

УДК 574.62

ББК 47.2

<https://doi.org/10.21443/3034-1434-2024-2-3-64-82>



Развитие новых технологий защиты рыб от инфекций в условиях аквакультуры

Дун Сянли¹, Шилин М.Б.^{2✉}, Леонтьева Е.О.³

¹ Чжэцзянский океанический университет, Чжоушань, Китай

² ФГБОУ ВО «Российский государственный

гидрометеорологический университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

✉ shilin@rshu.ru

Аннотация. Интенсивное развитие аквакультуры ведет к нарастанию экологических проблем, среди которых наибольшую угрозу водной среде представляют распространение инфекционных заболеваний, а также использование антибиотиков и ряда противомикробных препаратов. Антибиотики используются во всех направлениях аквакультуры, и при этом возникает проблема загрязнения антибиотиками окружающей среды.

Новые технологии борьбы с болезнями рыб в условиях аквакультуры, основанные на вакцинации объектов культивирования, используются для того, чтобы заменить широко распространенное использование антибиотиков, отрегулировать баланс микробной среды в аквакультуре и в итоге избежать воздействия остатков лекарственных препаратов на здоровье человека.

Целью данного исследования является изучение молекулярных механизмов иммунного ответа организма рыб на вирусную инфекцию. Получены данные по изменению уровня экспрессии генов в различных органах рыб по мере развития болезни. Результаты исследования могут быть использованы при разработке вакцины против вибриоза, что поможет избежать применения большого количества антибиотиков, которые наносят ущерб среде обитания рыб и, как следствие, здоровью человека.

Ключевые слова: аквакультура, культивируемые объекты, иммунный ответ на вирусную инфекцию, экспрессия генов

Конфликт интересов: авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Дун Сянли, Шилин М.Б., Леонтьева Е.О. Развитие новых технологий защиты рыб от инфекций в условиях аквакультуры. *Арктика и инновации*. 2024;2(3):64–82. <https://doi.org/10.21443/3034-1434-2024-2-3-64-82>

Development of improved technologies for protecting fish from infections in aquaculture

Dong Xiangli¹, Shilin M.B.^{2✉}, Leonteva E.O.³

¹ Zhejiang Ocean University, Zhoushan, China

² Russian State Hydrometeorological University of St Petersburg, Russia

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St Petersburg, Russia

✉ shilin@rshu.ru

Abstract. The current intensification of marine aquaculture is inevitably associated with such environmental issues as growing infections and the need to apply antibiotic and other antimicrobial preparations. This leads to antibiotic pollution in the environment. Latest technologies aimed at preventing fish infections in aquaculture are based on the vaccination of the objects under cultivation. These technologies allow the use of antibiotics to be reduced and the balance of the microbial environment in aquaculture to be restored, eventually minimizing the negative effects of antibiotic residues on the human health. In this work, we set out to study molecular mechanisms underlying the immune response of fish to viral infections. Data on the expression of some genes of the most important aquaculture objects in Russia and China in response to infection and during its progression was obtained. The research results can be used when developing vaccines against vibriosis with the purpose of minimizing the application of medical preparations, such as antibiotics. These measures are important for maintaining healthy fish habitats and, as a consequence, the human health.

Keywords: aquaculture, cultivated species, immune response to a viral infection, genes expression

Conflict of interests: the authors report no conflict of interest.

For citation: Dong Xiangli, Shilin M.B., Leonteva E.O. Development of improved technologies for protecting fish from infections in aquaculture. *Arctic and Innovations*. 2024;2(3):64–82. <https://doi.org/10.21443/3034-1434-2024-2-3-64-82>

Актуальность темы исследований

В условиях нарастающей антропогенной нагрузки на водные экосистемы роль аквакультуры как неотъемлемой части мирового хозяйства становится все более значимой. Традиционно велика и постоянно возрастает роль аквакультуры в странах, обладающих достаточным запасом морских и пресноводных водоемов, пригодных для ее развития, таких как Россия и Китай [1].

Известно, что физиология и экология морских и пресноводных гидробионтов резко различаются [2–5]. Соответственно, существенны различия организации аквакультуры в морских и пресных водоемах. Это позволяет в качестве двух основных направлений аквакультуры выделять марикультуру — выращивание гидробионтов в морских водах — и лимнокультуру — культивирование пресноводных гидробионтов [2].

