -MRC2-R	CAGAACAGAGAAGGCGACG	
β -actin-F	TТАCTCCTTCACCACCACAG	232 п.о.
β -actin-R	ATTCCGCAAGATTCCATAC	
<i>O. mykiss</i> -MRC1-F	GCACAAGAGCCACGAA	303 п.о.
<i>O. mykiss</i> -MRC1-R	AAGGCACCGAGTCCTA	
<i>O. mykiss</i> -MRC2-F	CACCACCACTCTACCCATCC	328 п.о.
<i>O. mykiss</i> -MRC2-R	GGTCACCCACTTCCACTTCT	
EF-1 Alpha-F	ATGCCCTGTACTGGATTGC	
EF-1 Alpha-R	TGGGGGCATCCTCAAGTTTC	

2.4.6 Анализ первичных последовательностей исследуемых белков

Праймеры для CCL2 и CCL3 были разработаны программным обеспечением Premier 5.0. Анализ результатов секвенирования проводили программным обеспечением Bio Edit 7.0. Гистограмма экспериментальных результатов была построена программой SigmaPlot 12.0. Белковые последовательности были выравниваны программным обеспечением Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Двумерные структуры и функциональные домены белков проанализированы программой BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Построены филогенетические деревья программой MEGA 7 последовательностей CCL2 и CCL3 большого желтого горбыля и других видов.

Физические свойства MRC1 и MRC2 были предсказаны инструментом ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Сигнальный пептид был предсказан сервером SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Консервативные белковые домены белки были предсказаны с использованием ExPASy Prosite (<https://prosite.expasy.org/>), SMART (Инструмент исследования простой модульной архитектуры) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и поиск по базе данных Pfam (<http://pfam.xfam.org>). Идентичность последовательностей и процент сходства MRC рассчитывали с помощью Matrix Global Alignment Tool (MatGAT v2.02) (<https://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/MatGAT.shtml>). Расчет сходства MRC между объектами исследования и другими видами проводился с помощью онлайн-программного обеспечения CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

2.4.7 3D-моделирование белков

Для прогнозирования доменной структуры в аминокислотной последовательности белка использовали сервер SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), Теоретическая третичная структура белков была предсказана с помощью моделирования по гомологии на сервере SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Построенные 3D-модели пространственных структур белков были дополнительно обработаны с помощью программного обеспечения Rymol, а также с помощью графического редактора изображений FastStone Capture.

2.5 Статистическая обработка результатов

Метод расчета достоверности данных экспрессии.

СТ_{гена} - Исходные данные экспрессии мРНК генов (CCL2/3/4 и MRC1/2) в разных тканях;

СТ_{актин} - Исходные данные экспрессии мРНК актинов (β -actin EF-1 и Alpha) в разных тканях.

СТ_{mean} - Среднее значение трех параллельных выборок СТ. $СТ_{mean} = (СТ_1 + СТ_2 + СТ_3 + \dots + СТ_n) / n$

$\Delta СТ$ - Разница между СТ_{mean}(гена) и СТ_{mean}(актин). $\Delta СТ = СТ_{mean}(\text{гена}) - СТ_{mean}(\text{актин})$.

$\Delta \Delta СТ$ - Среднее значение $\Delta СТ$. $\Delta \Delta СТ = (\Delta СТ_1 + \Delta СТ_2 + \Delta СТ_3 + \dots + \Delta СТ_n) / n$.

RQ - Значение экспрессии мРНК. $RQ = 2^{(-1 \times \Delta \Delta СТ)}$.

Формула расчета стандартного отклонения ($\pm SD$) и метод расчета значимости ().*

Формула расчета дисперсии: $s^2 = [(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2] / n$.

Формула расчета стандартного отклонения: $s = \sqrt{s^2}$.

S - Значение стандартного отклонения.

Статистический анализ различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием R v4.0.2. Вертикальные столбцы представляли собой среднее значение \pm стандартное отклонение шести технических повторов, а звездочки над столбцами представляли статистически значимые отличия от контрольных образцов. «*» при $P < 0,05$, «**» при $P < 0,01$.

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Анализ первичных и пространственных структур целевых белков исследуемых рыб

3.1.1 Организация первичной и пространственной структур хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 большого желтого горбыля *L. crocea*

Кодирующая последовательность (кДНК) CCL2 (GenBank ID: MN125657) состоит из 294 пар оснований (п.о.), а кодирующий его белок состоит из 97 аминокислотных остатков (а.о.) (рисунок 16 А). Через онлайн-сервер ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) спрогнозированы следующие параметры: молекулярный вес: 10,7 кДа, теоретическое значение изоэлектрической точки (pI): 9,55. Теоретическая модель первичной последовательности показывает, что белок CCL2 имеет два домена: первый - область низкой сложности (2-21 а.о.), второй представляет собой домен SCY (25-84 а.о.) (рисунок 16 Б). Согласно построенной теоретической трехмерной модели, структура включает в себя 3 антипараллельных β -листов и 1 α -спираль на С-конце (рисунок 16 В). В SCY-домене есть четыре остатков цистеинов, среди которых два последовательных (CC), идущих друг за другом в первичной последовательности (рисунок 16 А, В). Эти четыре остатка цистеина образуют две внутренние дисульфидные связи и необходимы для поддержания биологической активности белка.

Аминокислотные последовательности CCL2 сравнили с некоторыми другими видами животных. В результате сравнения последовательностей рыб и млекопитающих было обнаружено, что у них есть 10 аминокислотных остатков в консервативном положении: четыре цистеина (C - Cys), один тирозин (Y - Tyr), один аланин (A - Ala), один фенилаланин (F - Phe), один треонин (T - Thr), один пролин (P - Pro) и один триптофан (W - Trp), 14 а.о. в высококонсервативных положениях и 9 а. о. в менее консервативных положениях (рисунок 17).

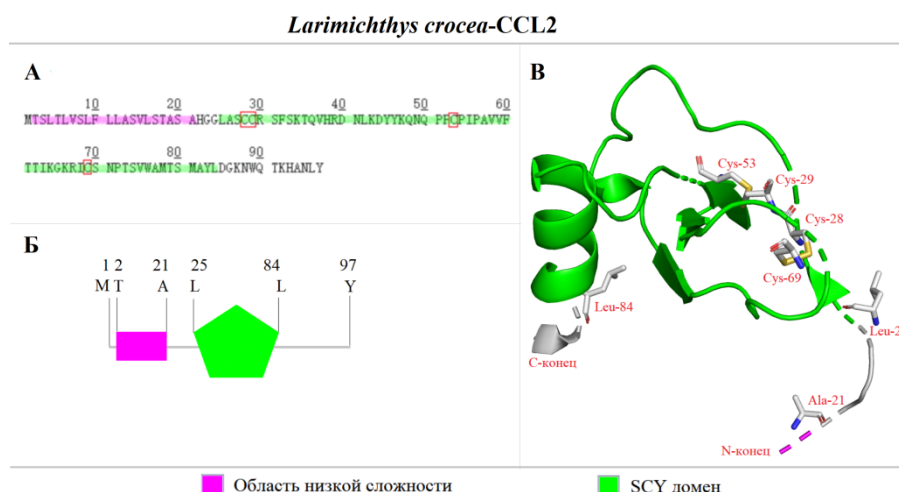


Рисунок 16 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры CCL2 большого желтого горбыля: аминокислотная последовательность CCL2 (А); схема расположения доменов в структуре CCL2 (Б); трехмерная теоретическая модель CCL2 с обозначенными критически важными аминокислотами (В). Цветом обозначены структурные домены CCL2

Larimichthys crocea-CCL2

<i>Larimichthys crocea</i>	XP_011614809.1	— M I T V T T F V L C F V L A — L T F A P Y A C S H A S R S C C T R Y S G K P V F P Q L I R G Y R	47
<i>Homo sapiens</i>	QIH54606.1	— M T S L T L V S — L F — L L A S V L S T A S A H G G L A S C C R S F S K T Q V H R D N L K D Y Y	46
<i>Mus musculus</i>	NP_001123366.1	M T S R F V F L S A V V V L L C A V S L — S Q G M R I G P K R C C F Q Y A E R Q V F P K Q V M E Y S	50
<i>Takifugu rubripes</i>	AAH09716.1	— M K V S A A L L C L L I A A T F I P Q G L A Q F D A I N A P V T C C Y N F T N R K I S V Q R L A S Y R	52
<i>Danio rerio</i>	AAI45870.1	— M Q V P V M L L G L L F T V A G W S I H V L A Q P D A V N A P L T C C Y S F T S K M I P M S R L E S Y K	52
	 * * *	
<i>Larimichthys crocea</i>	XP_011614809.1	E H T A M E N C R I E A I L F Y T V Q R K M V C A N F K D E W V K K V L K L S S K L R R L S K G K F ———	98
<i>Homo sapiens</i>	QIH54606.1	K Q N — Q P P C I P A V V F T T I K G K R I C S N P T S V W A M T S M A Y L D G K N W Q T K H A N L Y ———	97
<i>Mus musculus</i>	NP_001123366.1	— M T — S Q Q C P K E A V L F K T A R G R Y V C A R F S D P V V Q E Y M Q A I D S K R V G S Q G T L ———	98
<i>Takifugu rubripes</i>	AAH09716.1	R I T — S S K C P K E A V I F K T I V A K E I C A D P K Q K W Q D S M D H L D K Q T Q T P K T ———	99
<i>Danio rerio</i>	AAI45870.1	R I T — S S R C P K E A V V F V T I K L K R E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L D R N Q M R S E P T T L F K T A S A L R S	111
		. * * : : * * *	

Рисунок 17 - Сравнение аминокислотных последовательностей белка CCL2 большого желтого горбыля с другими видами животных. «*» указывает на положения аминокислотных остатков с высокой консервативностью; «:» обозначает а.о. в высококонсервативном положении; «.» обозначает а.о. в низкоконсервативном положении; красным цветом отмечены остатки цистеина, входящие в SCY-домен

Второй охарактеризованный нами хемокин – CCL3. Его кДНК (GenBank ID: MN125658) состоит из 309 п.о., а кодирующий её белок состоит из 102 а.о. Как и в CCL2, в CCL3 тоже есть четыре остатка цистеина, из которых два являются смежных в первичной структуре (рисунок 18 А). Его предсказанный молекулярный вес - 11,3 кДа, теоретическое значение pI: 9,08. В отличие от предыдущего хемокина, CCL3 имеет в своей структуре три

домена: первый представляет собой область низкой сложности (1-7 а.о.), второй домен - трансмембранный домен (9-31 а.о.), третий домен - домен SCY (32-90 а.о.) (рисунок 18 Б). Все четыре остатка цистеина находятся в домене SCY, которые также образуют внутримолекулярные дисульфидные связи, необходимые для нормального функционирования хемокина (рисунок 18 А, В). CCL3 тоже имеет 3 антипараллельных β -листов и 1 α -спираль на С-конце (рисунок 18 В).

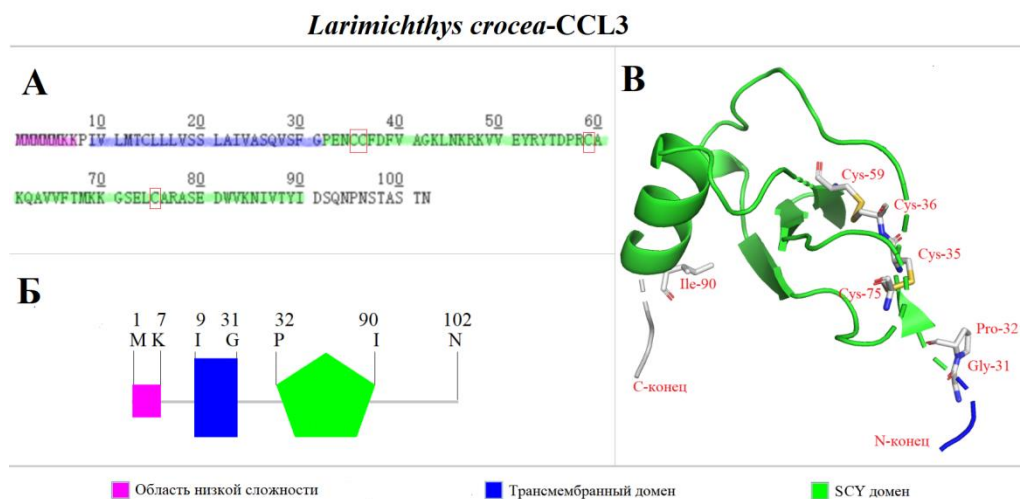


Рисунок 18 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры CCL3 большого желтого горбыля: аминокислотная последовательность CCL3 (А); схема расположения доменов в структуре CCL3 (Б); трехмерная теоретическая модель CCL3 с обозначенными критически важными аминокислотами (В). Цветом обозначены структурные домены CCL3

Аминокислотную последовательность CCL3 сравнили с таковой у других видов. У них есть 12 аминокислотных остатков в высококонсервативных положениях: пять цистеинов, один аланин, один тирозин, один треонин, один фенилаланин, один лизин и один валин. Среди сходных аминокислотных остатков - 21 а.о. в высококонсервативных положениях, ещё 9 а.о. в менее консервативных положениях (рисунок 19).

Larimichthys crocea-CCL3

<i>Larimichthys crocea</i>	QIH54607.1	MMMMMKKPIVLMTCLLLVSSLAIVASQVSPENCCFDVAGKLNKRKVVVEYRYTDP	60
<i>Danio rerio</i>	NP_001108575.1	MRSIMFLLVLFCSLQDTSSAMDA—IISANSVCCBGITHKKITLKQIVSYHWTTSSCA	58
<i>Mus musculus</i>	EDL15715.1	MK-VSTTALAVLLCTMTLCNQVFSAPYGADTPTACCFSYS-RKIPRQFIVDYFETSSLES	58
<i>Homo sapiens</i>	AAI71831.1	MQ-VSTAALAVLLCTMALCNQ-FSASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFADYFETSSQCS	58
		: : : * : : : * * * : : : * * * :	
<i>Larimichthys crocea</i>	QIH54607.1	KQAVVFTMKKGSSELARASEDWVKNIVTYIDSQNFNSTASTN	102
<i>Danio rerio</i>	NP_001108575.1	KKDIVFTTKAGKKICVDPENTFVKRQVWILDSRVKV	94
<i>Mus musculus</i>	EDL15715.1	QPGVIFLTKRNRQICADSKETWVQEVITDLELNA	92
<i>Homo sapiens</i>	AAI71831.1	KPGVIFLTKRSRQICADPSEEWVQKQVSDLELSA	92
		: : * * : : * : : * : : :	

Рисунок 19 - Сравнение аминокислотных последовательностей белка CCL3 большого желтого горбыля и других видов животных. «*» обозначает положение а.о. с полной консервативностью; «:» обозначает а.о. в высококонсервативном положении; «.» обозначает а.о. в низкоконсервативном положении; красным цветом отмечены остатки цистеина, входящие в SCY-домен

Последний из исследованных в работе хемокинов - CCL4, кДНК (GenBank ID: MN125659) которого состоит из 276 п.о., кодирующих 91 а.о. Его расчётный молекулярный вес 10,3 кДа, значение pI: 9,17. Как и предыдущие два хемокина, в CCL4 тоже есть четыре остатка со схожими местоположениями (рисунок 20 А). Как и CCL2, CCL4 имеет два домена: первый представляет собой трансмембранный домен (5-27 а.о.), второй представляет собой SCY домен (28-86 а.о.), в котором располагаются критически важные четыре остатка цистеина (рисунок 20 Б, В).

Как и в предыдущих двух хемокинов, в CCL4 тоже имеется 3 антипараллельных β -листов и 1 α -спираль на С-конце (рисунок 20 В).

В результате анализа первичных последовательностей и пространственных структур исследованных хемокинов *L. crocea* мы показали, что они имеют общий главный функциональный домен SCY, который содержит 4 остатков цистеина в полностью консервативном положении. Доменная структура остальных хемокинов имеют некоторые различия. Так, в отличие от CCL2, хемокины CCL3 и CCL4 имеют в своей структуре трансмембранный домен. Однако, CCL2 обладает областью низкой сложности (Low complicity region), но обычно эта область не несет значимых доменов.

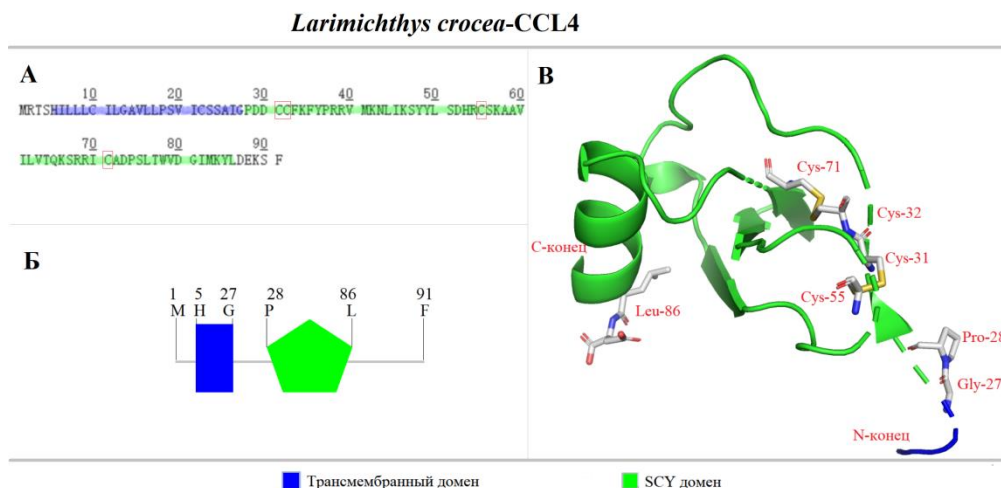


Рисунок 20 - Теоретические модели первичной и пространственной структур CCL4 большого желтого горбыля: аминокислотная последовательность CCL4 (А); схема расположения доменов в структуре CCL4 (Б); трехмерная теоретическая модель CCL4 с обозначенными критически важными аминокислотами (В). Цветом обозначены структурные домены CCL4

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 *L. crocea* подобны хемокинам CC-типа других позвоночных животных. Они имеют четыре остатка цистеина в консервативных положениях (рисунок 21), два из которых расположены близко к N-концу. Эти четыре остатка Cys играют важную роль в стабильности третичной структуры белка, так как отвечают за корректную конформацию функционального белка: между первым и третьим, а также вторым и четвертым остатками Cys находятся две дисульфидные связи, которые играют критическую роль в стабилизации третичной конформации белка. Первые два остатка цистеина определяют распознавание и активацию связанного с хемокином его специфического рецептора на мембране клетки-мишени. Дисульфидные связи делают эти функциональные области прочно связанными для обеспечения их биологической активности.