С появлением интенсивных промышленных рыбных хозяйств появились и проблемы, связанные с инфекционными заболеваниями рыб, которые наносят существенный вред рыбным хозяйствам и аквакультурному сектору мировой экономики в целом [1].

В проведенном исследовании проблема рассмотрена на примере двух важных объектов культивирования в Евразийском регионе, в том числе в условиях Крайнего Севера и Арктики — большого желтого горбыля и радужной форели.

Большой желтый горбыль (*Larimichthys crocea*, *Sciaenidae*) — рыба семейства горбылевых, один из основных 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 куль-

туре опасность представляют, в частности, бактериальные заболевания, возбудителями которых являются *Vibrio anguillarum* и *Vibrio harveyi*, в настоящее время серьезно ограничивающие развитие аквакультуры большого желтого горбыля.

Радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmonidae*) — холодноводная рыба семейства лососевых, один из основных объектов лимнокультуры в России (преимущественно в северных регионах). Она также подвержена бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям. Патогенная бактерия *Aeromonas salmonicida*, вызывающая аэромоноз, является для радужной форели наиболее распространенной инфекцией, которая может приводить 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 наносит вред водной среде и здоровью 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 наших знаний о фундаментальных основах противобактериального иммунитета культивируемых видов.

Данные основы включают в себя изучение противовоспалительных белков иммунной системы рыб. В связи с малой изученностью белков иммунного ответа у рыб, особенно у аквакультурных видов, мы считаем, что исследования модели заражения типичными для аквакультурных объектов инфекциями являются одним из важных начальных шагов в разработке новых подходов к их лечению и профилактике. Такими белками, например, являются хемокины (CCL) и маннозные рецепторы (MRC). Эти белки играют центральную роль в организме рыб и выполняют ключевые функции: от связывания патогенов до клеточного сигналинга в различных провоспалительных процессах [6, 7].

В настоящем исследовании на основе собранных новых данных по изучению ак-

тивации этих генов у двух аквакультурных видов рыб в ответ на бактериальные инфекции мы разрабатываем преемственность моделей в обеспечении дальнейшего их тестирования для определения эффективности будущих новых биологически активных компонентов, укрепляющих их иммунитет [8]. Целью данного исследования является изучение на молекулярном уровне реакций специфического иммунного ответа важных аквакультурных видов рыб Китая и России *L. crocea* и *O. mykiss* в моделях их распространенных инфекционных заболеваний.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи: установить особенности и взаимосвязи «структура–функция» *in silico* первичных и пространственных структур хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 коммерчески важных промысловых и культивируемых видов рыб Китая (*L. crocea*) и России (*O. mykiss*); создать *in vivo* модели вибриоза *L. crocea* и аэромоноза *O. mykiss* в условиях аквакультуры; изучить уровни и локализацию экспрессии генов специфического иммунного ответа на примере хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме и в модели вибриоза *L. crocea*; соотнести локализацию и уровни экспрессии генов неспецифического иммунного ответа на примере маннозных рецепторов MRC1, MRC2 в созданных моделях патологий.

Для выполнения запланированного исследования использовали два взаимодополняющих методических подхода. С одной стороны, это фундаментальное изучение исследуемых белков иммунной системы рыб — хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4, а также маннан-связывающих рецепторов MRC1 и MRC2: изучение особенностей их первичных и пространственных структур современными методами биоинформатики и 3D-моделирования. С другой — практическое изучение их уровней экспрессии в норме и патологии в моделях различных бактериальных инфекций на тепловодном промысловом виде водоемов Китая (*L. crocea*) и холодноводном виде водоемов России (*O. mykiss*). Применение комбинированных методов исследования позволяет комплексно рассмотреть ряд особенностей иммунологии рыб и, в частности, сравнить реакции белков иммунной системы холодноводных и тепловодных видов.

В результате выполненного исследования впервые установлены взаимосвязи между структурой-функцией белков иммунной системы ключевых аквакультурных видов рыб Китая и России; созданы действующие модели бактериальных инфекций в экспериментальных условиях; установлены фактические уровни экспрессии белков иммунной системы в норме и патологии в динамике.