Larimichthys crocea-CCL4

<i>Homo sapiens</i>	NP_002975.1	MR—SALILLCLVIGALWS—AALANNANVPECCFKYVPRKIPRHSVREYEMTRSDC	55
<i>Canis lupus familiaris</i>	NP_001005250.1	MR—TSHILLCLIGAVLLP—SVCSSAIGPDDCCFKYVPRVMMKLIKSYVLSDRHC	55
<i>Mus musculus</i>	EDL15716.1	MK—TICLTLALLLLTVFHSY—AAPHGMEASPTSCCFQFATMRVPLNKIVSIRKTDNMC	56
<i>Gallus gallus</i>	NP_990051.1	MK—LSAVV—LALLIASFCSRASSAPVG—PDVPT—CCTTYITHKIPRNLQRHYSTSTSC	55
<i>Esox lucius</i>	NP_001297919.1	MKLEVSALS—LLLLVAAPFCAGFSAFNG—SDPPTSCCFSYTSRQLHRFVMDVYETSSLC	58
<i>Dicentrarchus labrax</i>	CAM32187.1	MKLCVTVLS—LLMLVAAPFCSPALSAPNG—SDPPTACCFSYTARKLPRNFVVDVYETSSLC	58
<i>Rachycentron canadum</i>	AER13142.1	MKLCVTVLS—LLVLVAAPFCSPALSAPNG—SDPPTACCFSYTLRKPFRNFVADVPETSSLC	58
<i>Epinephelus coioides</i>	AFN58329.1	MS—TSRFVFLSVMVLLCAVSLSQGMR—IGPKRCCFQYAEGRVFPFKVMEYSMTSQQC	56
<i>Sparus aurata</i>	XP_030280590.1	MT—ASRFVIFSVMVLLCAVSLSEGM—IGPKRCCFQYAEGRVFPFKVMEYSMTSQQC	56
<i>Miichthys miiuy</i>	AEM75115.1	MF—TPRLAMLSVLVLSAITFTEGLRMAAGPKKCCFTFADRQIPRGRVGVYTKTSQQC	58
<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003979251.2	MA—APRLA—LAGFVILLAVITVTEGLR—GSGFRCCTRFNRKRVQVQDKVLSYTRTSQRC	56
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AAT76448.1	MA—APRLT—LSVFLMLAVIALTEGVR—GPGPKKCCFGFNTIPVVKERVVSYARTSQRC	56
<i>Danio rerio</i>	NP_001108528.1	MS—APRLH—LSVFLMLAVITLSEGLR—GMGPKKCCFNYNKFPVKERVVSYFRTSQQC	56
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	ACG76387.1	MA—TLRLA—LAVVAVMLAVINVTGMR—GSGPKKCCSVFNDKPMHKT RVVSYTKTSQRC	56
<i>Salmo salar</i>	XP_014061984.1	MA—APRLA—LAVFVLMMLAVITVTEGMR—GAGPKKCCQSFNEKPVHKGRRVSYQRTSQRC	56
<i>Larimichthys crocea</i>	QIH54608.1	MA—APRLA—LSVFLMLAVITLSEGM—GTGPKKCCFRFNESEVPRDRAVGIKTSQRC	56
	 * * * : : : : *	
<i>Homo sapiens</i>	NP_002975.1	SKRAVILVTIKKRFRCANPDDPSIEKDKMSIDESKFKQ—————	92
<i>Canis lupus familiaris</i>	NP_001005250.1	SKAAVILVTQKSRRIADPFLTWVGDIMKYLDEKSF—————	91
<i>Mus musculus</i>	EDL15716.1	LLPALIVTVRDRVTCYELTEPWWQKAMHQLSATH—PTAVSRSRSQWG	104
<i>Gallus gallus</i>	NP_990051.1	SKPAILFITTKEREVCANPSPWVQRYLQSVKRD—————	89
<i>Esox lucius</i>	NP_001297919.1	SKPAVVFQTKRGRQVCANPSEPPWVEYMSDLELN—————	92
<i>Dicentrarchus labrax</i>	CAM32187.1	SQPAVVFQTKRGRQVCADPSESWVQEVVYDLELN—————	92
<i>Rachycentron canadum</i>	AER13142.1	SQPAVVFQTKRGRQVCANPSEPPWVEYMDLELN—————	92
<i>Epinephelus coioides</i>	AFN58329.1	PKEAVLFKTAGRYVCAKPSDPWVQEQYMQAIDSKRV—GNQGTL—————	98
<i>Sparus aurata</i>	XP_030280590.1	TKEAVLFKTVKGRQVCANPADPWWKLIQKINK—PV—GGQGAL—————	97
<i>Miichthys miiuy</i>	AEM75115.1	SNPAILFKTQAGRQVCARSSDRWVKDYINFLDSKKS—GEQTPLL—————	101
<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003979251.2	AIFGVLKTVGGNTLCARSSVDWVKDLIRHLDAKSAHIGETSNL—————	100
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AAT76448.1	INPADMLKTVAGRNLCVKPSATWVKELISYMDAKPA—PGQTSNL—————	99
<i>Danio rerio</i>	NP_001108528.1	PKPAILFKTVAGRQLCANPSTPWWNDLISYLKTKSI—PGKMSNL—————	99
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	ACG76387.1	ANPAVLFMTKAGRHLCAKPSAAWVKELITYLQDKTV—PGETSNNV—————	99
<i>Salmo salar</i>	XP_014061984.1	PVPAILFKTVAGRQLCAKPSAAWVKDLISYLDGKSL—PGEASNL—————	99
<i>Larimichthys crocea</i>	QIH54608.1	SNPAILLKTAKGRQLVRFSAFWVKTLITVLDKAI—PGETSNNL—————	99
	 * * * : : : : *	

Рисунок 21 - Выравнивание аминокислотных последовательностей CCL4 большого желтого горбыля с другими видами животных. «*» обозначает положение а.о. с полной консервативностью; «:» обозначает а.о. в высококонсервативном положении; «.» обозначает а.о. в низкоксервативном положении; красным цветом отмечены остатки цистеина, входящие в SCY-домен

Наличие четырех цистеинов в полном консервативном положении является характеристикой хемокинов. Посредством множественного выравнивания последовательностей хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4 разных видов сделан вывод, что эти три хемокина принадлежат к семейству хемокинов и являются типичными членами их семейства. Более того, эти аминокислоты в консервативных положениях связаны с биологическими функциями хемокинов, обеспечивающих их функционирование.

Путем анализа первичной и третичной структур их аминокислотных последовательностей было обнаружено, что они имеют аналогичные высокоуровневые структуры, обе из которых закреплены дисульфидной цепью, образованной цистеином на свободном N-конце на трех антипараллельных β -листов, а на C-конце есть спираль почти

перпендикулярная α -листу.

Экспериментальные исследования показали, что хемокины СС играют важную роль на N-конце, когда они связываются со своими рецепторами [197]. N-конец СС-хемокина может активировать рецептор и оказывать хемотаксический эффект на моноциты, Т-клетки и т. д. Если N-конец удален, хемокин утратит свою способность связываться с рецептором. α -спираль на С-конце также чрезвычайно важна, когда хемокины связываются с рецепторами, поскольку α -спираль может прочно связываться с мукополисахаридом на поверхности тканей или клеток и способствовать передаче сигнала [197].

3.1.2 Особенности строения маннозных рецепторов MRC1, MRC2 у большого желтого горбыля *L. crocea* и радужной форели *O. mykiss*

Кодирующая последовательность MRC1 (кДНК) *L. crocea* (GenBank ID: AKH05366) была получена с использованием данных полного генома *L. crocea*, имеющегося в генбанке NCBI. Она включает 4479 п.о, что соответствует 1492 а.о. (рисунок 22 А). Через онлайн-сервер ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) были спрогнозированы следующие параметры: молекулярный вес (63,5 кДа) и теоретическое значение pI (5,02). Структура белка MRC1 *L. crocea* от N-конца до С-конца соответственно содержит домен RICIN (Богатый цистеином домен, CR) (97-203 а.о.), 8 доменов CTLD (С-лектин-подобные домены) (CTLD1 - 269-397 а.о., CTLD2 - 413-536 а.о., CTLD3 - 554-676 а.о., CTLD4 - 696-822 а.о., CTLD5 - 843-964 а.о., CTLD6 - 985-1118 а.о., CTLD7 - 1133-1251 а.о. и CTLD8 - 1268-1397 а.о.), а также трансмембранный домен (1424 ~ 1446 а.о.) (рисунок 22 Б).

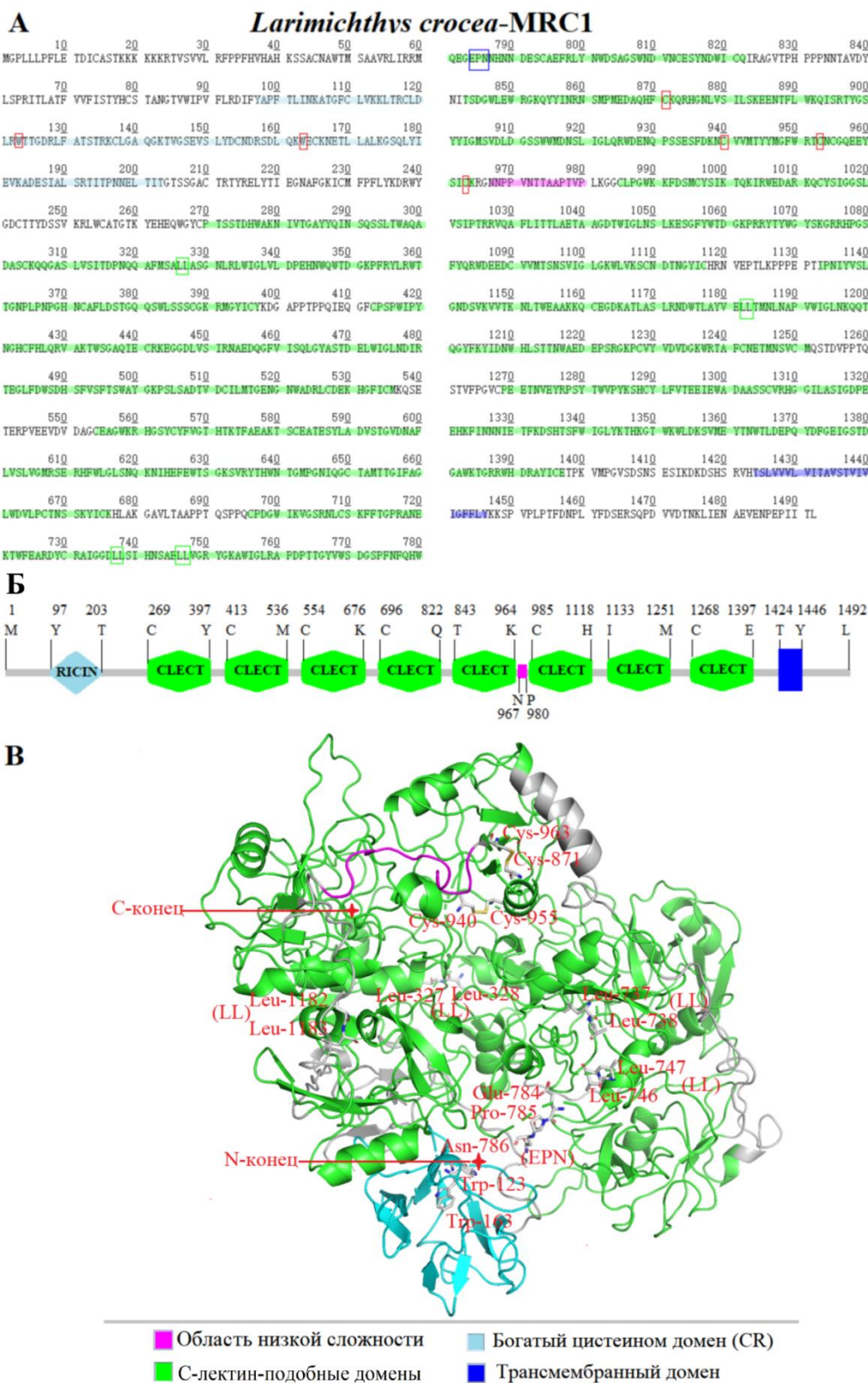


Рисунок 22 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры MRC1 большого желтого горбыля. Аминокислотная последовательность MRC1 (A) и схема расположения доменов в структуре MRC1 (B); B – трехмерная теоретическая модель MRC1 с обозначенными важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены MRC1 большого желтого горбыля

В домене CTLD обнаружены четыре двойных гидрофобных лейцина (LL) (рисунок 22 А) и остаток аспарагиновой кислоты в полностью консервативных положениях (рисунок 22 А, В, рисунок 22). Также в каждом домене CTLD есть 4 цистеина в полностью консервативных положениях. Также в CTLD4 был обнаружен неполностью консервативный критический домен распознавания углеводов (CRD) EPN (Glu-Pro-Asn) (рисунок 22 А, В, рисунок 23).

В последовательности белка MRC1 есть остаток триптофана в богатом цистеином домене (рисунок 22 А, В). В домене CTLD обнаружены четыре двойных гидрофобных лейцина (LL) (рисунок 22 А) и остаток аспарагиновой кислоты в полностью консервативных положениях (рисунок 22 А, В, рисунок 22). Также в каждом домене CTLD есть 4 цистеина в полностью консервативных положениях. Также в CTLD4 был обнаружен неполностью консервативный критический домен распознавания углеводов (CRD) EPN (Glu-Pro-Asn) (рисунок 22 А, В, рисунок 22).

Аминокислотные последовательности MRC1 сравнили с некоторыми другими видами животных. В результате сравнения последовательностей рыб и млекопитающих было обнаружено, что у них есть 53 а.о. в полностью консервативных положениях: 13 цистеина, 1 аспарагиновой кислоты, 6 глицина, 1 глютаминовой кислоты, 3 лейцина, 4 изолейцина, 2 валина, 3 серина, 1 тирозина, 5 аланина, 1 пролина и 13 триптофана, а также было обнаружено 70 а.о. в высококонсервативных положениях и 42 а.о. в низкоконсервативных положениях (рисунок 23).

Larimichthys crocea-MRC1

<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	-----MSLKSNTGADLNDV-FVVKQMLE-----QIRKEFAKDG--NFIIG	37	LTLKQHWQTEMITLEKTDLSLRKFLDTGSPVVE--IP-----VFTLVSE	301
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----GRYKAWIGLRAFDFTTGTWSDGSPFNQHWQEGEPNHNNDSCAERFLYNWDSA	805	MT-SRS-VIGLGRWLVKSCNDTNGYLDHRVFPFLKPPFPPTIPNIVSLGHSVKVYTK	1150
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	ASGSYHKLFWLGLTYGSPSFGFTWSDGSPVSYENWAYGEPNRYQVVEYCGELKGD--PT	761	LI-GGA-SHEAGRWMDTCDISKRGYLDQTRSDPDLTNPATIQDGFVKYKSSYSLMRQ	1112
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	SSGSYHFLFWLGLTYGSPSFGFTWSDGSPVSYENWAYGEPNRYQVVEYCGELKGD--PG	761	VI-GGN-SREAGTWMDTCDISKRGYLDQTRSDPDLTNPATIQDGFVKYKSSYSLMRQ	1111
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	QY-GMGETAWIGFNLLNINSQFVWDTGTPSDFENWSPGEPNHNNDSCAERFLYNWDSA	422	ML-RSF-EHMTGMWVQMGDGGQFPCIKRRTDQLIRPVTAAQPHFTLGHSDYKLVQKE	772
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	TMGPMSENAWIGENALNANSQGTWSDGSPVSYENWAYGEPNRYQVVEYCGELKGD--PG	754	MV-GGS-SLLAGLWVKEGSAIKRRLPCIKRRTDQLIRPVTAAQPHFTLGHSDYKLVQKE	1106
*.....*	*.....*	
<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	FRWRELLNG--DVFLLTKVGLSPEEGFPVE--LP-----VFTLVSEERSM	78	ERSMAEAQKFCREYEEELATIFNAEDQIALRAVSAQSLTDAVWVHSQYRA-----	352
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----GSWVDVNCESYNDWICQIRAGVTPHPFPNN-TAVDYNITSDGWLVEKRGVYINRSMFM	864	NLTWEAAKQCGEDKATLASLRNDWTLAV--ELLTMLNAPVWIGLNRQQTQGFYKIID	1208
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	MSWVDINCEHLNHWICQIRAGVTPHPFPNN-TAVDYNITSDGWLVEKRGVYINRSMFM	821	KFQWHEAETVCKLHNSLILDPYSNAFA--WLMQTESNRERWIALNSLTDNQVTTD	1170
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	MSWVDINCEHLNHWICQIRAGVTPHPFPNN-TAVDYNITSDGWLVEKRGVYINRSMFM	821	KLFWHEAETVCKLHNSLILDPYSNAFA--WMDMDFPNFTWIALNSLTDNQVTTD	1169
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	RRWVDRCDEAYNDWICQIRAGVTPHPFPNN-TAVDYNITSDGWLVEKRGVYINRSMFM	482	KMCWDEARQCKASDADLASVKNISQAIT--LLVSNFKPLWIGLNSLTSQIRWVD	830
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	KFWVDRCDEAYNDWICQIRAGVTPHPFPNN-TAVDYNITSDGWLVEKRGVYINRSMFM	813	EMWVDESRLCKADDAELASLILNFIAGAV--SMFYRHKGSMWIGLNTWETWGFRTD	1164
*.....*	*.....*	
<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	AEAQKFCREYEEELATIFNAEDQIALRAVSAQSLTDAVWVHSQYRA-----	123	FW-PQLAYWNTF--NAKVVHGTAKRWILRYCTISCHVQCKSTQLNSE-----	399
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----EDAQKFCQQRHGLVSLISKEENTFLWIKQISRT--YGSYIIGMSVLDGSSWMDNSLIG	922	NWHLSTTNWAEDEPFRGKPCVVDVGGKWTAFCTNETMNSVCMQSTDPVPTQSTVFPFVC	1268
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	DNARAFCKRNFGLVSLISKEENTFLWIKQISRT--YGSYIIGMSVLDGSSWMDNSLIG	881	KWRVRYTNWAEDEPFRKLSACVVDVGGKWTAFCTNETMNSVCMQSTDPVPTQSTVFPFVC	1230
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	DNARAFCKRNFGLVSLISKEENTFLWIKQISRT--YGSYIIGMSVLDGSSWMDNSLIG	881	RWRVRYTNWAEDEPFRKLSACVVDVGGKWTAFCTNETMNSVCMQSTDPVPTQSTVFPFVC	1229
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	EDARSFCRNNGLVITGQTERKFWIKQISRG--SENQYIIGMSVLDGSSWMDNSLIG	541	NWLLSYRWATGEPKRNLCVVDVGGKWTAFCTNETMNSVCMQSTDPVPTQSTVFPFVC	890
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	DDARAYCKRNFGLVITGQTERKFWIKQISRG--SENQYIIGMSVLDGSSWMDNSLIG	872	NWRMRYSNWAFGEPFRNNIGCVVDVGGKWTAFCTNETMNSVCMQSTDPVPTQSTVFPFVC	1224
*.....*	*.....*	
<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	-BAFWPQLAYWNTFNAKVVHGTAKRWILRYCTISCHVQCKSTQLNSE-----	172	-----LKYVMGQGLTWEEAQTACRANGDDLASILTQEDYTAFAQS	439
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----LQRWENQPFSSFDKRCVMTYVMGFRTCRGQEEYSICRGRNFPVNTAAPTVP-PL	981	PEETNVEYRFSYTWVYKSNCLVFT--EELWADAASSVCRHGGLASIDGPEHEKFTN	1327
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	YYSWATGEPFNAEDENCVTMINSQFWDINDGYPNNTIQGRHSSINATVMPDMSV	941	PESD-----HTAWIPFGHCYVIESSYTRWQASLECLRMGSSLVIESAESSFLSY	1284
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	FVAWATGEPFNAEDENCVTMINSQFWDINDGYPNNTIQGRHSSINATVMPDMSV	940	PESE-----QTAWIPFGHCYVIESSYTRWQASLECLRMGSSLVIESAESSFLSY	1283
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	YYSWATGEPFNAEDENCVTMINSQFWDINDGYPNNTIQGRHSSINATVMPDMSV	939	PESK-----RTWIPFGHCYVIESSYTRWQASLECLRMGSSLVIESAESSFLSY	944
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	VVAWENNEFNAEDENCVTMINSQFWDINDGYPNNTIQGRHSSINATVMPDMSV	591	PEPIK-----RRTWVPPFGHCYVIESSYTRWQASLECLRMGSSLVIESAESSFLSY	1278
*.....*	*.....*	
<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	-----LKYVMGQGLTWEEAQTACRANGDDLASILTQEDYTAFAQS--IT	214	ITE-----TRQFMWIGLWKTSTRWWSNGDFFPYFC--VSEPLGASNCCSLTLKHWQ	493
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----KGGCLPQWKKFDSMYSIKTQ-----KIRWEDARKCYISIGSLVSIPTRRVQAFILITLA	1037	NLETFKDHTSFWIGLYK--THKGTWKLWLDKSWMETWTLDEPQYD--FGEIGSDT--	1380
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	PSGCKEGWNFYSKCFKIFGPMEEERKQWQEARCAKIGFQGNLVSIQNEKEQAFILITLM	1001	RVEFLKS--KTFWIGLFR--NVEGKWLWLNNSVSVFVWNTGDFSGERNDVVALASS--	1339
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	PGCKEKGWHLKMKCFKIFGPMEEERKQWQEARCAKIGFQGNLVSIQNEKEQAFILITLM	1000	RVEFLKS--KTFWIGLFR--NVEGKWLWLNNSVSVFVWNTGDFSGERNDVVALASS--	1338
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	PGGCSPEWTFQGCYKLFQNK-----HTWHDARNLCSHGNLVSILHEEQAFILITLM	655	NVELMQDGVRSFWIGLFR--SYMGDWVWIDNVAVDYTWRTQVY--NNAHGCVIEQSS--	999
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	KGGCFDWNFFQCKYKFGESQDLKSWQDARSYCNLGNLVSILHEEQAFILITLM	991	NLDILQDGSKAFWIGLYK--THRGDWLWIDNSVVDYSWLVGEPASATNEECVIELSDT--	1334
*.....*	*.....*	
<i>O. mykiss</i> XP_021434209.1	ETRFQFMWIGLWKTSTRWWSNGDFFPYFCVSEPLGLGA-----SNCCS	258	TENVTLKTDLSLRKFLDTGSRKRIKQVMMSLKSNTGGDLNDFVVKQMLEQ--VTVV	551
<i>L. crocea</i> AKH05366.1	*-----ETAAGDTWIGLNSLK--ESGFTYTDGKPRRYTTHGYSKRRHFG--SFYQRWDEDEVV	1092	-----GAWKTGRWHDRAVICTETPKMFGVSDSSESIED-----KDSHRVHTSLVWLV	1431
<i>H. sapiens</i> NP_002429.1	-DSTFSAWTGLNDVNSEHTFLWTDGKQVHTHWGKGFGRKES--SLSYEDADV	1054	-----GFWSNHCSSYKGYICRKPILIDAKFTHELLTTRKMDPKFSSWAGVWII	1396
<i>M. musculus</i> NP_032651.2	-DSTFNAWTGLNDVNSEHTFLWTDGKQVHTHWGKGFGRKES--SLSYEDADV	1053	-----GLWNNHCSSYKGYICRMPKILIDPVTTHSITTRADQRMDPKFSSWAGVWII	1395
<i>D. rerio</i> ACN91267.1	-DSVDDIWIWGFNDVNMERFLWTDGKQVHTHWGKGFGRKES--SLSYEDADV	714	-----GLWNAVNCSSYKGYICRTEKVPVPTKPLVPL-----AVVDAGPHSAGVWII	1049
<i>P. kingsleae</i> XP_023649166.1	-GSSDAWIGLNDVNMERFLWTDGKQVHTHWGKGFGRKES--FMDDDEVDVV	1048	-----GKWNHNCSSYKGYICRMPKILIDPVTTHSITTRADQRMDPKFSSWAGVWII	1383
*.....*	*.....*	

Рисунок 23 - Множественное выравнивание аминокислотной последовательности белка MRC1 большого желтого горбыля с MRC1 других животных. «*» обозначает положение а.о. с полной консервативностью; «:» обозначает а.о. в высококонсервативном положении; «.» обозначает а.о. в низкоконсервативном положении; красным цветом отмечены остатки цистеина; светло-голубым цветом отмечены остатки остатков аспарагиновой кислоты; тёмно-синим цветом отмечены остатки домена распознавания углеводов (CRD)

Второй охарактеризованный нами маннозный рецептор - MRC2 *L. crocea*. Его кДНК (GenBank ID: AKH05367) состоит 3996 п.о., что соответствует 1331 а.о. Его предсказанный молекулярный вес 168.09 кДа, теоретическое значение pI: 5,83. Основные функциональные домены его белковой структуры отличаются от аналогов у *L. crocea* MRC1. Так, MRC2 не имеет богатой цистеиновой области, а его белковая структура содержит домен FNII (Домен фибронектина типа II) (42-90 а.о., 8 доменов CTLD (CTLD1 - 97~222 а.о., CTLD2 - 245~368 а.о., CTLD3 - 383~507 а.о., CTLD4 - 531~666 а.о., CTLD5 - 683~809 а.о., CTLD6 - 830~965 а.о., CTLD7 - 982~1110 а.о., CTLD8 - 116-1247 а.о.,) и трансмембранный домен (1266~1288 а.о.) (рисунок

24 Б). В последовательности MRC2 связующий участок коллагена - домен FNII содержит ароматические 4 остатка фенилаланина и 3 остатка триптофана (рисунок 24 А, В). Область CTLD аминокислотной последовательности MRC2 имеет два CRD домена для узнавания углеводов, один из которых находится в полностью консервативном положении (рисунок 24 А, В, рисунок 25). Кроме того, в аминокислотной последовательности MRC2 были обнаружены два двойных гидрофобных лейцинов (LL) и большое количество а. о. аспарагиновой кислоты (D) в консервативных положениях (рисунок 24 В, рисунок 25). Так же в домене CTLD есть 4 цистеина в полностью консервативных положениях.

Аминокислотные последовательности MRC2 сравнили с некоторыми другими видами животных. В результате множественного выравнивания последовательностей MRC2 рыб и млекопитающих было обнаружено, что у них есть следующие 53 а.о. в полностью консервативных положениях: 15 цистеина, 8 тирозина, 13 аспарагиновой кислоты, 13 глицина, 9 аспарагина, 4 аргинина, 11 фенилаланина, 8 глутамина, 1 аргинина, 5 лизина, 1 метионина, 9 глютаминовой кислоты, 15 лейцина, 3 изолейцина, 2 валина, 8 серина, 8 тирозина, 5 аланина, 10 пролина и 14 триптофана. 63 а.о. в высококонсервативных положениях и ещё 21 а.о. - в низкоконсервативных положениях (рисунок 25).

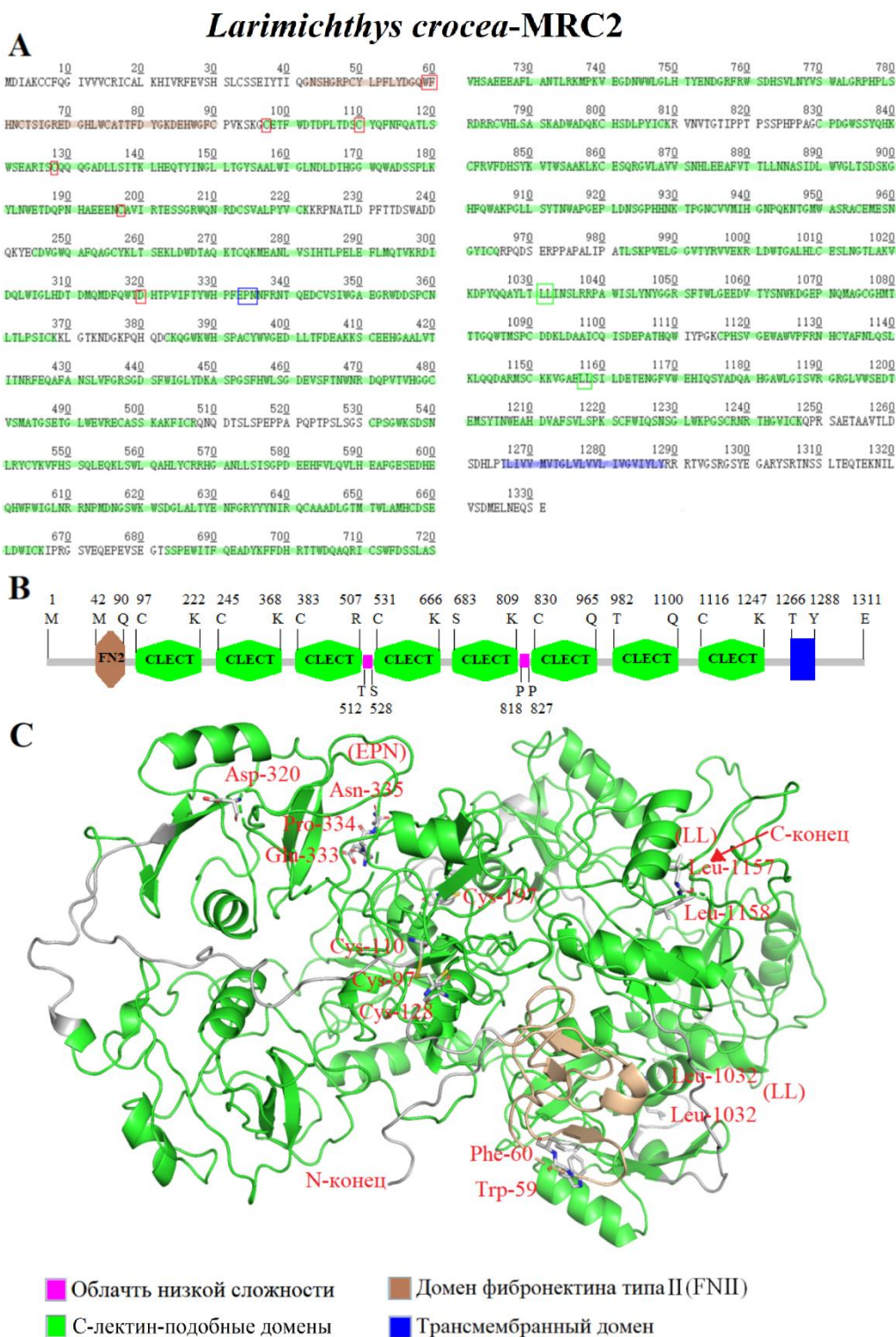


Рисунок 24 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры MRC2 большого желтого горбыля. Аминокислотная последовательность MRC2 (A) и схема расположения доменов в структуре MRC2 (B); В – трехмерная теоретическая модель MRC2 с обозначенными важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены MRC2

(рисунок 26 В, рисунок 27). Также в каждом домене CTLD есть 4 или 5 цистеина в полностью консервативных положениях (рисунок 26 А, рисунок 27).

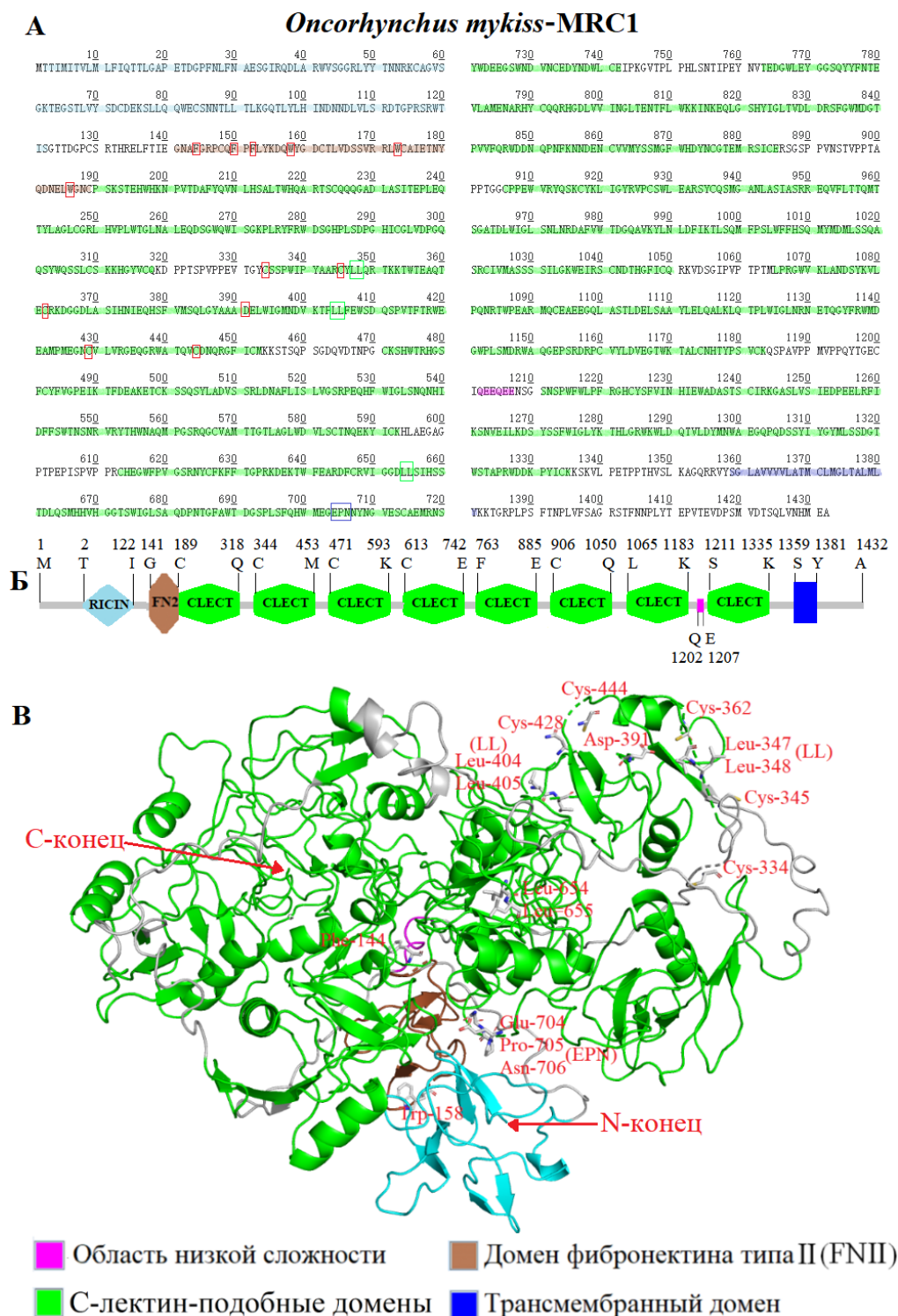


Рисунок 26 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры MRC1 радужной форели. Аминокислотная последовательность MRC1 (А) и схема расположения доменов в структуре MRC1 (Б); Цветом обозначены структурные домены MRC1

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей MRC1 радужной форели с другими видами животных показало, что этот белок имеет 272 а.о. лежащих в полностью консервативных положениях. Это 38 остатков глицина, 12 - аспарагиновой кислоты, 16 - глютаминовой кислоты, 34 остатка триптофана, 10 - пролина, 13 - аланина, 35 - цистеина, 10 - лейцина, 10 - изолейцина, 10 - валина, 9 - серина, 11 - тирозина, 11 - лизина, 12 - треонина, 7 - аргинина, 15 - фенилаланина, 4 - глутамина и 15 - аспарагина. Также 189 аминокислотных остатков в высококонсервативных положениях и 100 - в низкоконсервативных положениях (рисунок 27).

Сравнение аминокислотных последовательностей MRC1 радужной форели с другими видами животных показало, что аминокислотная последовательность MRC1 этого вида рыб имеет идентичность с большим желтым горбылем 46,22%. Идентичность с другими видами - около 44.4 %, т.е. меньше 50%, что указывает на невысокую консервативность этого белка у животных разных классов в целом (таблица 4).

Таблица 4 - Перекрестное сравнение идентичности последовательностей белка MRC1 *O. mykiss* с последовательностями MRC1 других видов

Виды животных	<i>O. mykiss</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. rerio</i>	<i>P. kingsleyae</i>	<i>L. crocea</i>
<i>O. mykiss</i>	-	40.72	40.29	47.01	47.85	46.22
<i>H. sapiens</i>		-	82.06	47,49	51,33	48,95
<i>M. musculus</i>			-	48,22	50,80	49,44
<i>D. rerio</i>				-	60,94	63,36
<i>P. kingsleyae</i>						63,64
<i>L. crocea</i>						-

4464 п.о., что соответствует 1487 а.о. белка. В последовательности *O. mykiss* есть три основных консервативных функциональных домена: фибронектина типа II (с 191 по 239 а.о.), 8 С-лектин-подобных доменов (CTLD1 - 246-371 а.о., CTLD2 - 394-517 а.о., CTLD3 - 532-647 а.о., CTLD4 - 681-817 а.о., CTLD5 - 834-960 а.о., CTLD6 - 981-1118 а.о., CTLD7 - 1135-1253 а.о., CTLD8 - 1270-1403 а.о.) (рисунок 27 Б) и один трансмембранный домен (1422-1441 а.о.). Предсказанный молекулярный вес белка - 168,1 кДа, а теоретическое значение рI - 5,83. В аминокислотной последовательности MRC2 *O. mykiss* в сайте связывания коллагена имеются остатки ароматических аминокислот: 4 фенилаланина и 3 триптофана. С-лектиновая область (CTLD) MRC2 содержит консервативный домен распознавания углеводов (CRD) (EPN - Glu-Pro-Asn). Кроме того, в аминокислотной последовательности MRC2 были обнаружены двойной гидрофобный лейцин (LL) и кислотный аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты в консервативных положениях, также, как и в охарактеризованном нами MRC1 (рисунок 28 А, В, рисунок 29).

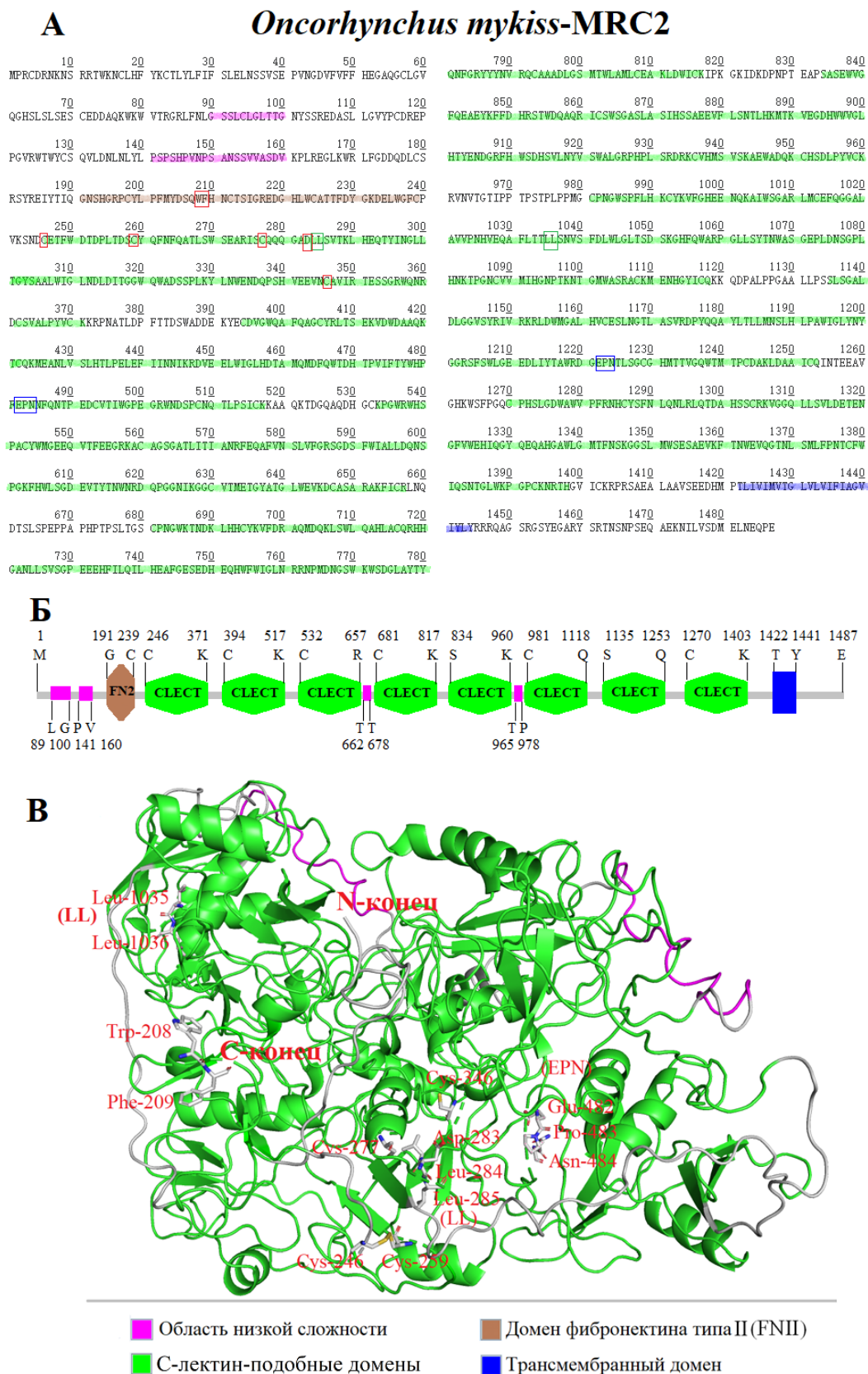


Рисунок 28 - Теоретические модели первичной и пространственной структуры MRC2 радужной форели. Аминокислотная последовательность MRC2 (А) и схема расположения доменов в структуре MRC2 (Б); В – трехмерная теоретическая модель MRC2 с обозначенными важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены MRC2