Материалы и методы исследования

Анализ первичных последовательностей исследуемых белков был произведен с помощью программ SMART; 3D-модели белков построили, используя онлайн-сервер SWISS-MODEL и PyMol.

Эксперименты проводили на рыбах *Larimichthys crocea* (Китай) и *Oncorhynchus mykiss* (Россия). Для заражения рыб модельными заболеваниями вибриоза и аэроманоза использовали бактериальные культуры *Vibrio anguillarum* (для *L. crocea*) и *Aeromonas salmonicida* (для *O. mykiss*) соответственно. Фиксирование тканей производили в растворе для консервирования образцов РНК (CW0592B, Kangwei Century, Китай). РНК из тканей и органов выделяли с помощью реагента TRIzol RNA Isolation Reagents (артикул: 9108-1, Takara, Япония); кДНК синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК (cDNA Synthesis Kit) (H6110A, Takara, Япония); дизайн праймеров для ПЦР и ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием программного обеспечения Primer 5.0 (<http://primer3.ut.ee/>); ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) проводили с использованием набора премиксов SYBR ExTaq (Takara, Япония). Статистическую обработку осуществляли в программе амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Prism® 7500, Американские прикладные биосистемы).

Анализ первичных и пространственных структур целевых белков исследуемых рыб

Организация первичной и пространственной структур хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 *L. crocea*

Кодирующая последовательность (кДНК) CCL2 (GenBank ID: MN125657) состоит из 294 пар оснований (п. о.) и 97 аминокис-

лотных остатков (а. о.) (рис. 1 А). 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.) (рис. 1 Б). Согласно построенной теоретической трехмерной модели, структура включает в себя три антипараллельных β -листа и одну α -спираль на С-конце (рис. 1 В). В SCY-домеене есть четыре остатка цистеинов, среди которых два последовательных (CC), идущих друг за другом в первичной последовательности (рис. 1 А, В). Эти четыре остатка цистеина образуют две внутренние дисульфидные связи и необходимы для поддержания биологической активности.

Второй охарактеризованный нами хемокин — CCL3. Его кДНК (GenBank ID: MN125658) состоит из 309 п. о. и 102 а. о. Как и в CCL2, в CCL3 тоже есть четыре остатка цистеина, из которых два являются смежными в первичной структуре (рис. 2 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 — трансмембранный домен (9–31 а. о.), третий — домен SCY (32–90 а. о.) (рис. 2 Б). Все четыре остатка цистеина находятся в домене SCY, которые также образуют внутримолекулярные дисульфидные связи, необходимые для нормального функционирования хемокина (рис. 2 А, В). CCL3 тоже имеет три антипараллельных β -листа и 1 α -спираль на С-конце (рис. 2 В).

CCL4 кДНК (GenBank ID: MN125659) которого состоит из 274 п. о., кодирующих 91 а. о. Его расчетный молекулярный вес — 10,3 кДа, значение pI: 9,17. В CCL4 тоже есть четыре остатка со схожими местоположениями (рис. 3 А). Как и CCL2, CCL4 имеет два домена: первый представляет собой трансмембранный домен (5–27 а. о.), второй — SCY домен (28–86 а. о.), в котором располагаются критически важные четыре остатка цистеина (рис. 3 Б, В).

Как и в предыдущих двух хемокинах, в CCL4 тоже имеется три антипараллельных β -листа и одна α -спираль на С-конце (рис. 3 В).