Oncorhynchus mykiss-MRC2

<i>H. sapiens</i> NP_006030.2	—MGFGFAFAPWFR—HLLRGLVLLGLHLGRFGAALPEFNFVFLFSHGLQ	52	TYINGLLTGYSSFLWIGLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	342
<i>M. musculus</i> NP_032652.3	—MVFIRFALAPWFR—HLLRGLVLLGLGLRGLGHPADS—AAALLEDVFLIFSQQMG	51	TYINGLLTGYSSFLWIGLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	341
<i>D. rerio</i> XP_021327061.1	—HQQHQRERRRRAWISVCR—TLILFLVLSLERSAVCSAHTDGSDDTFAFFHEGAQ	54	IYVNGLLTGYSSATLWMLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	347
★ <i>L. crocea</i> XP_021480466.1	MQGNRHRNRKESRATWNRQLLFLYKTLVLYVFSLELQSSV—TAPLSDDEFAFFHEGAQ	58	TYINGLLTGYSSAALWIGLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	347
<i>M. mykiss</i> XP_021480466.1	—MPCRDNRKNSRRTWK—CLHFFYKTLVLYVFSLELQSSV—SDPVGDVVFVFFHEGAQ	55	TYINGLLTGYSSAALWIGLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	353
<i>E. lucius</i> XP_028979446.2	—MQRCDNRKNSRRTWK—YFFPYKTLVLYVFSLELQSSV—SDPVGDVVFVFFHEGAQ	55	TYINGLLTGYSSAALWIGLNDLITGGQWQWSDNSFLKYLWVESDQDFPNFSENGVIRTES	353
	* : *		* : *	
<i>H. sapiens</i> NP_006030.2	CGLEAAGGQVVRVTPACNTSLPAQRWVWWSRNLFLNLGTMQLGTGWFV—TNTTASLGM	109	SGGQWQRDCSIALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	401
<i>M. musculus</i> NP_032652.3	CGLEAAGGQVVRVTPVNASLPAQRWVWWSRNLFLNLGTMQLGTGWFV—TNTTASLGM	108	SGGQWQRDCSIALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	400
<i>D. rerio</i> XP_021327061.1	CGLGVRDHLVLSLSSCKG—EAQLWVWVTRSRFLNGLSSLLGLGITVGNVSTFGDRSPLGV	112	QGRWQRDCSVALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	407
★ <i>L. crocea</i> XP_021480466.1	CGLGVRDHLVLSLSSCKG—EAQLWVWVTRSRFLNGLSSLLGLGITVGNVSTFGDRSPLGV	116	QGRWQRDCSVALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	407
<i>M. mykiss</i> XP_021480466.1	CGLGVRDHLVLSLSSCKG—EAQLWVWVTRSRFLNGLSSLLGLGITVGNVSTFGDRSPLGV	113	QGRWQRDCSVALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	413
<i>E. lucius</i> XP_028979446.2	CGLGVRDHLVLSLSSCKG—EAQLWVWVTRSRFLNGLSSLLGLGITVGNVSTFGDRSPLGV	113	QGRWQRDCSVALPVVCKKFNATAEPTFPDRWAN—VKVECEPSWQFPFGHCYRLQAEKR	413
	* : *		* : *	
<i>H. sapiens</i> NP_006030.2	YEDREALNLRW—HCRITLGDQLSLLGARTSNI—SKPGLERGDQTRSGQWRIYG	162	SWQESKRA—LRGGDDLVSISMAELEFTITKIQEVEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	461
<i>M. musculus</i> NP_032652.3	YEDREALNLRW—HCRITLGDQLSLLGARTSNI—SKPGLERGDQTRSGQWRIYG	161	SWQESKRA—LRGGDDLVSISMAELEFTITKIQEVEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	460
<i>D. rerio</i> XP_021327061.1	FRDVEFPFRVVTWCSCKFLETLETHLASFKILLNSGHWSTT—ARFPSKLLWVRY—	167	DWDSADRT—QKMEANLVSISHTLFELEFLMVKKIDLEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	467
★ <i>L. crocea</i> XP_021480466.1	YTCDFREPPRVVTVWCSQVLDNLNLYLFSFHSNSSA—SVSIPALKWTLHG	167	DWDSADRT—QKMEANLVSISHTLFELEFLMVKKIDLEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	467
<i>M. mykiss</i> XP_021480466.1	YTCDFREPPRVVTVWCSQVLDNLNLYLFSFHSNSSA—SVSIPALKWTLHG	173	DWDSADRT—QKMEANLVSISHTLFELEFLMVKKIDLEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	473
<i>E. lucius</i> XP_028979446.2	YTCDFREPPRVVTVWCSQVLDNLNLYLFSFHSNSSA—SVSIPALKWTLHG	173	DWDSADRT—QKMEANLVSISHTLFELEFLMVKKIDLEELWIGLNDLITAMQMFQWTDHPTV	473
	* : *		* : *	
<i>H. sapiens</i> NP_006030.2	SEEDLALPHEVYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	222	SFTHWHP—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	521
<i>M. musculus</i> NP_032652.3	SEEDLALPHEVYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	221	SFTHWHP—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	520
<i>D. rerio</i> XP_021327061.1	DNQDLAKSYRELYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	227	IFTYWHF—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	526
★ <i>L. crocea</i> XP_021480466.1	GVQDLCKSTYRELYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	227	IFTYWHF—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	526
<i>M. mykiss</i> XP_021480466.1	DDQDLCKSTYRELYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	233	IFTYWHF—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	490
<i>E. lucius</i> XP_028979446.2	DDQDLCKSTYRELYTIQGNHSGKPCITIFFKIDNQWPHGCTSTGREGLHW—CATTIYVYGD	233	IFTYWHF—EPNFRDSDLEDCVTIWGPBGRWNSDFCNQSLPISICKKAGRLSQGAAREDHGC	521
	* : *		* : *	
<i>H. sapiens</i> NP_006030.2	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	282	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	282
<i>M. musculus</i> NP_032652.3	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	281	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	281
<i>D. rerio</i> XP_021327061.1	QRWGF—PIKSNDCETFW—INSIDMNYQFNQATLSWSEARIS—EQGGADL—SITLHEQ	287	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	287
★ <i>L. crocea</i> XP_021480466.1	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	287	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	287
<i>M. mykiss</i> XP_021480466.1	ELWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	293	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	293
<i>E. lucius</i> XP_028979446.2	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	293	ERWGF—PIKSNDCETFW—KDQLTDS—CYQFNQSTLSWRWAS—EQGGADL—SITLHEQ	293
	* : *		* : *	

Рисунок 29 - Множественное выравнивание последовательностей MRC2 радужной форели с другими животными. «*» обозначает положение а.о. с полной консервативностью. «:» обозначает а.о. в высококонсервативном положении; «.» обозначает а.о. в низкоконсервативном положении; красным цветом отмечены остатки цистеина; светло-голубым цветом отмечены остатки аспарагиновой кислоты; тёмно-синим цветом отмечены остатки консервативного домена распознавания углеводов; зеленым цветом отмечены остатки двойных гидрофобных лейцинов (LL)

Сопоставление аминокислотных последовательностей MRC2 радужной форели с маннозными рецепторами других видов животных показало, что в последовательности белка MRC2 есть 210 остатков аминокислот в полностью консервативных положениях: 20 триптофана, 20 цистеина, 20 лейцина, 12 фенилаланина, 20 глицина, 8 глутамина, 13 тирозина, 11 аспарагина, 7 серина, 16 аспарагиновой кислоты, 11 пролина, 8 лизина, 10 глутаминовой кислоты, 3 валина, 4 изолейцина, 11 треонина, 5 аргинина, 4 аланина, 6 гистидина, 1 метионина. 79 а.о. в высококонсервативных положениях и ещё 27 а.о. в низкоконсервативных положениях (рисунок 28 В). При сравнении аминокислотных последовательностей MRC2 *O. mykiss* с другими видами животных, было показано, что аминокислотная

последовательность MRC2 *O. mykiss* имеет наивысшую идентичность с большим желтым горбылем (на 82,54%), идентичность с другими видами тоже больше 50 %, что указывает на высокую консервативность этого белка у животных разных классов в целом (таблица 5).

Чтобы оценить схожесть структур исследованных маннозных рецепторов у обоих видов рыб, было проведено выравнивание их аминокислотных последовательностей между собой (рисунок 29), которое показало, что в последовательности белка MRC1 и MRC1 есть 272 остатков аминокислот в полностью консервативных положениях: 44 цистеина, 8 глютаминовых кислот, 9 тирозинов, 10 изолейцинов, 45 триптофанов, 6 глютаминов, 30 лейцинов, 13 аланинов, 27 глицинов, 10 серинов, 16 пролинов, 11 треонинов, 10 аспарагинов и 5 лизинов, 14 фенилаланинов, 2 гистидина, 2 аргинина, 6 валинов, 2 аспарагина и 2 метионина. 214 а.о. в высококонсервативных положениях и ещё 134 а.о. в низкоконсервативных положениях (рисунок 30).

Таблица 5 - Идентичность последовательности белка MRC2 радужной форели с последовательностями других видов

Виды животных	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. rerio</i>	<i>L. crocea</i>	<i>O. mykiss</i>	<i>E. lucius</i>
<i>H. sapiens</i>	-	90,93	50,58	52,06	56,54	53,68
<i>M. musculus</i>		-	50,14	51,38	56,12	52,86
<i>D. rerio</i>			-	62,81	66,74	64,53
<i>L. crocea</i>				-	82,54	76,75
<i>O. mykiss</i>					-	88,57
<i>E. lucius</i>						-

являются членами суперсемейства лектинов С-типа. Лектин С-типа — это один из классов лектинов со специфическим углевод-связывающим белковым доменом [198]. Особенностью лектинов этого класса связано с их потребностью в кальции для связывания с лигандом [199]. Белки, содержащие лектиновые домены С-типа, выполняют широкий спектр функций, включая клеточную адгезию, иммунный ответ на патогены и апоптоз [200].

Проанализировав аминокислотную последовательность MRC1 *L. crocea* при сравнении с MRC1 других видов, мы выяснили, что она имеет высококонсервативную структуру CLTD. Вероятно, MRC1 *L. crocea* может вызывать кальций-зависимую гемагглютинацию подобно тому, как это могут делать другие лектины.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей MRC1 и MRC2 *L. crocea* и *O. mykiss* показало, что они имеют множество аминокислотных остатков в полностью консервативных положениях. Особенно схожи аминокислотные последовательности MRC2 обоих видов (рис 30). Также показана высокая идентичность последовательностей MRC1 и MRC2 с этими же белками других видов. А идентичность MRC2 с другими видами явилась наиболее высокой (Таблица 4, 5).

У всех исследованных последовательностей MRC есть общий важный структурных домен – 8 CTLD, также все есть трансмембранный домен. В этом домене у белка MRC1 *L. crocea* и *O. mykiss* имеется богатый цистеином регион (CR), в отличие от остальных двух исследованных белков. Благодаря этим структурным особенностям домен CR связан с процессом распознавания и связывания углеводов [76]. Также в MRC1 *O. mykiss*, и MRC2 *L. crocea* и *O. mykiss* есть FNII домен. Этот домен является наиболее консервативным доменом в семействе MRC. Он обладает функцией связывания коллагена. MRC1 и MRC2 имеют некоторые структурные различия. Это можно увидеть из схемы структуры белка. Например, у MRC2 отсутствует N-концевой участок, богатый цистеином, а имеется только

участок фибронектина FNII и 8 лектин-подобных участков CTLD и цитоплазматических доменов. Стоит отметить, что оба маннозных рецептора имеют схожие домены, но играют в клетках разные роли [201]. MRC1 в основном участвует во врожденном иммунном ответе, а MRC2 также участвует в иммунном ответе, но согласно данным и предположениям этого исследования, его основная функция может заключаться, в основном, в опосредованной деградации лизосомного коллагена [201].

В последовательностях MRC1 и MRC2 *O. mykiss* и *L. crocea* есть похожие функциональные остатки аминокислот. Так, в обоих белках есть кислотный аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты в консервативном положении. При интернализации лиганда и миграции ранних эндосом в клетке играет роль именно этот остаток, без которого этот функциональный сайт молекулы инертен [76]. Кроме того, у *O. mykiss* и *L. crocea* MRC1 и MRC2 были обнаружены спаренные гидрофобные остатки лейцина (LL) и аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты в консервативном положении, необходимый для интернализации лиганда. Для функционирования MRC1 и MRC2 при миграции ранних эндосом внутри клетки необходимы два вышеуказанных функциональных сайта [76]. Присутствие триптофанов (рисунок 22 А, рисунок 24 А, рисунок 26 А, рисунок 28 А) в сайте связывания коллагена белков MRC1 и MRC2 *L. crocea* и *O. mykiss* является критическим фактором, обуславливающим их способность связывать коллаген [76, 202]. В отличие от MRC1 *L. crocea*, в структуре MRC1 *O. mykiss* и MRC2 *O. mykiss* и *L. crocea* в сайте связывания коллагена присутствует фенилаланин. Область CTLD аминокислотных последовательностей MRC1 и MRC2 имеет консервативный домен распознавания углеводов (CRD) (EPN Glu-Pro-Asn) [201, 203], который специфически связывается с маннозой [204].

Полученные результаты показывают, что сходство последовательностей MRC2 радужной форели и большого желтого горбыля является относительно высоким, а функциональные аминокислотные остатки относительно схожи,

поэтому можно сделать вывод, что биологические функции двух белков относительно схожи.

Что касается взаимосвязи между структурой и функцией MRC, по имеющимся литературным данным она была выяснена только у млекопитающих. Для рыб эти исследования отсутствуют. MRC может специфически связываться с множеством эндогенных и экзогенных лигандов через свои внеклеточные комплексные домены, поэтому он эффективен в распознавании патогенов, опухолей и стабильности внутренней среды. Он играет важную роль в процессе иммунитета. В то же время он выполняет функции очистки эндогенных белков и интернализации маннозилированных антигенов, поэтому MRC играет важную роль в усилении презентации антигена и опосредовании фагоцитоза. Следовательно, оба MRC играют важную роль в иммунном ответе на распознавание патогенов.

3.2 Особенности экспрессии генов иммунных белков

большого желтого горбыля *L. crocea*

3.2.1 Распределение уровней мРНК хемокинов

CCL2, CCL3, CCL4 в норме

Предварительная оценка уровней экспрессии генов хемокинов была проведена для понимания общих нормальных (фоновых) уровней экспрессии хемокинов в различных органах и тканях большого желтого горбыля.

Экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 была обнаружена во всех восьми проанализированных тканях органов: печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах перед заражением *Vibrio anguillarum*. Экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 в органах печени, почек и селезенки была значительно выше, чем в других органах (рисунок 31 А, Б, В).

Согласно литературным данным на примере *Rachycentron canadum* [205], *Miichthys miiuy* [206] и *Ictalurus punctatus* [207] по тканеспецифической экспрессии хемокинов показано, что у них гены хемокинов экспрессируются в восьми тканях, включая печень, почки, селезенку, жабры, мышцы, сердце,

мозг и кишечник. В этом эксперименте CCL2, CCL3 и CCL4 *L. crocea* также были обнаружены в печени, почках, селезенке, сердце, мышцах, кишечнике, мозге и жабрах. Эти исследования показали, что большинство хемокинов рыб экспрессируются в широком спектре тканей в организме рыб. Результаты исследований указывают на то, что хемокины рыб не только играют важную роль в процессах, связанных с иммунитетом, но также могут участвовать в других физиологических процессах в организме.

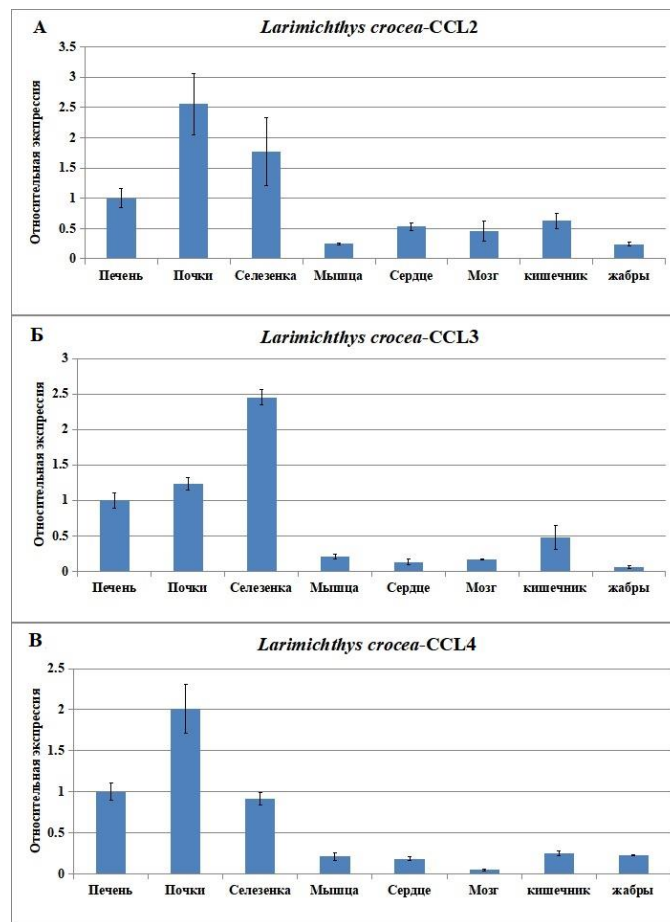


Рисунок 31 - Распределение уровней экспрессии мРНК CCL2 (А), CCL3 (Б) и CCL4 (В) перед заражением большого желтого горбыля *V. anguillarum* в печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах, полученное методом ПЦР в реальном времени. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по пяти техническим повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

Распределение хемокинов в разных тканях в норме различно. Однако большинство хемокинов в основном экспрессируются в тканях, связанных с иммунитетом (печень, почки и селезенка) [208]. То же самое наблюдали и

для CCL2, CCL3 и CCL4 в органах у большого желтого горбыля в этом эксперименте. Поскольку в печени, почках и селезенке рыб содержится большое количество иммунных клеток, таких как макрофаги и лимфоциты, экспрессия хемокинов в печени, почках и селезенке ожидаемо высока.

3.2.2 Анализ уровней мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 в модели вибриоза

Для выяснения распространения воспаления среди разных органов и тканей в динамике на примере иммунных белков хемокинов была построена модель вибриоза у промыслового вида Китая – большого желтого горбыля с помощью патогенной бактерии *V. anguillarum*. В качестве контроля наличия воспаления был введен Poly I:C, вызывающий неспецифическое воспаление.

Во время вскрытия рыб в конечных точках эксперимента была проведена морфологическая оценка их состояния в сравнении с контролем. После заражения *V. anguillarum* поверхность тела *L. crocea* была красного оттенка, особенно плавники. Внутренние ткани рыбы значительно увеличены, а печень увеличилась в 1,5-2 раза, чем печень здоровой рыбы. Жабры были белыми с признаками тканевой деградации, напротив, у рыбы в контрольной группе наблюдали нормальные жабры красного цвета. Селезенка увеличена и темно-красного цвета в отличие от контрольной селезенки ярко-красного цвета. Почка темно-красного цвета, закупорена и изъязвлена. На поверхности кишечника много слизи, а цвет изменился, в сравнении с контролем, с обычного коричневого на черный. Небольшое количество чешуи *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* начало гнить.

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии CCL2, CCL3 и CCL4 в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рисунок 32).

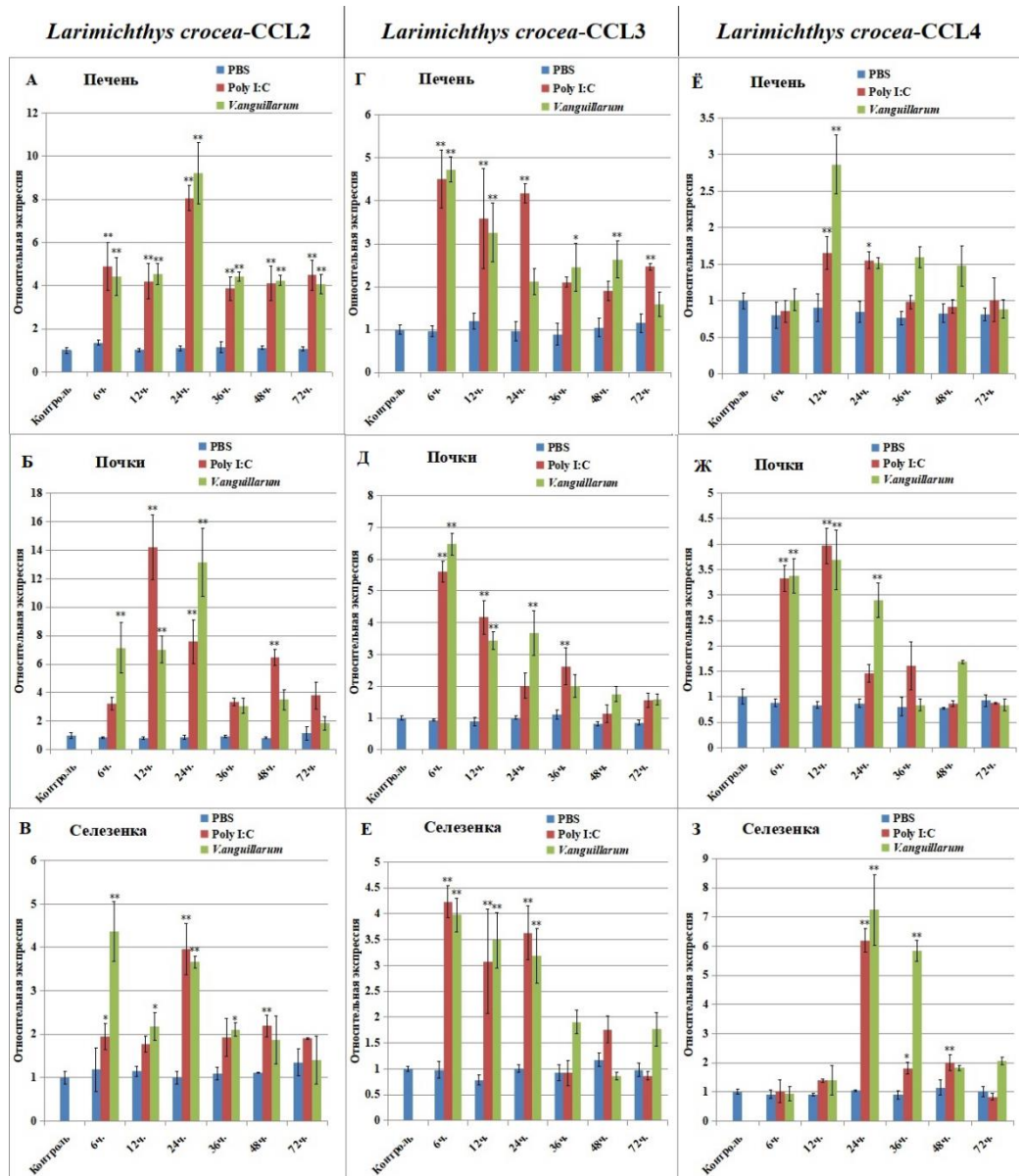


Рисунок 32 - Результаты ПЦР в реальном времени экспрессии в динамике хемокинов большого желтого горбыля в печени, почках и селезенке после введения PBS (отрицательный контроль), Poly I:C (положительный контроль наличия воспаления) и *V. anguillarum*. А, Б, В – CCL2; Г, Д, Е - CCL3; Ё, Ж, З - CCL4 в печени, почках, селезенке после заражения *V. anguillarum*, Poly I: C и PBS. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$. ** при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

В результате проведения ПЦР в реальном времени исследованных органов (печень, почки, селезенка) в различных временных точках, было обнаружено, что острая фаза воспаления была уже спустя 6 часов после начала эксперимента: экспрессия всех трех хемокинов была существенно

повышена по сравнению с контролем. Исключением оказался CCL4: накопление продуктов экспрессии его гена в селезенке достигла своего максимума только спустя 12-24 часа, что, видимо, связано с особенностями экспрессии этого хемокина при системном воспалении. Спустя 36 часов и до конца эксперимента наблюдалось общее снижение уровней мРНК хемокинов и стабилизация степени их экспрессии практически на одном уровне. Что касается введённого неспецифического агента Poly I:C, то здесь наблюдалась та же тенденция, но с разными относительными величинами.

В этом исследовании после искусственного заражения бактерией *V. anguillarum* в органах *L. crocea* мы обнаружили, что экспрессия мРНК генов CCL2, CCL3 и CCL4 была тесно связана с процессом заражения патогеном, что позволяет утверждать, что эти хемокины участвуют в иммунитете рыб против бактериальной инфекции, что согласуется с общемировой литературой. Также результаты показывают, что иммунологические эффекты CCL у *L. crocea* слабее, чем у других рыб, что может быть механизмом пониженной устойчивости к инфекциям у *L. crocea* [82].

Эти результаты показали, что хемокины CCL2, CCL3, CCL4 оказывают сильное регулирующее действие на воспалительный ответ. Как было показано нами ранее, другая группа хемокинов CCL17, CCL21 и CCL24 экспрессируется в тех же органах иначе. Их экспрессия слабее, чем у CCL2, CCL3 и CCL4, что связано с их функциями. Они являются провоспалительными хемокинами, а их рецепторами являются CCR1, CCR2 и CCR5, соответственно [66, 209]. Организм выполняет функцию презентации антигена, и он легко накапливается в очаге воспаления и поглощает антиген, который играет роль в воспалительной реакции и сопротивляется инфекции патогена в патологическом процессе [210]. И CCL17, CCL21 и CCL24 считаются двойными хемокинами, а также гомеостатическими хемокинами. Например, изменения экспрессии CCL21 в печени, почках и селезенке после заражения *V. anguillarum* не очевидны. На основании этого предполагается, что это связано с его гомеостатическим

эффектом. Из приведенного выше анализа можно сделать вывод, что не все хемокины у *L. crocea* могут играть воспалительную роль в отношении вибриоза, и не все хемокины обладают функцией подавления бактериальных инфекций, а также, вероятно, могут усугублять бактериальные инфекции [82], но, конечно, это еще нужно проверить с помощью конкретных экспериментов.

Основываясь на приведенных выше результатах, мы пришли к выводу, что уровни экспрессии в печени, почках и селезенке в органе *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* были значительно увеличены, что указывает на то, что ген хемокина оказывает регулирующее влияние на вибриоз желтого горбыля. Полученные результаты и дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать разработке генно-направленных вакцин в качестве теоретической основы для их последующей апробации.

3.2.3 Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в норме

В результате электрофореза для проверки праймеров при различных отжигах для MRC1 и MRC2 *L. crocea* было показано, что размеры ПЦР-продуктов согласуются: были получены фрагменты размером MRC1 - 230 п.о. Размер ПЦР продукта MRC2 - 180 п.о. (рисунок 33).

Предварительная оценка уровней экспрессии генов маннозных рецепторов была проведена для понимания общих нормальных (фоновых) уровней экспрессии маннозных рецепторов в печени, почках и селезенке большого желтого горбыля.

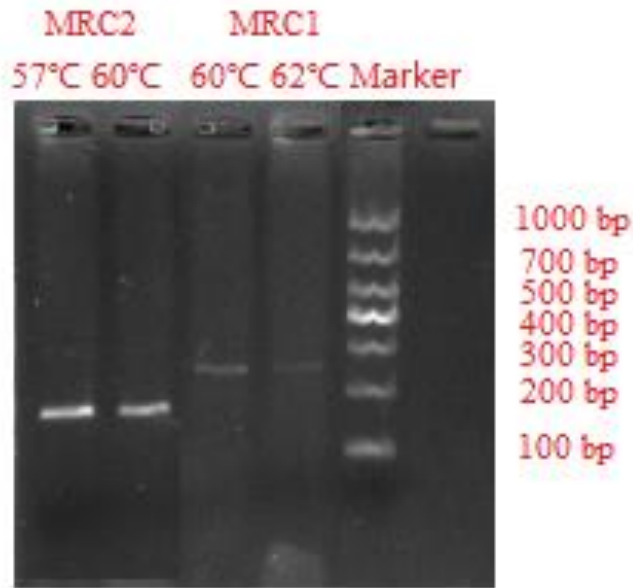


Рисунок 33 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров для MRC1 и MRC2 большого желтого горбыля с различными температурами их отжига

Экспрессия мРНК MRC1 и MRC2 была обнаружена во трех проанализированных органах: печени, почках и селезенке перед заражением *V. anguillarum*. Экспрессия мРНК MRC1 и MRC2 в органах печени, почек и селезенки были значительно выше, чем в нормальных органах (рисунок 34 А, Б).

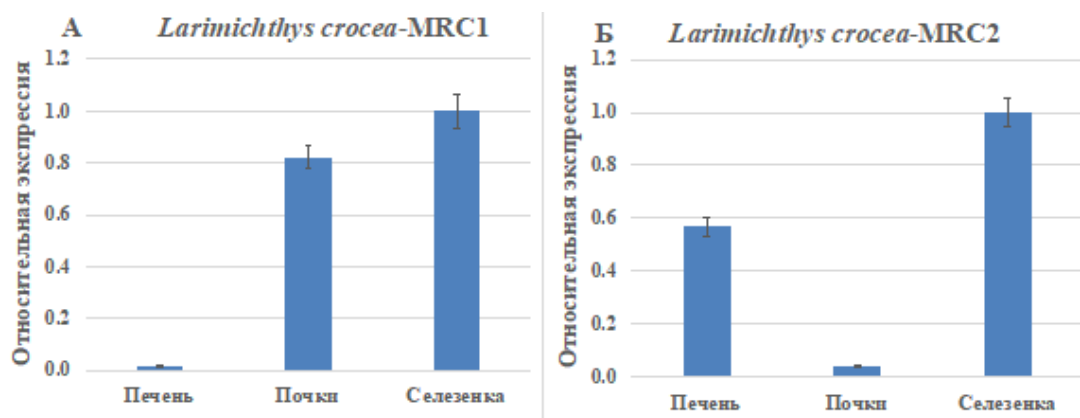


Рисунок 34 - Результат RT-PCR экспрессии мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) перед заражением *V. anguillarum* в печени, почках, селезенке у большого желтого горбыля. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; n = 3 / группа / период времени

В литературе уже описаны исследования, где показано, что печень, почки и селезенка - основное место экспрессии этих рецепторов. Маннозные рецепторы рыб широко экспрессируются во многих органах, особенно в печени, почках и селезенке, и играют важную роль в бактериальном иммунном ответе [211].

Результат показал, что в разных органах уровни экспрессии тоже разные. Уровень экспрессии MRC1 в селезенке самая высокая, за ней следует относительно высокая экспрессия в почках и печени (рисунок 34). Экспрессия мРНК MRC2 является самой высокой в селезенке, за ней следуют печень и почки (рисунок 34). В результате показано, что для разных генов максимальные значения экспрессии появляются в разных органах, так как это зависит не только от иммунитета ткани, но и от основных биологических функций генов.

3.2.4 Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 в модели вибриоза

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии MRC1 и MRC2 в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рисунок 35 А, Б, В, Г, Д, Е). В результате проведения ПЦР в реальном времени исследованных органов (печень, почки, селезенка) для мРНК MRC1 в различных временных точках, было обнаружено, что острая фаза воспаления была спустя 24-36 часов после начала эксперимента: экспрессия обоих маннозных рецепторов была существенно повышена по сравнению с контролем, через 24-36 часов относительная экспрессия достигла максимальных значений (рисунок 35 А, Б, В). Но уровни экспрессий мРНК MRC2 разнятся с мРНК MRC1: накопление продуктов экспрессии MRC2 происходит только спустя 24-36 часов после заражения (рисунок 35 Г, Д, Е), а MRC1 экспрессировался уже спустя 6 часов во всех исследованных органах (рисунок 35 А, Б, В). Очевидно, это связано с особенностями экспрессии этого рецептора при системном воспалении. Во временно промежутке между 36 и 48 часами и до конца эксперимента наблюдалось общее снижение

уровней мРНК маннозных рецепторов (рисунок 35 А, Б, В, Г, Д, Е). Что касается введённого неспецифического агента Poly I:C, для мРНК MRC1 спустя 12 часов в трех органах относительная экспрессия достигла максимальных значений, а для для мРНК MRC2, также, как и после заражения *V. anguillarum* - спустя 6 часов в трех органах наблюдалась острая фаза воспаления: экспрессия обоих маннозных рецепторов была существенно повышена по сравнению с контролем (рисунок 35 Г, Д, Е).

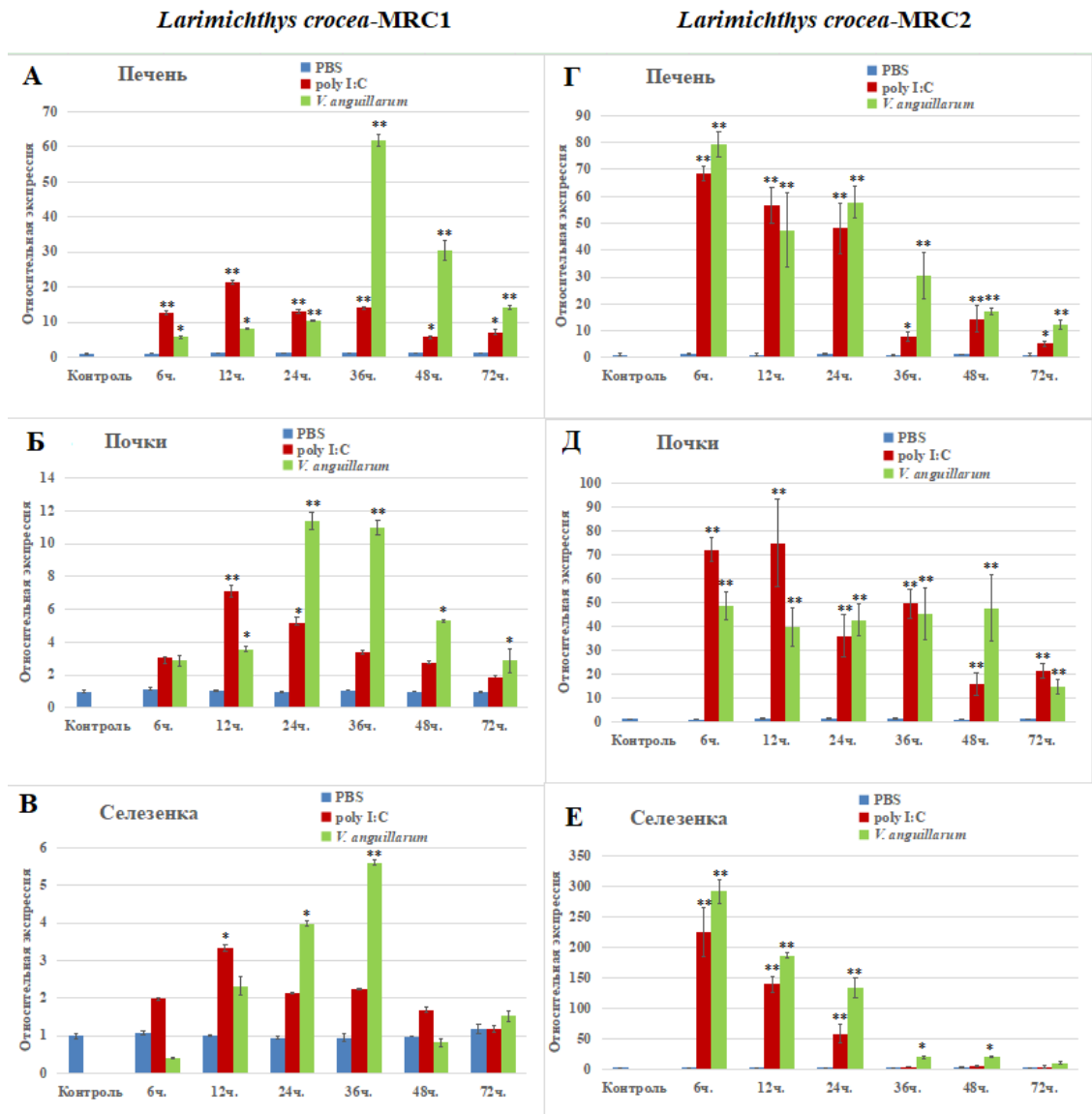


Рисунок 35 - Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у большого желтого горбыля в печени, почках и селезенке после заражения *V. anguillarum*, Poly I: C и PBS. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$. ** при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

В этом исследовании после искусственного заражения бактерией *V. anguillarum* в органах *L. crocea* мы обнаружили, что экспрессия мРНК генов MRC1 и MRC2 была тесно связана с процессом заражения патогеном, что позволяет утверждать, что эти маннозные рецепторы участвуют в иммунитете рыб против бактериальной инфекции, что согласуется с общемировой литературой [67, 68].

Таким образом, можно сделать вывод, что мРНК MRC1 и MRC2 *L. crocea*, в основном, экспрессируются в печени, почках и селезенке, а их уровни экспрессии в этих органах различаются, а уровни экспрессии MRC1 и MRC2 в одной и том же органе также значительно различаются.

Основываясь на приведенных выше результатах, мы пришли к выводу, что уровни экспрессии в печени, почках и селезенке в органах *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* были значительно увеличены, что указывает на то, что гены маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 оказывают регулирующее влияние на вибриоз желтого горбыля. Этот результат может иметь значение для изучения генов MRC и их экспрессии в большом желтом горбыле, для понимания механизма противoinфекционного иммунного ответа рыб и для контроля болезни большого желтого горбыля.

Проведенный анализ экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 в печени, почках и селезенке у *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* показал, что паттерн экспрессии MRC1 отличается от паттерна экспрессии MRC2. Для мРНК MRC1 относительная экспрессия в печени, почках и селезенке сначала медленно увеличивалась в течение 24 часа и 48 часов, изменение относительной экспрессии достигло максимального значения, а затем медленно снижалась. Но для мРНК MRC2 относительное изменение экспрессии в печени, почках и селезенке в 6 часов уже сразу достигло максимального значения, а затем постепенно снижалось до конечной точки эксперимента. Это также указывает на то, что основные функции MRC1 и MRC2 могут быть разными, на что также указывают литературные данные [212, 213].

3.3 Особенности экспрессии генов иммунных белков радужной форели *O. mykiss*

Для верификации праймеров и оптимизации условий реакции были предварительно проведены несколько пробных ПЦР. Электрофорез ПЦР-продуктов *O. mykiss* показал, что теоретический размер фрагментов совпадал с теоретически рассчитанным для праймеров MRC1 и MRC2. Теоретически рассчитанные размеры синтезированного фрагмента: MRC1 - 303 п.о., MRC2 - 328 п.о. (рисунок 36).

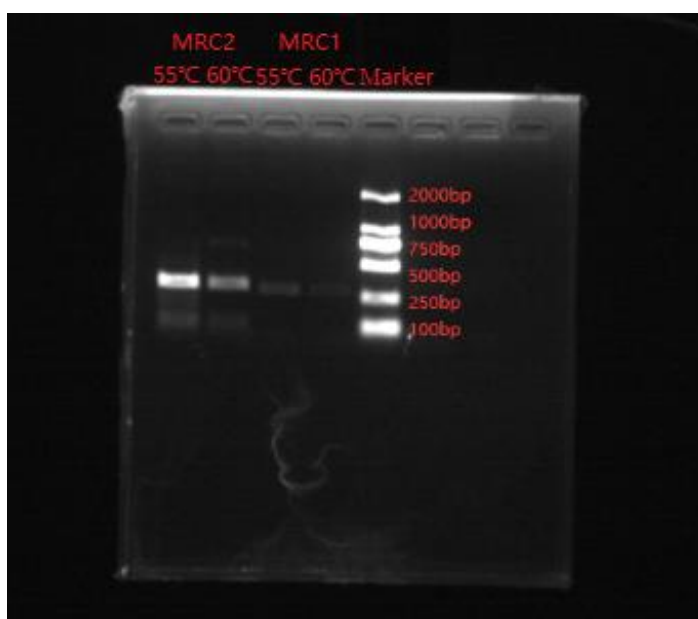


Рисунок 36 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров для MRC1 и MRC2 радужной форели с различными температурами их отжига

3.3.1 Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в норме

Предварительная оценка уровней экспрессии генов маннозных рецепторов была проведена для понимания общих нормальных (фоновых) уровней экспрессии маннозных рецепторов в печени, почках и селезенке радужной форели. Экспрессия мРНК MRC1 и MRC2 была обнаружена во всех трех проанализированных органах: печени, почках и селезенке перед заражением *Aeromonas salmonicida* ssp. Экспрессия мРНК MRC1 самой

высокой была в селезенке, а экспрессия мРНК MRC2 - в печени (рисунок 37 А, Б).

мРНК MRC рыб широко экспрессируется во многих органах, особенно в почках и селезенке, и играет важную роль в бактериальном иммунном ответе [193].

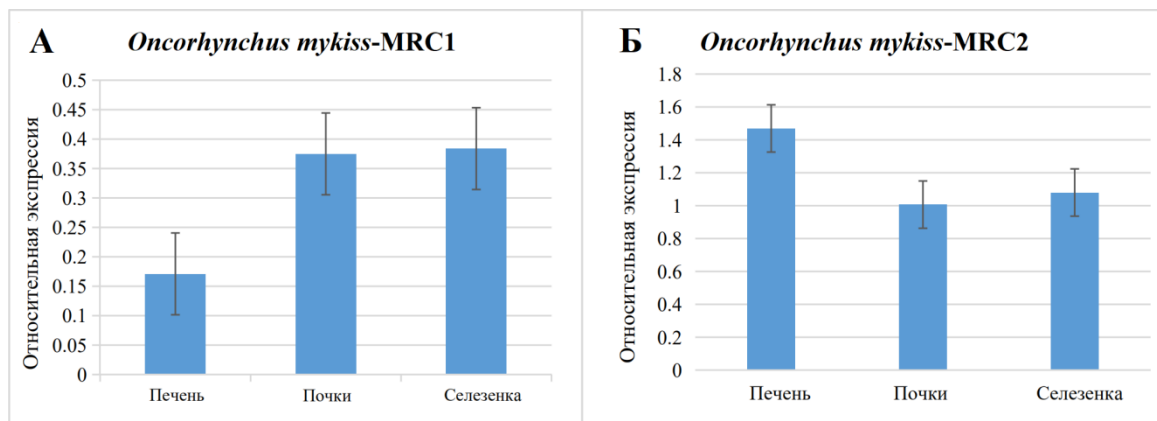


Рисунок 37 - Экспрессия мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) в печени, почках и селезенке у здоровых особей радужной форели. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

3.3.2 Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 в модели аэромоноза

Для выяснения распространения воспаления среди разных органов и тканей в динамике на примере иммунных белков маннозных рецепторов была построена модель аэромоноза у радужной форели, с помощью патогенной бактерии *A. salmonicida* ssp.