Larimichthys crocea-CCL2

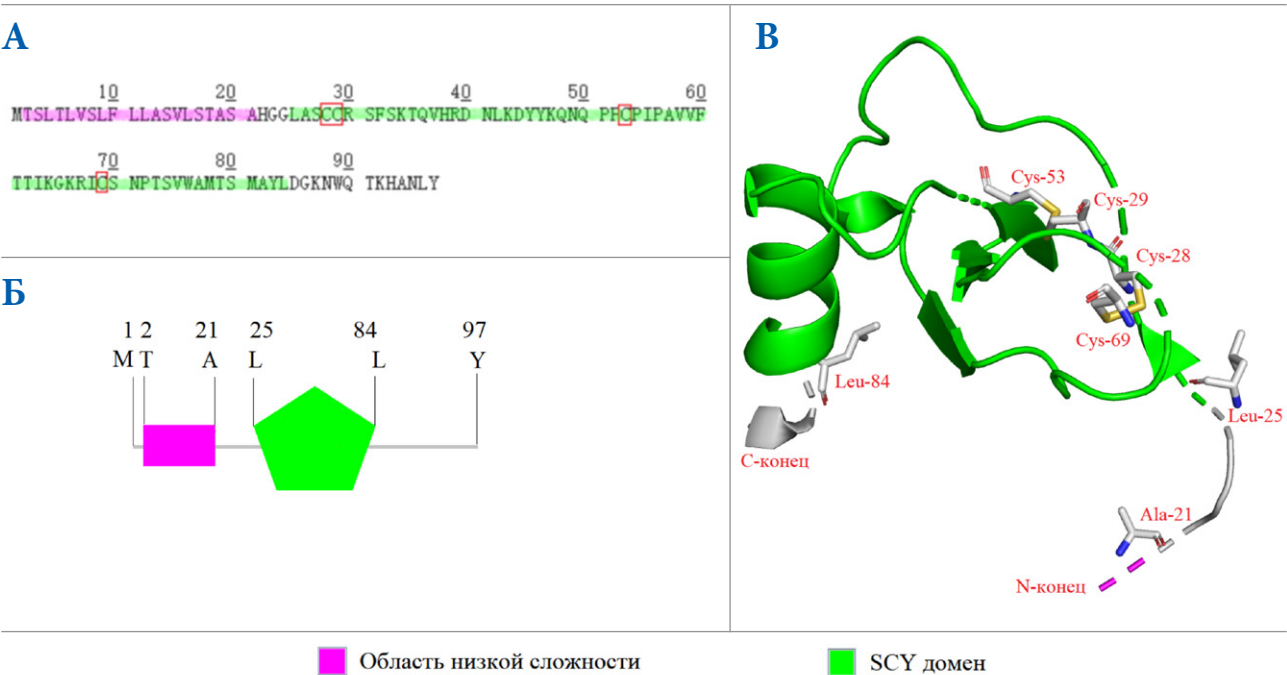


Рис. 1. Теоретические модели первичной и пространственной структур CCL2 *L. crocea*. Аминокислотная последовательность CCL2 *L. crocea* (A) и схема расположения доменов в структуре CCL2 (Б); C — трехмерная теоретическая модель CCL2 с обозначенными критически важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены CCL2

Fig. 1. Theoretical models of the primary and spatial *L. crocea* CCL2 structures. Amino acid sequence of *L. crocea* CCL2 (A) and a scheme of domain location in the CCL2 structure (Б); C — 3D theoretical model of CCL2 with the labeled essential amino acids. The structural domains of CCL2 are indicated by a color.