Во время вскрытия рыб в конечных точках эксперимента была проведена морфологическая оценка их состояния в сравнении с контролем. После заражения *A. salmonicida* ssp. Патолого-анатомический анализ не выявил внешних изменений в организме *O. mykiss*, но при вскрытии было установлено, что объем печени у зараженных рыб был больше, чем у здоровой рыбы.

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии MRC1 и MRC2 *O. mykiss* в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рис 38. А, Б, В, Г, Д, Е). Экспрессия MRC1 в почках и селезенке (рис 38. Б, В), а также MRC2 в печени и селезенке, показала (рис 38. Г, Е), что острая фаза

воспаления наступала спустя 24-36 часов после начала эксперимента: экспрессия маннозных рецепторов была существенно повышена по сравнению с контролем (рис 38. Б, В, Г, Е).

Спустя 24 часа от начала заражения наблюдалась временное повышение экспрессии MRC1 в почках (рис 38. Б), в то время как в печени его экспрессия снизилась (рис 38. А).

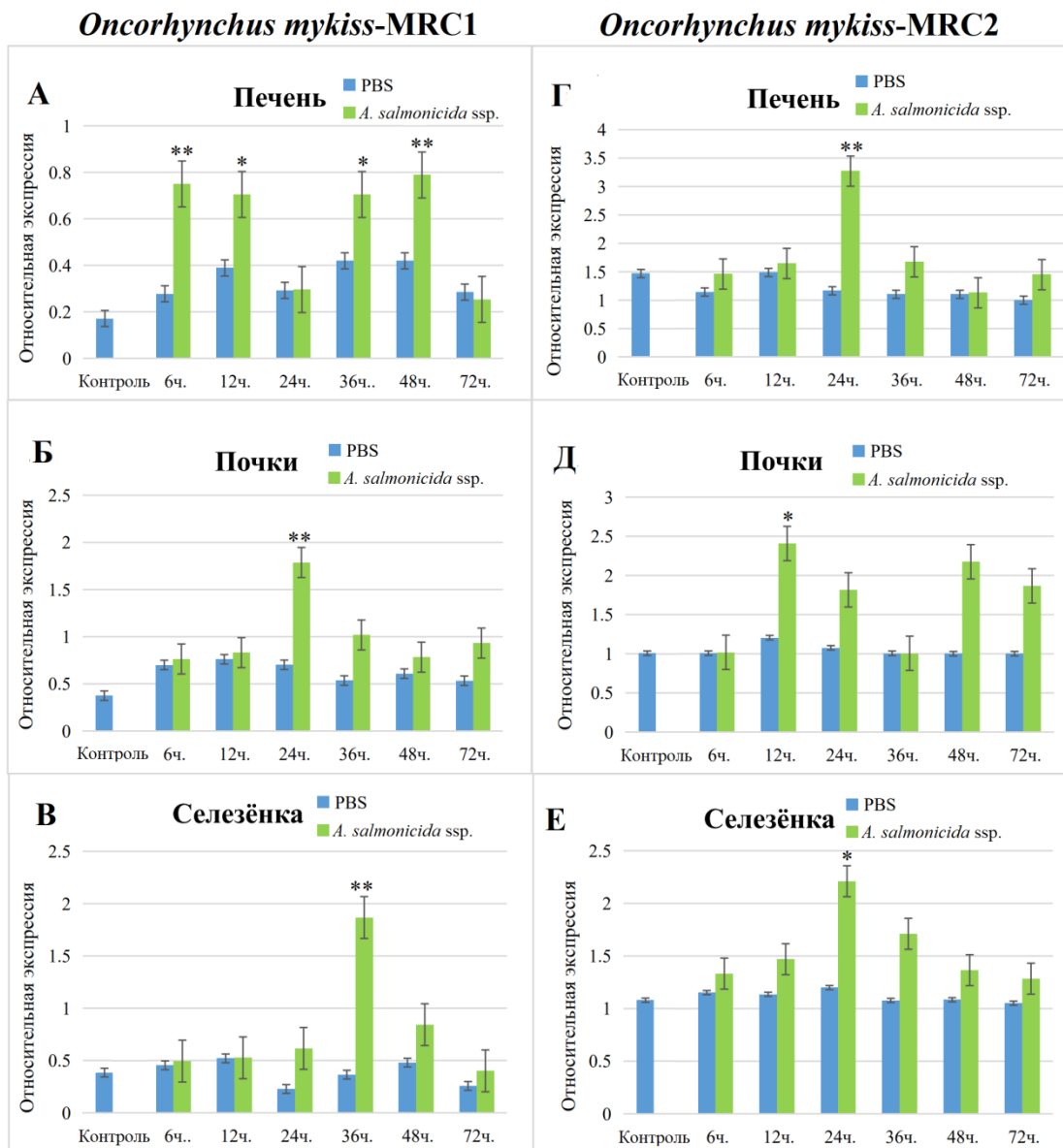


Рисунок 38 - Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у радужной форели в печени, почках и селезенке после заражения *A. salmonicida* ssp. и PBS. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$, “**” при $p < 0,01$; n = 3 / группа / период времени

После этой переломной точки в экспрессии наблюдалась вторая волна экспрессии MRC1 в печени в точках 36ч и 48ч (рис 37. А). Этот феномен требует дополнительных экспериментов и подтверждений перед достоверными выводами и предположениями.

В литературе различными исследователями были показаны некоторые факты, подтверждающие наши исследования. Так, mRNA MRC синтезируется в 11 тканях и органах лептобарбуса торпедовидного (*Leptobarbus hoevenii*), таких как селезенка, почки, сердце, мозг, кожа, мышцы, жабры, печень, кишечник, среди которых экспрессия наиболее высока в селезенке. После заражения *Flavobacterium* лептобарбуса торпедовидного относительная экспрессия генов MRC в селезенке, кишечнике, почках и жабрах значительно увеличивается [214]. В другом исследовании при изучении черного амурского леща (*Megalobrama amblycephala*) наблюдалась экспрессия MRC у здоровых особей в печени, селезенке, почках, сердце, жабрах, мозге, мышцах, кишечнике и крови, с наибольшей экспрессией в головных почках, а после заражения *Aeromonas hydrophila* уровень экспрессии MRC в печени, селезенке, головной почке и кишечнике повышался, но при этом экспрессия MRC в печени снижалась [211, 215]. Известны и другие исследования - на данио рерио (*Danio rerio*), зараженных *Aeromonas sobria* [101], карасе (*Carassius auratus var. Qihe*) и косатке-скрипуне (*Tachysurus fulvidraco*), зараженных *A. hydrophila*. Их MRC также широко экспрессируются в здоровых тканях и органах. Результаты исследований на различных видах рыб согласуются с нашими данными в исследовании MRC1 и MRC2 радужной форели [216].

В результате проделанной работы по изучению уровней экспрессии маннозных рецепторов у радужной форели и большого желтого горбыля можно заключить, что уровни их экспрессии не были одинаковы до и после заражения. Это исследование показывает, что накопление мРНК при заражении осуществляется в одних и тех же органах. Важно, что относительные уровни экспрессии генов в печени после заражения *V.*

anguillarum у большого желтого горбыля в 60 (MRC1) (рисунок 35 А) и 70 раз (MRC2) (рисунок 35 Г) выше, чему контрольной группы, и даже относительные уровни экспрессии мРНК MRC2 в селезенке после заражения *V. anguillarum* в 250 раз больше (рисунок 34 В), чем в контрольной группе. С другой стороны, в печени радужной форели после заражения *A. salmonicida* ssp. относительная экспрессия мРНК MRC1 (рисунок 38 А) и MRC2 (рисунок 38 Г) была всего в 4 и 2 раза выше, чем у контрольной группы. Это показывает, что, хотя мРНК MRC1 и MRC2 широко экспрессируются в тканях большого желтого горбыля и радужной форели, их специфическая экспрессия отличается, что связано с температурой, размером рыбы и типом инфицирующих бактерий, а также с иммунным статусом культивируемых рыб.

Проанализированный иммунный ответ генов хемокинов большого желтого горбыля и маннозных рецепторов радужной форели в моделях вибриоза и аэромороза, соответственно, дополнит имеющиеся знания о развитии заболеваний промысловых и аквакультурных видов рыб в динамике и поможет осуществить дальнейшие исследования в области их иммунитета и механизмов общей иммунной регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Впервые построены *in silico* теоретические пространственные структуры белков-хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры Китая (большой желтый горбыль *L. crocea*) и России (радужная форель *O. mykiss*), на основании которых установлены структурно-функциональные взаимосвязи этих белков иммунного ответа.
2. Установлена высокая степень идентичности первичных и третичных структур маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у большого желтого горбыля и радужной форели, достигающая 84%, что подтверждает высокую схожесть этих белков вне зависимости от вида и среды обитания и, как следствие, потенциальную универсальность иммунного ответа у тепловодных и холодноводных видов.
3. Созданы *in vivo* модели типичных заболеваний культивируемых видов рыб – вибриоз (на примере большого желтого горбыля) и аэромоноз (на примере радужной форели), в которых выявлены многократные увеличения экспрессии генов белков иммунного ответа - CCL2, CCL3, CCL4, MRC1 и MRC2, что подтверждает их высокую эффективность для оценки динамики воспалительного процесса и апробации биологически активных веществ в условиях аквакультуры.
4. Установлено, что хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 в норме синтезируются во всех органах рыб, а наибольшая их экспрессия наблюдается в печени, почках и селезенке. В модели вибриоза относительные уровни экспрессии генов этих белков в печени, почках и селезенке схожи: гены CCL2 и CCL3 реагируют на инфекцию значительно быстрее, проявляя максимум спустя 6 часов, а экспрессия CCL4 достигает своего максимума лишь спустя 12 часов после инфицирования.
5. Исследована динамика экспрессии генов маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в различных органах рыб в моделях вибриоза и аэромоноза. Установлено, что при схожих локализациях их экспрессии (печень, почки,

селезёнка), у тепловодного большого желтого горбыля *L. crocea* иммунный ответ на заражение в созданных моделях наступает быстрее и проявляется интенсивнее, чем у холодноводной радужной форели *O. mykiss*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шилин М.Б., Голубев Д.А., Алексеев А.П. Прибрежная аквакультура // СПб: изд-во РГГМУ, 2009.- 287 с.
2. Шилин М. Б., Жигульский В. А., Бобылев Н. Г., Ахмад А., Леднова Ю. А., Дун С. Развитие комплекса компенсационных мероприятий по снижению негативного воздействия строительства аванпорта Бронка на Южном берегу Невской губы // Естественные и технические науки. 2020. Выпуск № 3: Стр. 178-188.
3. Федоров М.П. (ред.). Экологические основы управления природно-техническими системами // СПб: СПб ГПУ, 2007.- 500 с.
4. Федоров М.П., Чусов А.Н., Шилин М.Б. Прикладная экология акваномов // СПб: изд-во Политехн ун-та, 2012.- 254 с.
5. Чусов А.Н., Шилин М.Б., Бугров Л.Ю. Аквакультура в техносфере // СПб: изд-во Политехнического ун-та, 2012.- 221 с.
6. East L., Isacke C. M. The mannose receptor family // *Biochim Biophys Acta*. 2002. V. 1572. P. 364-386.
7. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited // *Immunity*. 2012. V. 36. P. 705-716.
8. Duff D. C. B. The Oral Immunization of Trout Against Bacterium *Salmonicida* // *Journal of Immunology*. 1942. V. 44. N. 1. P. 87-94.
9. 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况. 水生生物学报. 2000. 24 (6): 648-654. / Zhang Y., Sun B., Nie P. Immune Tissues and cells of fish: a review // *Journal of Hydrobiology*. 2000. V. 24. N. 6. P. 648-54.
10. Риитта Рахконен. Здоровая рыба. // НИИ охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии. 2013. 180.
11. Zapata A. G., Chiba A., Varas A. 1-Cells and Tissues of the Immune System of Fish // *Fish Immune System*. 1996. V. 15. P. 1-62.
12. 张艳秋, 詹勇, 许梓荣. 鱼类免疫机制及其影响因子. 水产养殖. 2005. 26 (3): 1-5. / Zhang Y., Zhan Y., Xu Z. Recent developments in Immunity

- System of Fish // Journal of aquaculture. 2005. V. 26. N. 3. P. 1-5.
13. Chilmonczyk S. The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. Annual Review of Fish Diseases. 1992. 2: 181-200 / Yao Xinping.
 14. 李洋洋, 张义兵, 桂建芳. 病毒感染草鱼胸腺的 EST 分析和免疫相关基因的鉴定. 水生生物学报, 2009 33(6) 1031-1037. / Li Y., Zhang Y., Gui J. Est analysis and immune-related gene identification of grass carp thymus in response to virus infection // Journal of Hydrobiology. 2009. V. 33. N. 6 P. 1031-1037.
 15. Romano N., Ceccarelli G., Caprera C., Caccia E., Marino G. Apoptosis in thymus of teleost fish // Fish & Shellfish Immunology. 2013. V. 35. N.2. P. 589-94.
 16. Graf R., Schlüns J. Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.) // Cell & Tissue Research. 1979. V. 196. P. 289-306.
 17. Yue X, Zhang Y., Lei A., Wang Z., Xie B. Pronephros Genesis and Head Kidney Formation in the Catfish, *Silurus meridionalis* Chen // Journal of Southwest University. 2008. V. 30. N. 7. P. 110-116.
 18. Moreau R., Dabrowski K. The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserid (*Chondrostei*) and teleost (*Teleostei*) fishes // Journal of Comparative Physiology B. 1996. V. 166. P. 178-183.
 19. Beldowska M., Falkowska L. Mercury in marine fish, mammals, seabirds, and human hair in the coastal zone of the southern Baltic // Water Air & Soil Pollution. 2016. V. 227. V. 52. P. 1-11.
 20. Quesada G. A., Encinas P., Valdehita A., Baumann L., Segner H., Coll J. M., Navas, J. M. Thyroid active agents T3 and PTU differentially affect immune gene transcripts in the head kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquatic Toxicology. 2016. V. 174. N. 1. P. 159-168.
 21. David J. H., Bird J. Modulation of the fish immune system by hormones //

- Veterinary Immunology and Immunopathology. 2000. V. 77. P. 163-176.
22. Pablo G. V., Alicia M. L., Azucena L. M. O., Melissa B. P., Medina-Gali R. M., Maria O. V. M. D., Monica V., Antonio F., Víctoriano M., Beatriz N., Amparo E., Julio C. Zebra Fish Lacking Adaptive Immunity Acquire an Antiviral Alert State Characterized by Upregulated Gene Expression of Apoptosis, Multigene Families, and Interferon-Related Genes // *Frontiers in Immunology*. 2017. V. 8. P. 1-16.
 23. Madej J. A., Graczyk S. Bursa fabricii - Main organ associated with the immunity of mucosal membranes. *Medycyna Weterynaryjna* // 1997 V. 53. N. 8. P. 439-444.
 24. Miller H. R., Avrameas S. Association between macrophages and specific antibody producing cells // *Nature New Biology*. 1971. V. 229. N. 6. P. 184-185.
 25. Zhao X., Findly R.C., Dickerson H. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish // *Developmental & Comparative Immunology*. 2008. V. 32. N. 5. P. 500-508.
 26. Quesada G. A., Valdehita A., Kropf C., Casanova N. A., Segner H., Navas J. M. Thyroid signaling in immune organs and cells of the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). // *Fish Shellfish Immunol*. 2014. V. 38. N. 1. P. 166-74.
 27. Beatriz A., Rosario C., Jaime P., Alfonso L., Lucia G., Carolina T., et al. Transcriptional Heterogeneity of IgM+ Cells in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues // *Plos One*. 2013. V. 8. N. 12. P. 827-837.
 28. Moller A. M., Koryar T., Kollner B., Schmidt P. H., Segner H. The teleostean liver as an immunological organ: Intrahepatic immune cells (IHICs) in healthy and benzo[a]pyrene challenged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Developmental & Comparative Immunology*. 2014. V. 46. N. 2. P. 518-529.
 29. Morel F. O., Doussiere J., Vignais P. V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects // *European Journal of Biochemistry*. 2010. V. 201. N. 3. P. 523-546.

30. Enane N. A., Frenkel K., Oconnor J. M., Squibb K. S., Zelikoff J. T. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes // *Immunology*. 1993. V. 80. N. 1. P. 68-72.
31. Harris J., Bird D. J. Modulation of the sh immune system by hormones // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2000. V. 77. P. 163-176.
32. Nizet A., Lefebvre P., Luyckx A., Crabbe J. Hormones and non-specific humoral factors in the interferences between sodium, glucose and phosphate handling by dog kidney. // *Current Problems in Clinical Biochemistry*. 1976. V. 6. P. 262-71.
33. Morand M., Siwicki A. K., Pozet F., Vinaize J. C., Keck N. Nonspecific Cellular and Humoral Defence Mechanisms in Sheatfish (*Silurus glanis*) // *Acta Veterinaria Brno*. 1998. V. 67. P. 335-338.
34. Agbede S. A., Adedeji O. B., Adeyemo O. K. Tissues And Organs Involved In The Non-Specific Defence Mechanism In Fish: A Review // *Journal of Applied Sciences Research*. 2012. V. 8. N. 5. P. 2493-2496.
35. Cocito C. Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors // *Antibiotics*. 1983. V. 6. P. 296-332.
36. Alarcon F. J., Garcia-Carrenom F. L., Navarrete M. A. Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus* // *Fish Physiology & Biochemistry*. 2001. V. 24. N. 3. P. 179-189.
37. Brunner J., Prelog M., Riedl M., Giner T., Hofer J., Wurzner R., Zimmerhackl L. B. Analysis of the classical, alternative, and mannose binding lectin pathway of the complement system in the pathogenesis of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis // *Rheumatology International*. 2012. V. 32. N. 6. P. 1815-1818.
38. Fraser T. W. K., Ronneseth A., Haugland G. T., Fjelldal P. G., Mayer I., Wergeland H. I. The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) post-smolts // *Fish & Shellfish Immunology*. 2012. V. 33. N.

1. P. 60-66.
39. Clark I. A., Allison A. C. Specific and nonspecific immunity to hemoprotozoa // *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 1977. V. 26 P. 216-222.
 40. Romani L. Cytokine modulation of specific and nonspecific immunity to *Candida albicans*. // *Mycoses*. 2017. V. 42. P. 45-48.
 41. Gold R., Archelos J. J., Hartung H. P. Mechanisms of Immune Regulation in the Peripheral Nervous System // *Brain Pathology*. 2006. V. 9. N. 2 P. 343-360.
 42. Nardocci G., Navarro C., Cortes P. P., Imarai M., Montoya M., Valenzuela B., Jara P., Acuna C. C., Fernandez R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish // *Fish Shellfish Immunology*. 2014. V. 40 N. 2 P. 531-538.
 43. Purcell M. K., Kurath G., Garver K. A., Herwig R. P., Winton J. R. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination // *Fish & Shellfish Immunology*. 2004. V. 17. P. 447-462.
 44. Li J., Schiavo S., Dong X., Rametta G., Miglietta M. L., Oliviero M., Wu C., Manzo S. Early ecotoxic effects of ZnO nanoparticle chronic exposure in *Mytilus galloprovincialis* revealed by transcription of apoptosis and antioxidant-related genes // *Ecotoxicology*. 2018. V. 27. N. 1. P. 1-16.
 45. Tateno H., Yamaguchi T., Ogawa T., Muramoto K., Watanabe T., Kamiya H., Saneyoshi H. Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Developmental & Comparative Immunology*. 2002. V. 26. P. N. 6. P. 543-550.
 46. Cheng Y., Wang R, Sun Y., Xu T. Molecular characterization of miiuy croaker CC chemokine gene and its expression following *Vibrio anguillarum* injection // *Fish & Shellfish Immunology*. 2011. V. 31. P. 148-154.
 47. 殷新平, 苏建明, 蒲龄, 李启皓. 促肾上腺皮质激素释放激素在鱼类应激反应中的作用. *水产学杂志*. 2014. 27 (3): 57-61. / Yin X., Su J., Pu L., Li Q.

Research on the Effect of Corticotropin-releasing Hormone in Stress Reaction in the Fishes // Journal of Fisheries. 2014. V. 27. N. 3. P. 57-61.