Larimichthys crocea-CCL3

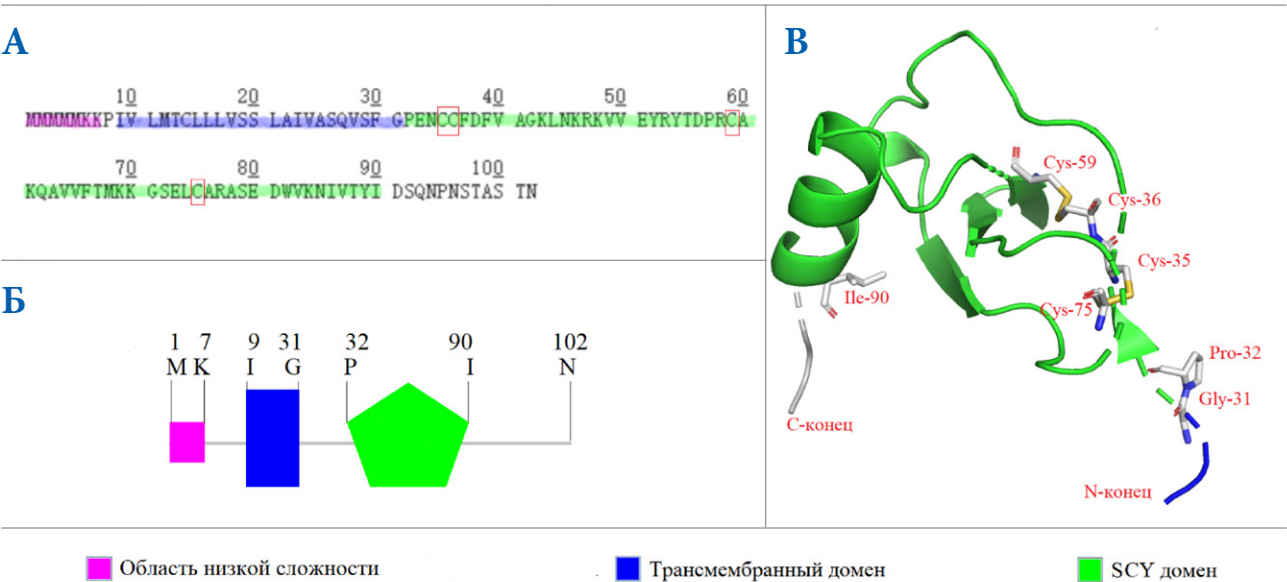


Рис. 2. Теоретические модели первичной и пространственной структур CCL3 *L. crocea*. Аминокислотная последовательность CCL3 *L. crocea* (A) и схема расположения доменов в структуре CCL3 (Б); C — трехмерная теоретическая модель CCL3 с обозначенными критически важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены CCL3

Fig. 2. Theoretical models of the primary and spatial *L. crocea* CCL3 structures. Amino acid sequence of *L. crocea* CCL3 (A) and a scheme of domain location in the CCL3 structure (Б); C — 3D theoretical model of CCL3 with the labeled essential amino acids. Structural domains of CCL3 are indicated by a color.

Larimichthys crocea-CCL4

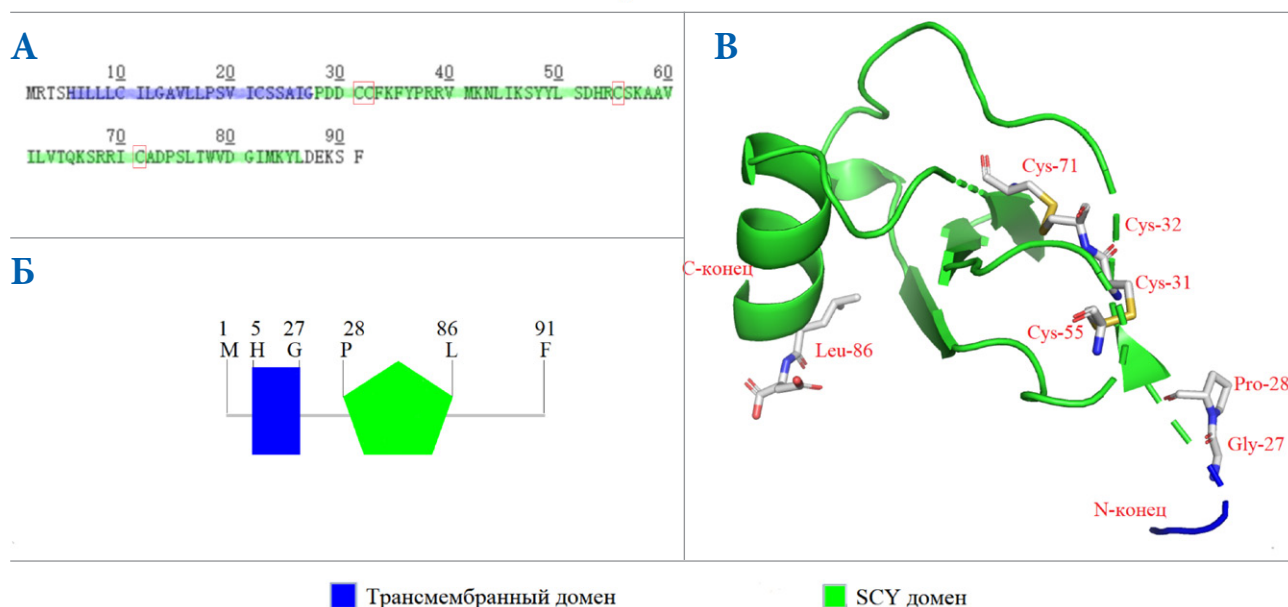


Рис. 3. Теоретические модели первичной и пространственной структуры CCL4 *L. crocea*. Аминокислотная последовательность CCL4 *L. crocea* (А) и схема расположения доменов в структуре CCL4 (Б); С — трехмерная теоретическая модель CCL4 с обозначенными критически важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены CCL4

Fig. 3. Theoretical models of the primary and spatial *L. crocea* CCL4 structures. Amino acid sequence of *L. crocea* CCL4 (А) and a scheme of domain location in the CCL4 structure (Б); С — 3D theoretical model of CCL4 with the labeled essential amino acids. The structural domains of CCL4 are indicated by a color.