48. 王会聪, 孙琪, 杨先乐, 范永红. 温度对鲫鱼鳃出血病的影响. 科学养鱼. 2013. 29 (10): 61-61 / Wang H., Sun Q., Yang X., Fan Y. Effect of temperature on gill hemorrhage disease of crucian carp // Scientific Fish Farming. 2013. V. 29. N. 10. P. 61-61.
49. Федоров М.П., Шилин М.Б., Горбунов Н.Е. Экологические основы управления природно-техническими системами // СПб: изд-во Политехнического ун-та, 2007.-506 с.
50. Su Y., Guo Z., Xu L., Jiang J., Wang J., Feng J.. Identification of a cobia (*Rachycentron canadum*) CC chemokine gene and its involvement in the inflammatory response // Fish Shellfish Immunol. 2012. V. 32. P. 204-210.
51. Bautista A. P. Chronic alcohol intoxication primes Kupffer cells and endothelial cells for enhanced CC-chemokine production and concomitantly suppresses phagocytosis and chemotaxis // Front Biosci. 2002. V. 7. P. 117-125.
52. Fox J. M., Pease J. E. The Molecular and Cellular Biology of CC Chemokines and their Receptors // Current Topics in Membranes. 2005. V. 55. P. 73-102.
53. Peatman E., Bao B., Peng X., Baoprasertkul P., Brady Y., Liu Z. Catfish CC chemokines: genomic clustering, duplications, and expression after bacterial infection with *Edwardsiella ictaluri* // Molecular Genetics & Genomics. 2006. V. 275. P. 297-309.
54. Glass W. G., Rosenberg H. F., Murphy P. M. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection // Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology. 2004. V. 3. P. 467-473.
55. Ebert L. M., Schaerli P., Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues // Molecular Immunology. 2005. V. 42. P. 799-809.
56. Standiford T. J., Rolfe M. W., Kunkel S. L., Lynch J. P., Strieter R. M. Macrophage inflammatory protein-1 expression in interstitial lung disease //

- Journal of Immunology. 1993. v. 151. p. 2852-2863.
57. Cella, M. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation // Journal of Experimental Medicine. 1996. V. 184. P. 747-752.
 58. Verhasselt V., Buelens C., Willems F., Groote D. D., Haeffner C. N., Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway // Journal of Immunology. 1997. V. 158. P. 2919-2925.
 59. Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation // European Journal of Immunology. 1998. V. 28. P. 2760-2769.
 60. Sallusto F., Palermo B., Lenig D., Miettinen M., Matikainen S., Julkunen I., Forster R., Burgstahler R., Lipp M., Lanzavecchia A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function // European Journal of Immunology. 2010. V. 29. P. 1617-1625.
 61. Jing H., Vassiliou E., Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells // Journal of Leukocyte Biology. 2003. V. 74. P. 868-879.
 62. Modi W. S., Lautenberger J., An P., Scott K., Goedert J. J., Kirk G. D., Buchbinder S., Phair J., Donfield S., Brien S. J. O., Winklera C. Genetic Variation in the CCL18-CCL3-CCL4 Chemokine Gene Cluster Influences HIV Type 1 Transmission and AIDS Disease Progression // American Journal of Human Genetics. 2006. V. 79. N. 1. P. 120-128.
 63. Дун С., Шилин М.Б., Апаликова О.В., Лукина Ю.Н. Исследование молекулярных механизмов иммунитета для борьбы с инфекциями в аквакультуре. География: развитие науки и образования // География: развитие науки и образования. Том II. Коллективная монография по материалам ежегодной международной научно-практической

конференции LXXIII Герценовские чтения, СПб: Астерион, Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2020. – 526 с.

64. Rusmini M., Griseri P., Lantieri F., Matera I., Hudspeth K. L., Roberto A., Mikulak J., Avanzini S., Rossi V., Mattioli G. Induction of RET Dependent and Independent Pro-Inflammatory Programs in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hirschsprung Patients // PLoS ONE. 2013. V. 8. N. 3. P. 59-66.
65. Graham G. J., Mackenzie J., Lowe S., Tsang M. L., Weatherbee J. A., Issacson A., Medicherla J., Fang F., Wilkinson P. F., Pragnell I. B. Aggregation of the chemokine MIP-1 alpha is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses // Journal of Biological Chemistry. 1994. V. 72. N. 2. P. 269-298.
66. Matos A. L. D., And D. K. L., Esteves P. J. Genetic characterization of CCL3, CCL4 and CCL5 in leporid genera *Oryctolagus*, *Sylvilagus* and *Lepus* // International Journal of Immunogenetics. 2014. V. 41. N. 1. P. 154-158.
67. 王健, 赵金红. 趋化因子受体研究进展. 现代预防医学. 2006. 33 (2): 165-171. / Wang J., Zhao J. Research progress of chemokine receptors // Modern preventive medicine. 2006. V. 33 N. 2 P. 165-171.
68. Balashov K. E., Rottman J. B., Weiner H. L. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions // Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. V. 96 P. 6873-6878.
69. Wu Y., Li Y., Baba T., Mukaida N. CCL3-CCR5 Axis Regulates Intratumoral Accumulation of Leukocytes and Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Murine Lung Metastasis Process // Journal of Immunology. 2009. V. 48. P. 46-50.
70. Hsu Y., Hou C., Lin S, Kuo W., Lin H., Lin H. The biofunction of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) CC chemokine ligand 4 (CCL4) in innate and adaptive immunity // Fish & Shellfish Immunology. 2013. V. 35. P. 1891-1898.

71. Mariani M., Lang R., Binda E., Panina B. P., Ambrosio D. D. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells // *European Journal of Immunology*. 2010. V. 34. P. 231-240.
72. Moser B., Wolf M., Walz A., Loetscher P. Moser B., Wolf M., Walz A., Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control // *Trends in Immunology*. 2004. V. 25. P. 75-84.
73. 朱成科, 王建, 陈灵涵, 周朝伟, 雷骆, 邓星星, 刘春, 郑宗林. 剑尾鱼趋化因子 CCL4 和 CCL19 基因的克隆及 r 嗜水气单胞菌感染对其组织表达的影响. *水产学报*. 2018. 42: 186-95. / Zhu C., Wang J., Chen L., Zhou C., Lei L., Deng X., Liu C., Zheng Z. Identification and expression analysis of two CC chemokines in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) responses to *Aeromonas hydrophila* challenges // *Journal of Fisheries*. 2018. V. 42. P. 186-195.
74. 王丽坤, 王娜, 马梅生, 胡成钰. 草鱼 CCL4 基因的克隆及表达. *南昌大学学报: 理科版*. 2009. 33 (2): 181-184. / Wang L., Wang N., Ma M., Hu Y. Cloning and Expression of CCL4 in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*) // *Journal of Nanchang University (Natural Science)*. 2009. V. 33. N. 2. P. 181-184.
75. 杨旦阳, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 香鱼 CCL4-like 基因的克隆、序列分析及免疫相关性表达变化分析. *中国细胞生物学学报*. 2013. 35 (5): 124-131. / Molecular Cloning, Sequences Analysis and Immune-related Expression Changes of aCCL4-like Gene from Ayu (*Plecoglossus altivelis*) // *Chinese Journal of Cell Biology*. 2013. V. 35. N. 5. P. 124-131.
76. Baoprasertkul P., He C., Peatman E., Zhang S., Liu Z. Constitutive expression of three novel catfish CXC chemokines: homeostatic chemokines in teleost fish // *Molecular Immunology*. 2005. V. 42. P. 1355-1366.
77. Cheng Y., Wang R., Sun Y., Xu T. Molecular characterization of miiuy croaker CC chemokine gene and its expression following *Vibrio anguillarum*

- injection // Fish Shellfish Immunol. 2011. V. 31. P. 148-154.
78. Llorca O. Extended and bent conformations of the mannose receptor family // Cellular & Molecular Life Sciences. 2008. V. 65. P. 1302-1310.
79. Arce I., Roda N. P., Montoya M., Hernanz F. P., Fernandez R. E. Molecular and genomic characterization of human DLEC, a novel member of the C-type lectin receptor gene family preferentially expressed on monocyte-derived dendritic cells // European Journal of Immunology. 2001. V. 31. P. 2733-2740.
80. East L. Characterization of Sugar Binding by the Mannose Receptor Family Member, Endo180 // Journal of Biological Chemistry. 2002. V. 277. N. 52. P. 50469-50475.
81. Gazi U., Martinez P. L. Influence of the mannose receptor in host immune responses // Immunobiology. 2009. V. 214. P. 554-561.
82. Dong X., Li J., He J., Liu W., Jiang L., Ye Y., Wu C. Anti-infective mannose receptor immune mechanism in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) // Fish Shellfish Immunology. 2016. V. 54. P. 257-265.
83. Li J., Zu T., Dong X., Xiao Y., Wei L., Wu C.. Characterization of Dual and Homeostatic Chemokine Expression and Response to Bacterial Infection in Large Yellow Croaker, *Larimichthys crocea* // Pakistan Journal of Zoology. 2018. V. 50. N. 4. P. 1373-1380.
84. Jeannin P., Delneste Y., Mantovani A. Method For the in Vitro Diagnosis of Autoimmune Immune Response by Detection of Antibodies Directed Against The Pentraxin 3 Antigen // Патент, номер заявки 12/223004. 2009. P.1-9.
85. Su Y., Bakker T., Harris J., Tsang C., Brown G. D., Wormald M. R., Gordon S., Dwek R. A., Rudd P. M., Pomares L. Glycosylation influences the lectin activities of the macrophage mannose receptor // Journal of Biological Chemistry. 2005. V. 280. P. 32811-32820.
86. Mcgreal E. P., Martinez P. L., Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system // Molecular Immunology. 2004. V. 41. P. 1109-1121.

87. Ancian P., Lambeau G., Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-Type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2 // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 13146-13151.
88. Radis B. G., Moreno F. B. M. B., Nogueira L. L., Martins A. M. C., Yamane T. Crotaetin, a novel snake venom C-type lectin, is homolog of convulxin // *Journal of Venomous Animals & Toxins Including Tropical Diseases*. 2005. V. 11. P. 557-578.
89. Mcgreal E., Rosas M., Brown G., Zamze S., Wong S., Gordon S., MartinezpomaresL., Taylor P. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose // *Glycobiology*. 2006. V. 16. P. 422-430.
90. 刘小玲, 曾令兵. 甘露糖受体结构、功能、表达和应用研究的新进展. 水产学杂志. 2013. 1: 54-59. / Liu X., Zeng L. A Review of the Research Advancement of Structure, Function, Expression and Application of Mannose Receptor // *Chinese Journal of Fisheries*. 2013. V. 1. P. 54-59.
91. Hattori T., Konno S., Hizawa N., Isada A., Takahashi A., Shimizu K., Gao P., Beaty T. H., Barnes K. C., Huang S. K., Nishimura M. Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations // *Immunogenetics*. 2009. V. 61. P. 731-738.
92. Rajaram M. V.S., Arnett E., Azad A. K., Guirado E., Ni B., Gerberick A. D., He L., Keler T., Thomas L. J., Lafuse W. P., Schlesinger L. S. *M. tuberculosis*-Initiated Human Mannose Receptor Signaling Regulates Macrophage Recognition and Vesicle Trafficking by FcR γ -Chain, Grb2, and SHP-1 // *Cell Reports*. 2017. V. 21. P. 126-140.
93. Chieppa M., Bianchi G., Doni A., Del P. A., Sironi M., Laskarin G., Monti P., Piemonti L., Biondi A., Mantovani A., Introna M., Allavena P. Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program // *Journal of Immunology*. 2003. V. 171. P. 4552-4560.

94. Xu X., Xie Q., Shen Y., Lu G., Yao H., Chen Y., Zhou J. Involvement of mannose receptor in the preventive effects of mannose in lipopolysaccharide-induced acute lung injury // *European Journal of Pharmacology*. 2010. V. 641. P. 229-37.
95. Zhang J., Tachado S. D., Patel N., Zhu J., Imrich A., Manfruelli P., Cushion M., Kinane T. B., Koziel H. Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro // *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. V. 78. P. 665-674.
96. Sulek J., Wagenaar M. R. A., Shireman J., Molinolo A., Madsen D. H., Engelholm L. H., Behrendt N., Bugge T, H. Increased Expression of the Collagen Internalization Receptor uPARAP/Endo180 in the Stroma of Head and Neck Cancer // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry Official Journal of the Histochemistry Society*. 2007. V. 55. P. 347-353.
97. Lopez G. J. M., Xiaohe C., Collins S. J., Ikuyo Y., Okamura D. M., Bugge T. H., Isacke C. M., Emson C. L., Turner S. M., Shankland S. J. Eddy A. A. Mannose Receptor 2 Attenuates Renal Fibrosis // *Journal of the American Society of Nephrology Jasn*. 2012. V. 23. P. 236-251.
98. Bird S., Tafalla C. Teleost Chemokines and Their Receptors // *Biology*. 2015. V. 4. P. 756-784.
99. Filatova L.Y., Klyachko N.L., Kudryashova E. V. Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: focusing on the mannose receptors // *Russian Chemical Reviews*. 2018. V. 87. P. 374-391.
100. 徐明, 郭宁. 甘露糖受体在免疫调节中的作用. *细胞与分子免疫学杂志*. 2002. 18 (6): 673-675. / Xu M., Guo N. The role of mannose receptor in immune regulation // *Journal of Cellular and Molecular Immunology*. 2002. V. 18. N. 6. P. 673-675.
101. 李园园, 谢敏, 刘先胜. 甘露糖受体生物学功能的新进展. *国际呼吸杂志*. 2011. 31 (8): 616-619. / Li Y., Xie M., Liu X. New progress in biological function of mannose receptor // *International Respiratory Journal*. 2011. V. 31.

- N. 8. P. 616-619.
102. Zheng F., Asim M., Lan J., Zhao L., Wei S., Chen N., Liu X., Zhou Y., Lin L. Molecular Cloning and Functional Characterization of Mannose Receptor in Zebra Fish (*Danio rerio*) during Infection with *Aeromonas sobria* // International Journal of Molecular Sciences. 2015 16 5 10997-11012.
 103. 李琴, 马梅生, 胡成钰. 草鱼胶原凝集素基因的克隆及其功能分析. 生物工程学报. 2010. 26 (1): 22-27. / Li Q., Ma M., Hu C. Cloning and functional analysis of the collectin gene from the grass carp *Ctenopharyngodon idella* // Journal of Bioengineering. 2010. V. 26. N. 1. P. 22-27.
 104. Dannevig B. H., Struksns G., Skogh T., Kindberg G. M., Berg T. Endocytosis via the scavenger- and the mannose-receptor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) pronephros is carried out by nonphagocytic cells // Fish Physiology and Biochemistry. 1990. V. 8. P. 229-238.
 105. Sorensen K. K., Tollersrud O. K., Evjen G., Smedsrod B. Mannose-receptor-mediated clearance of lysosomal α -mannosidase in scavenger endothelium of cod endocardium // Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology. 2001. V. 129. P. 615-630.
 106. 黎倩倩, 张彦兵, 相笑, 魏建超, 齐鹏飞, 石元元, 陆莹梅, 夏鹏, 刘珂, 邵东华. 猪清道夫受体 SRA/CD204 多克隆抗体的制备以及该受体介导的细菌吞噬功能分析. 中国动物传染病学报. 2015. 23: 42-47. / Li Q., Zhang Y., Xiang X., Wei J., Qi P., Shi Y., Lu Y., Xia P., Li K. Generation of Polyclonal Antibodies Against Pig Scavenger Receptor SRA/CD 204 and Functional Analysis of Bacterial Phagocytosis Mediated by Pig SRA/CD204 // Chinese Journal of Veterinary Parasitology. 2015. V. 23. N. 6. P. 42-47.
 107. 王莉, 张杰, 赵贤亮, 狄桂兰, 孔祥会. 鱼类 C-型凝集素结构特征及其免疫功能简. 水产科学. 2019. 2: 282-288. / Wang L., Zhang J., Zhao X., Di G., Kong X. The structural characteristics of fish C-type lectin and its immune function // Fishery Science. 2019. V. 2. P. 282-288.

108. Klesius P. H., Pridgeon J. W., Mediha A. Chemotactic factors of *Flavobacterium columnare* to skin mucus of healthy channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // *Fems Microbiology Letters*. 2010. V. 310. N. 2. P. 145-151.
109. Gudding R., Lillehaug A., Evensen Y. Vaccination against Diseases Caused by Betanodavirus // *Fish Vaccination*. 2014. P. 341-351.
110. Lotti, S., Singh, N., Golding, M., Wheeler M. B., Bertolini L., Long C. Production of recombinant immunogenic proteins to create multivalent subunit vaccines for zoonotic diseases // *Transgenic Research*. 2016. V. 25. N. 1. P. 101-122.
111. Papadopoulos P., Tzironi E. Fish vaccination // *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2017. V. 59. N. 4. P. 308-319.
112. Iversen M. H., Martin R. A. The effect of allostatic load on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.) // *Fish Physiology & Biochemistry*. 2014. V. 40. P. 527-538.
113. Rozas M., Ennquez R. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review // *Journal of Fish Diseases*. 2014. V. 37. P. 163-188.
114. Hoarea R., Jung S. J., Ngo T.P.H., Bartie K., Bailey J., Thompson K. D., Adams A. Efficacy and safety of a non-mineral oil adjuvanted injectable vaccine for the protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against *Flavobacterium psychrophilum* // *Fish & Shellfish Immunology*. 2019. V. 85. P. 44-51.
115. Winton J. R. Molecular approaches to fish vaccines // *Journal of Applied Ichthyology*. 2010. V. 14. P. 153-158.
116. Reitan L. J., Evensen y., Midtlyng P., Emilsen V., Gravningen K., Romstad A. B. Comparison of a serological potency assay for furunculosis vaccines (*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*) to intraperitoneal challenge in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Biologicals Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2014. V. 42. N. 2. P. 86-90.
117. Kordon A., Abdelhamed H., Baumgartner W. A., Karsi A., Pinchuk L. M.

- Innate and adaptive immune responses of catfish antigen-presenting cells to live attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccines // *Fish & Shellfish Immunology*. 2016. V. 53. P. 58-93.
118. Shoemaker C., Klesius P., Evans J., Arias C. Use of Modified Live Vaccines in Aquaculture // *Journal of the World Aquaculture Society*. 2010. V. 40. P. 573-585.
119. Soto E., Wiles J., Elzer P., Macaluso K., Hawke J. P. Attenuated *Francisella asiatica* iglC mutant induces protective immunity to francisellosis in tilapia // *Vaccine*. 2011. V. 29. P. 593-598.
120. Nuryati S., Alimuddin Y. Frequency and persistency of DNA vaccine encoding GP25 by oral on common carp // *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 2015. V. 12. N. 2. P. 150-157.
121. Chen D., Yao Y., Cui Z., Zhang X., Peng K., Guo X., Zhou Y., Li S., Wu N., Zhang Y. Comparative study of the immunoprotective effect of two DNA vaccines against grass carp reovirus // *Fish Shellfish Immunol*. 2018. V. 75. P. 66-73.
122. Reyes M., Ramírez C., Nancucheo I., Villegas R., Schaffeld G., Kriman L., Gonzalez J., Oyarzun P. A novel «in-feed» delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmon salar*) // *Vaccine*. 2017. V. 35. N. 4. P. 626-632.
123. Kim S. J., Kim J. O., Kim W. S., Oh M. J. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infectivity dynamics in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with injection and immersion challenge routes // *Aquaculture*. 2016. V. 465. P. 7-12.
124. Wolfenden R. E., Layton S. L., Wolfenden A. D., Khatiwara A., Hargis B. M. Development and evaluation of candidate recombinant Salmonella-vectored Salmonella vaccines // *Poultry Science*. 2010. V. 89. P. 2370-2379.
125. Curieux B. O. L., Vandelac L., Caron J., Seralini G.E. Factors to consider before production and commercialization of aquatic genetically modified organisms: the case of transgenic salmon // *Environmental Science & Policy*.