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 остатка цистеина. Доменная структура остальных хемокинов имеет некоторые различия. Так, в отличие от CCL2, CCL3 и CCL4 имеют в своей структуре трансмембранный домен. Однако CCL2 обладает областью низкой сложности (Low complicity region), обычно эта область не несет значимых доменов.

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 -листах, а на С-конце есть спираль, почти перпендикулярная α -листу.

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.

Особенности строения маннозных рецепторов MRC1, MRC2 *L. crocea* и *O. mykiss*

Кодирующая последовательность MRC1 (кДНК) *L. crocea* (GenBank ID: AKH05366). Она кодирует 19 596 п. о., что соответствует 1492 а. о. Его предсказанный молекулярный вес — 63,5 кДа, 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.) (рис. 4 А). В последовательности белка MRC1 есть остаток триптофана в богатом цистеином домене (рис. 5 А). В домене CTLD обнаружены четыре двойных гидрофобных лейцина (LL) (рис. 5 А)

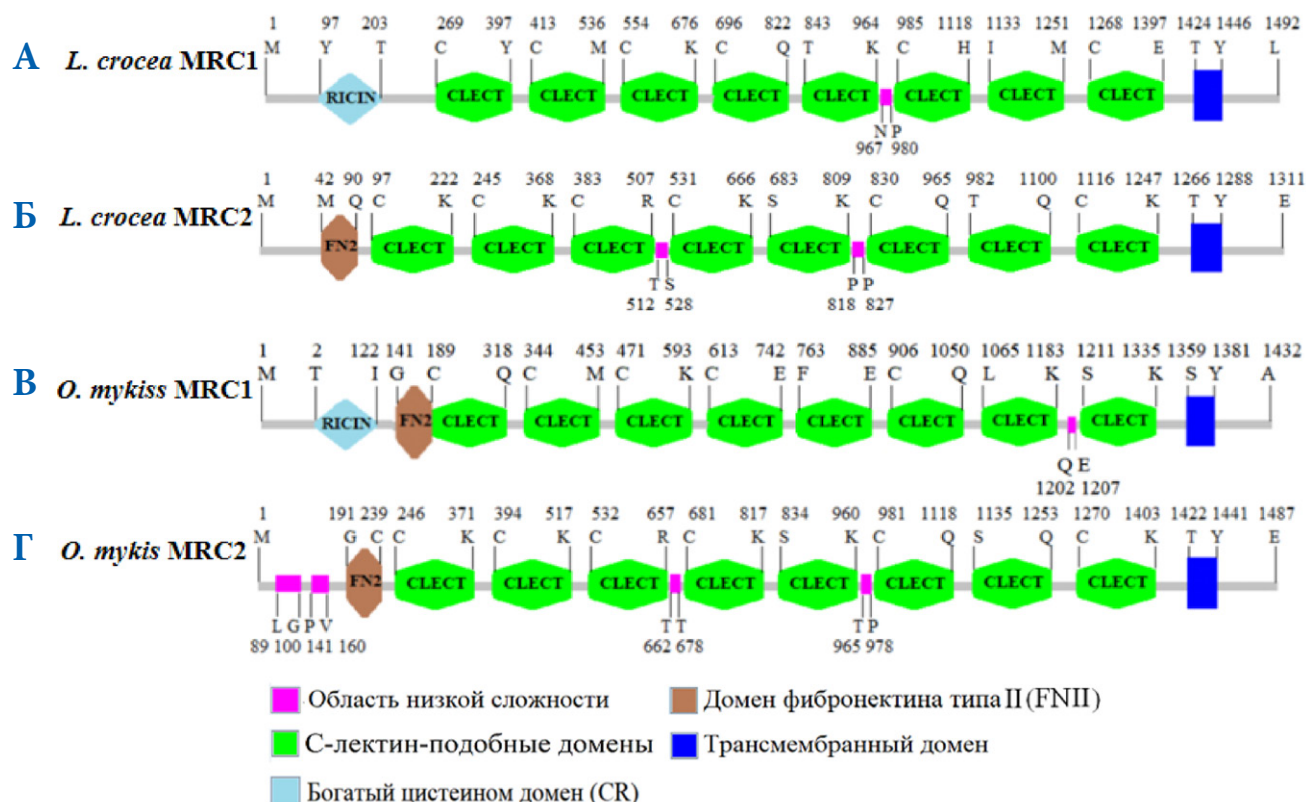


Рис. 4. Схема расположения доменов в структуре MRC1 (А, В) и MRC2 (Б, Г) *L. crocea* и *O. mykiss*. Цветом обозначены структурные домены MRC1 *L. crocea* и *O. mykiss*

Fig. 4. Domain location in the MRC1 (A, B) and MRC2 (Б, Г) structure of *L. crocea* and *O. mykiss*. The color indicates structural domains of MRC1 of *L. crocea* and *O. mykiss*

и остаток аспарагиновой кислоты (рис. 5 А). Также в каждом домене CTLD есть 4 цистеина. Также в CTLD4 был обнаружен критический домен распознавания углеводов (CRD) EPN (Glu-Pro-Asn) (рис. 5 А).

Второй охарактеризованный нами рецептор маннозы — MRC2 *L. crocea*. Его кДНК (GenBank ID: AKH05367) состоит из 1331 а. о. и 17 679 п. о. Его предсказанный молекулярный вес — 168,09 кДа, теоретическое значение pI: 5,83. Основные функциональные домены его белковой структуры отличаются от таковых у *L. crocea* MRC1. 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.) (рис. 4 Б). В последовательности MRC2 связующий участок коллагена — домен FNII содержит ароматические 4 остатка фенилаланина и 3 остатка триптофана (рис. 5 Б). Область CTLD аминокис-