2009. V. 12. P. 170-189.
126. Ayalew A., Fufa A. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish // *Veterinary Medicine International*. 2018. V. 2018. P. 1-10.
 127. Antipa R., Amend D. F. Immunization of Pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1977. V. 34. P. 203-208.
 128. Salonius K., Siderakis C., Mackinnon A. M., Griffiths S. G. Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids // *Developmental Biology*. 2005. V. 121. P. 189-197.
 129. Boesen H. T., Pedersen K., Larsen J. L., Koch C., Ellis A. E. *Vibrio anguillarum* Resistance to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Serum: Role of O-Antigen Structure of Lipopolysaccharide // *Infection & Immunity*. 1999. V. 67. N. 1. P. 294-301.
 130. Mario C., Carlos M., Swetha M., Larenas J., Tobar J. A. Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo salar* // *Fish & Shellfish Immunology*. 2016. V. 54. P. 54-59.
 131. Tatner M. F., Horne M. T. The effects of vaccine dilution, length of immersion time, and booster vaccinations on the protection levels induced by direct immersion vaccination of brown trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* (ERM) vaccine // *Aquaculture*. 1985. V. 46. P. 11-18.
 132. Anderson E., Clouthier S., Shewmaker W., Weighall A., Lapatra S. Inactivated infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines // *Journal of Fish Diseases*. 2010. V. 31. P. 729-745.
 133. Wise D. J., Greenway T. E., Byars T. S., Griffin M. J., Khoo L. H. Oral Vaccination of Channel Catfish against Enteric Septicemia of Catfish Using a Live Attenuated *Edwardsiella ictaluri* Isolate // *Journal of Aquatic Animal Health*. 2015. V. 27. N. 2. P. 135-143.

134. Shoemaker C. A., Klesius P. H., Drennan J. D., Evans J. J. Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish // Fish & Shellfish Immunology. 2011. V. 30. P. 304-308.
135. Hoff K. A. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities // Applied & Environmental Microbiology. 1989. V. 55. P. 1775-1786.
136. John, A., Plumb, Somsak, Vinitnantharat, W., et al. Optimum Concentration of *Edwardsiella ictaluri* Vaccine in Feed for Oral Vaccination of Channel Catfish // Journal of Aquatic Animal Health. 1994. V. 67. N. 1. P. 294-301.
137. Emmenegger E. J., Kurath G. DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus // Vaccine. 2008. V. 26. P. 6415-6421.
138. Miyazaki T. Symposium «The Forefront of Studies on Koi Herpesvirus Disease» // Fish Pathology. 2009. V. 40. N. 4. P. 201-207.
139. Azad I., Shankar K., Mohan C., Kalita B. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination--antigen localization by a monoclonal antibody // Diseases of Aquatic Organisms. 2000. V. 43. P. 103-108.
140. Evans J. J., Klesius P. H., Shoemaker C. A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration // Vaccine. 2004. V. 22. P. 3769-3773.
141. RoMer V. K., Lukas N., Maki O., Kragelund S. M. H., Kristian R. M., Riccardo M. Oral and Anal Vaccination Confers Full Protection against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Rainbow Trout // Plos One. 2014. V. 9. N. 4. e93845.
142. Barnes A. C., Santos N. M. S. D., Ellis A. E. Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela subsp. piscicida* // Developments in Biologicals. 2005. V. 121. P. 75-84.

143. Poobalane S., Thompson K. D., Ardo L., Verjan N., Han H. J., Jeney G., Hirono I., Aoki T., Adams A. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish // *Vaccine*. 2010. V. 28. P. 3540-3547.
144. Evenberg D., Degraaff P., Lugtenberg B. Vaccine-induced protective immunity against *Aeromonas salmonicida* tested in experimental carp erythrodermatitis // *Journal of Fish Diseases*. 1988. V. 11. N. 4. P. 337-350.
145. Stewart J. E., Zwicker B. M. Comparison of various vaccines for inducing resistance in the lobster *Homarus americanus* to the bacterial infection, gaffkemia // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1974. V. 31. P. 1887-1892.
146. Vimal S., Farook M. A., Madan N., Majeed S. A., Hameed A. S. S. Development, distribution and expression of a DNA vaccine against nodavirus in Asian Seabass, *Lates calcarifier* (Bloch, 1790) // *Aquaculture Research*. 2016. V. 47. N. 4. P. 1-12.
147. Skjold P. L., Sommerset I., Frost P., Villoing S. Vaccination against pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reduces shedding of salmonid alphavirus // *Veterinary Research*. 2016. V. 47. P. 78.
148. Gao Y., Pei C., Sun X., Zhang C., Li L., Kong X. Novel subunit vaccine based on grass carp reovirus VP35 protein provides protective immunity against grass carp hemorrhagic disease // *Fish & Shellfish Immunology*. 2018. V. 75. P. 91-98.
149. Gomez C. E., Estepa A., Coll J. M. Corrigendum to «A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines» by Gomez-Casado et al. *Vaccine*. 2011. V. 29. N. 21. P. 2657-2671.
150. 王玉堂. 疫苗及其在水生动物疾病预防中的应用(四). *中国水产*. 2018. 515: 95-99. / Wang Y. Vaccines and their application in the prevention of aquatic animal diseases (4) // *China Fisheries*. 2018. V. 515. P. 95-99.
151. Wang M., Lin X., Ma G., Bai X. Emerging Viral Diseases of Fish and Shrimp // *Veterinary Research*. 2007. V. 4. P. 35-58.

152. Walker, Peter, J., Winton, James, R. Emerging viral diseases of fish and shrimp // *Veterinary Research A Journal on Animal Infection*. 2010. V. 41. N. 6. P. 51.
153. Гаевская А. В. Паразиты и болезни морских и океанических рыб в природных и искусственных условиях. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2004. – с. 237.
154. Soliman W. S., Shaapan R. M., Mohamed L. A., Gayed S. S. R. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy // *Open Veterinary Journal*. 2019. V. 9. N. 3. P. 190-195.
155. Schroeder H., Skelly P., Zipfel P. F., Losson B., Vanderplasschen A. Subversion of complement by hematophagous parasites // *Other*. 2009. V. 33. N. 1. P. 0-13.
156. Burr, S. E., Pugovkin D., Wahli T., Segner H., Frey J. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model // *Microbiology*. 2005. V. 151. P. 2111-2118.
157. Cao Y., Wang D., Li S., Zhao J., Mou Z. A transcriptome analysis focusing on splenic immune-related microRNAs of rainbow trout upon *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection // *Fish & Shellfish Immunology*. 2019. V. 91. P. 350-357.
158. Marana M. H., Jrgensen L. V. G., Skov J., Chettri J. K., Buchmann K. Subunit vaccine candidates against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. P. e0171944.
159. Abdelhamed H., Nho S. W., Turaga G., Banes M. M., Karsi A., Lawrence M. L. Protective efficacy of four recombinant fimbrial proteins of virulent *Aeromonas hydrophila* strain ML09-119 in channel catfish // *Veterinary Microbiology*. 2016. V. 197. P. 8-14.
160. Massault C., Franch R., Haley C., Koning D. J. D., Bovenhuis H., Pellizzari C., Patarnello T., Bargelloni L. Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // *Animal Genetics*. 2015.

- V. 42. P. 191-203.
161. Byelyakov A. The role of mass media in mobilization of citizens for environmental actions: examples from Ukraine and Germany // *Journal of Fish Diseases*. 2019. V. 37. P. 363–369.
162. 梁平, 李占东, 姜景田. 养殖鱼类常见细菌性疾病防治. *齐鲁渔业*. 2007. 24 (8): 39-39. / Liang P., Li Z., Jiang J. Prevention and treatment of common bacterial diseases in farmed fish // *Qilu Fisheries*. 2007. V. 24. N. 8. P. 39-39.
163. 陈月英, 钱冬. 淡水鱼类细菌性败血症菌苗浸浴免疫研究. *海洋与湖沼*. 1998. 6: 597-603. Chen Y., Qian D. Studies on Bath Immunization of Bacterin for Fish Bacterial Septicemia // *Ocean and Lake*. 1998. V. 6. P. 597-603.
164. 曾地刚, 雷爱莹, 彭敏, 李咏梅. 噬菌蛭弧菌预防和治疗斑点叉尾(鱼回)细菌性败血病的初步研究. *南方农业学报*. 2004. 35: 218-220. / Zeng D., Lei A., Peng M., Li Y. Primary study on preventing and curing bacterial septicemia of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by *Bdellovibrio bacteriovorus* // *Fisheries Institute of Guangxi*. 2004. V. 35. P. 218-220.
165. 廖广成, 郑万明. 鱼类常见细菌性疾病及其防治. *养殖技术顾问*. 2010. 4: 190. / Liao G., Zheng W. Common bacterial diseases of fish and their prevention // *Technical Advisor for Animal Husbandry*. 2010. V. 4. P. 190.
166. Abuillan W., Schneck E., Korner A, Brandenburg K., Gutschmann T., Gill T., Vorobiev A., Konovalov O., Tanaka M. Physical interactions of fish protamine and antiseptic peptide drugs with bacterial membranes revealed by combination of specular x-ray reflectivity and grazing-incidence x-ray fluorescence // *Physical Review E*. 2013. V. 88. P. 012705.
167. 游剑涛. 大黄鱼烂鳃病病原菌的分离鉴定及药敏分析. *渔业研究*. 2018. 40: 425-433. / Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from *Larimichthys crocea* with gill - rot disease // *Journal of Fisheries Research*. 2018. V. 40. P. 425-433.

168. Fan H., Zeng Z., Yu P., LI Z. Gill-Rot Disease of European Eel Infected by *Pseudomonas sp.* // Acta Hydrobiologica Sinica. 2001. V. 25. N. 2. P. 202-204.
169. Kumar G., Menanteau L. S., Saleh M., El-Matbouli M. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish // Veterinary Research. 2015. V. 46. P. 103.
170. Hickey M. E., Lee J. L. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention // Reviews in Aquaculture. 2018. V. 10. P. 585-610.
171. Austin B., Austin D., Sutherland R., Thompson F., Swings J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii* // Environmental Microbiology. 2010. V. 7. P. 1488-1495.
172. Austin B., Austin D. A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish // Book. P. 2016.
173. Bao P., Sun X., Liu Q., Zhang Y., Liu X. Synergistic effect of a combined live *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella piscicida* vaccine in turbot // Fish & Shellfish Immunology. 2019. V. 88. P. 84-90.
174. Дун С., Шилин М.Б. Современное состояние и задачи развития аквакультуры в Китае // Экологическая деятельность и экологическое просвещение: региональный аспект: материалы Всерос. науч. конф. СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2020. – 268 с.
175. Дун С., Шилин М.Б. Текущее состояние аквакультуры и методы защиты аквакультуры в Китае // Труды IV Всероссийской конференции «Гидрометеорология и экология: достижения и перспективы развития»/МГО 2020 имени Л. Н. Карлина. – СПб.: ХИМИЗДАТ, 2020. – 459 с.
176. 张清榕, 杨圣云. 中国软骨鱼类种类、地理分布及资源. 厦门大学学报(自然科学版). 2005. 44: 207-211. / Zhang Q., Yang S. Species, geography distribution and resource of chondrichthian fishes of China // 2005. V. 44. P.

207-211.

177. 杨君兴, 潘晓赋, 陈小勇, 王晓爱, 赵亚鹏, 李建友, 李再云. 中国淡水鱼类人工增殖放流现状. 动物学研究. 2013. 34 (4): 267-280. / Yang X., Pan X., Chen X., Wang X., Zhao Y., Li J., Li Z. Overview of the artificial enhancement and release of endemic freshwater fish in China // 2013. V. 34 N. 4. P. 267-280.
178. 张进. 水产养殖中存在的问题及对策初探. 农家科技. 2018. 0: 121. / Zhang J. A preliminary study on the problems and countermeasures in aquaculture // Farm Science and Technology. 2018. V. 0. P. 121.
179. 王茜, 李励年, 熊敏思, 岳冬冬. 俄罗斯渔业现状及发展趋势. 渔业信息与战略. 2017. 4: 302-306. / Wang Q., Li L., Xiong M. Current status and development trend of Russian fisheries // Fishery information and strategies. 2017. V. 4. P. 302-306.
180. 余景, 胡启伟, 袁华荣, 陈丕茂. 基于遥感数据的大亚湾伏季休渔效果评价. 南方水产科学. 2018. 14 (3): 1-9. / Yu J., Hu Q., Yuan H., Chen P. Effect assessment of summer fishing moratorium in Daya Bay based on remote sensing data // South China Fisheries Science. 2018. V. 14. N. 3. P. 1-9.
181. 黄新菊. 浅谈我国伏季休渔政策对渔业资源的保护. 中国农业信息. 2016. 12: 25. / Talking about the protection of fishery resources in my country's summer fishing moratorium policy // Huang X. China Agriculture Information. 2016. V. 12. P. 25.
182. 宋南奇, 王诺, 吴暖, 林婉妮. 基于 GIS 的我国渤海 1952-2016 年赤潮时空分布. 中国环境科学. 2018. 38 (3): 1142-1148. / Song N., Wang N., Wu N., Lin Y. / Temporal and spatial distribution of harmful algal blooms in the Bohai Sea during 1952~2016 based on GIS // China Environmental Science. 2018. V. 38. N. 3. P. 1142-1148.
183. 李翠香. 浅谈养殖业污染危害与综合防治措施. 中国畜禽种业. 2020. 16: 31. / Li C. Talking about the pollution hazards and comprehensive prevention

- measures of the breeding industry // *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*. 2020. V. 16. P. 31.
184. 刘敏, 孙广文, 王卓铎. 中国海水鱼养殖现状分析. 当代水产. 2019. 11: 64-67. / Liu M., Sun G., Wang Z. Analysis of the current situation of marine fish farming in China // *Contemporary aquatic products*. 2019. V. 11. P. 64-67.
185. Дун С., Шилин М.Б., Лукина Ю.Н. Исследование механизмов иммунного ответа для разработки новой технологии защиты рыб от инфекций в условиях аквакультуры // Сборник международной научно-практической конференции «Современные проблемы гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды на пространстве СНГ», посвященной 90-летию Российского государственного гидрометеорологического университета. 2020. - 800 с.
186. Бергер В.Я. Продукционный потенциал Белого моря // Исследования фауны морей, 60 (68) / СПб: изд-во Зин РАН, 2007. - 292 с.
187. Котенев Б.Н., Богерук А.К., Бурлаченко И.В., Дергалева Ж.Т., Микодина Е.В., Николаев А.И., Смирнов Б.П., Яхонтова И.В. Стратегические направления развития аквакультуры в России // *Аквакультура*, вып. 4. / М.: ВНИРО, 2007. - 45 с.
188. 李励年. 俄罗斯加紧实施渔业振兴计划. 渔业信息与战略. 2016. 4: 316-319. / Li L. Russia has stepped up its fishery revitalization plan // *Fisheries information and strategy*. 2016. V. 4. P. 316-319.
189. Liu W., Jiang L., Dong X., Liu X., Kang L., Wu C. Molecular characterization and expression analysis of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) complement component C6 after bacteria challenge // *Aquaculture*. 2016. V. 458. P. 107–112.
190. He J., Liu H., Yang J., Dong X., Wu C. Abundant members of Scavenger receptors family and their identification, characterization and expression against *Vibrio alginolyticus* infection in juvenile *Larimichthys crocea* // *Fish*

and shellfish immunology. 2016. V. 50. P. 297-309.

191. 丁爱侠, 贺依尔. 舟山岱衢族大黄鱼放流增殖试验. 中国水产. 2010. 8: 67-68. / Ding A., He Y. Releasing and multiplication test of large yellow croaker of Zhoushan Daiqu nationality // China Fisheries. 2010. V. 8. P. 67-68.
192. 林永添. 三都湾大黄鱼网箱养殖区海水营养盐状况的初步研究. 福建水产. 2013. 35 (3): 211-217. / Lin Y. A preliminary study of nutrients distribution in *Pseudosciaena crocea* Net-Cage Culture Area of Sandu Bay // Journal of Fujian Fisheries. 2013. V. 35. N. 3. P. 211-217.
193. Zdanovich V. V., Pushkar V. Y., Kelekhsaev M. Z. Specific features of growth and energetics of juvenile rainbow trout *Parasalmo (Oncorhynchus) mykissat* constant temperature and its short-time periodic deviations into the upper suboptimal zone // Journal of Ichthyology. 2011. V. 51. P. 528-535.
194. Kasumyan A. O., Marusov E. A. Distant chemoreception in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in the normal state and after chronic anosmia // Doklady Biological Sciences. 2008. V. 423. N. 1. P. 450-452.
195. Kuzishchin K. V., Malyutina A. M., Gruzdeva M. A. Seasonal dynamics of feeding and food relationships of juveniles of *Salmonidae* in the basin of the Kol River (western Kamchatka) // Journal of Ichthyology. 2015. V. 55. P. 397-424.
196. 王静波, 贾丽, 徐立蒲, 王小亮, 张文, 王姝, 曹欢. 引起虹鳟鱼苗大量死亡病因分析简. 中国水产. 2017. 12: 100-101. / Wang J., Jia L., Wang X., Zhang W., Wang Y., Cao H. Analysis of the cause of the large number of deaths of rainbow trout fry // Chinese Fisheries. 2017. V. 12. P. 100-101.
197. Lira S. A., Furtado G. C. The biology of chemokines and their receptors // Annual Review of Immunology. 2012. V. 54. P. 111-120.
198. Mahla R. S., Reddy M. C., Prasad D. V. R., Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology // Frontiers Immunology. 2013. V. 4. P. 248.

199. Zelensky A. N., Gready J. E. The C-type lectin-like domain superfamily // FEBS Journal. 2010. V. 272. P. 6179-6217.
200. Cambi A., Figdor C. Necrosis: C-Type Lectins Sense Cell Death // Current Biology. 2009. V. 19. P. 375-378.
201. Isacke ECM. The mannose receptor family // Biochimica et Biophysica Acta. 2002. V. 1572. P. 364-386.
202. Napper C. E., Drickamer K., Taylor M. E. Collagen binding by the mannose receptor mediated through the fibronectin type II domain // Biochemical Journal. 2006. V. 395. P. 579-586.
203. Xue H., Liu L., Zhao Z., Zhang Z., Tai G. The N-terminal tail coordinates with carbohydrate recognition domain to mediate galectin-3 induced apoptosis in T cells // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 49824-49838.
204. Kong P., Wang L., Zhang H., Song X., Zhou Z., Yang J., Qiu L., Wang L., Song L. A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity // Fish & Shellfish Immunology. 2011. V. 30. P. 836-844.
205. Su Y., Guo Z., Xu L., Jiang J., Wang J., Feng J. Identification of a cobia (*Rachycentron canadum*) CC chemokine gene and its involvement in the inflammatory response // Fish & Shellfish Immunology. 2012. V. 32. N. 1. P. 204-210.
206. Cheng Y., Wang R., Xu T. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) CXC chemokine gene resembling the CXCL9/CXCL10/CXCL11 // Fish & Shellfish Immunology. 2011. V. 31. N. 3. P. 439-445.
207. Puttharat B., Chongbo H., Eric P., Zhang S., Li P., Liu Z. Constitutive expression of three novel catfish CXC chemokines: homeostatic chemokines in teleost fish - ScienceDirect // Molecular Immunology. 2005. V. 42. P. 1355-1366.
208. Cuesta A., Dios S., Figueras A., Novoa B., Tafalla C. Identification of six novel CC chemokines in gilthead seabream (*Sparus aurata*) implicated in the

- antiviral immune response // *Molecular Immunology*. 2010. V. 47. P. 1235-1243.
209. Attar R., Agachan B., Kuran S. B., Cacina C., Isbir T. Association of CCL2 and CCR2 Gene Variants with Endometrial Cancer in Turkish Women // *Vivo*. 2010. V. 24. P. 243248.
210. Balashov K. E., Rottman J. B., Hancock W. W. W. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. V. 96. P. 6873-6878.
211. Wu C., Zhao X., Sarath B. V., Yuan G., Wang W., Su J., Liu X., Lin L. Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila* // *Fish & shellfish immunology*. 2018. V. 78. P. 52-59.
212. Madsen D H., Leonard D., Masedunskas A., Moyer A., Bugge T. H. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway // *Journal of Cell Biology*. 2013. V. 202. P.951-966.
213. Rossi, D., Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors // *Annual Review of Immunology*. 2000. V. 18. P. 217-242.
214. 何昕, 秦真东, 张凯, 梁日深, 杨森, 伍剑标, 赵丽娟, 林鑫. 苏丹鱼甘露糖受体的基因克隆表达和免疫特性. *水产学报*. 2020. 44 (3): 378-390. / He X., Qin Z., Zhang K., Liang R., Wu J., Zhao L., Lin L. Cloning, expression and immune features of Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*) mannose receptor // *Journal of Fisheries of China*. 2020. V. 44. N. 3. P. 378-390.
215. Zhao X., Liu L., Hegazy A. M., Wang H., Li J., Zheng F., Zhou Y., Wang W., Li J., Liu X., Lin L. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a

Ca²⁺-dependent manner // *Fish & Shellfish Immunology*. 2015. 43. P. 357-363

216. Li T., Guan S., Wang Q., Chen L., Zhang H. Soluble mannose receptor as a predictor of prognosis of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure // *World Journal of Gastroenterology*. 2019. V. 25. P. 5667-5675.