лотной последовательности MRC2 имеет два CRD домена для узнавания углеводов (рис. 5 Б). Кроме того, в аминокислотной последовательности MRC2 были обнаружены два двойных гидрофобных лейцинов (LL) и большое количество а. о. аспарагиновой кислоты (D) (рис. 5 Б). Также в домене CTLD есть 4 цистеина.

Кодирующая последовательность (кДНК) MRC1 *O. mykiss* (GenBank ID: 110508267) состоит из 4408 п. о. и 1432 а. о. Через онлайн-сервер ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) спрогнозированы следующие параметры: молекулярный вес (162,4 кДа) и теоретическое значение pI (5,61). Анализ первичной последовательности показывает, что белок MRC1 имеет один RICIN (домен богатый цистеином) (2–122 а. о.), один домен FNII (домен фибронектина типа II) (141–189 а. о.), 8 лектиновых доменов С-типа (CTLD1 — 189–318 а. о., CTLD2 — 344–453 а. о., CTLD3 — 471–593 а. о., CTLD4 — 613–742 а. о., CTLD5 — 763–885 а. о., CTLD6 — 906–1050 а. о., CTLD7 — 1065–11183 а. о., CTLD8 — 1211–1335 а. о.) (рис. 4 В). В последовательности

MRC2 связующий участок коллагена — домен FNII содержит ароматические 3 остатка фенилаланина и 3 остатка триптофана (рис. 5 В). Область CTLD4 аминокислотной последовательности MRC2 имеет один CRD домена для узнавания углеводов (рис. 5 В). Кроме того, в аминокислотной последовательности MRC2 были обнаружены три полностью консервативных двойных гидрофобных лейцина (LL) и большое количество консервативных а. о. аспарагиновой кислоты (D) (рис. 5 В). Также в каждом домене CTLD есть 4 или 5 полностью консервативных цистеина (рис. 5 В).

Второй охарактеризованный нами рецептор маннозы — MRC2 *O. mykiss*. Его кДНК (GenBank ID: XP_021480466.1) состоит из 5568 п. о. и соответствующих им 1487 а. о. В последовательности *O. mykiss* есть три основных консервативных функциональных домена: фибронектина типа II (191–239 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.) (рис. 4 Г) и один трансмембранный домен

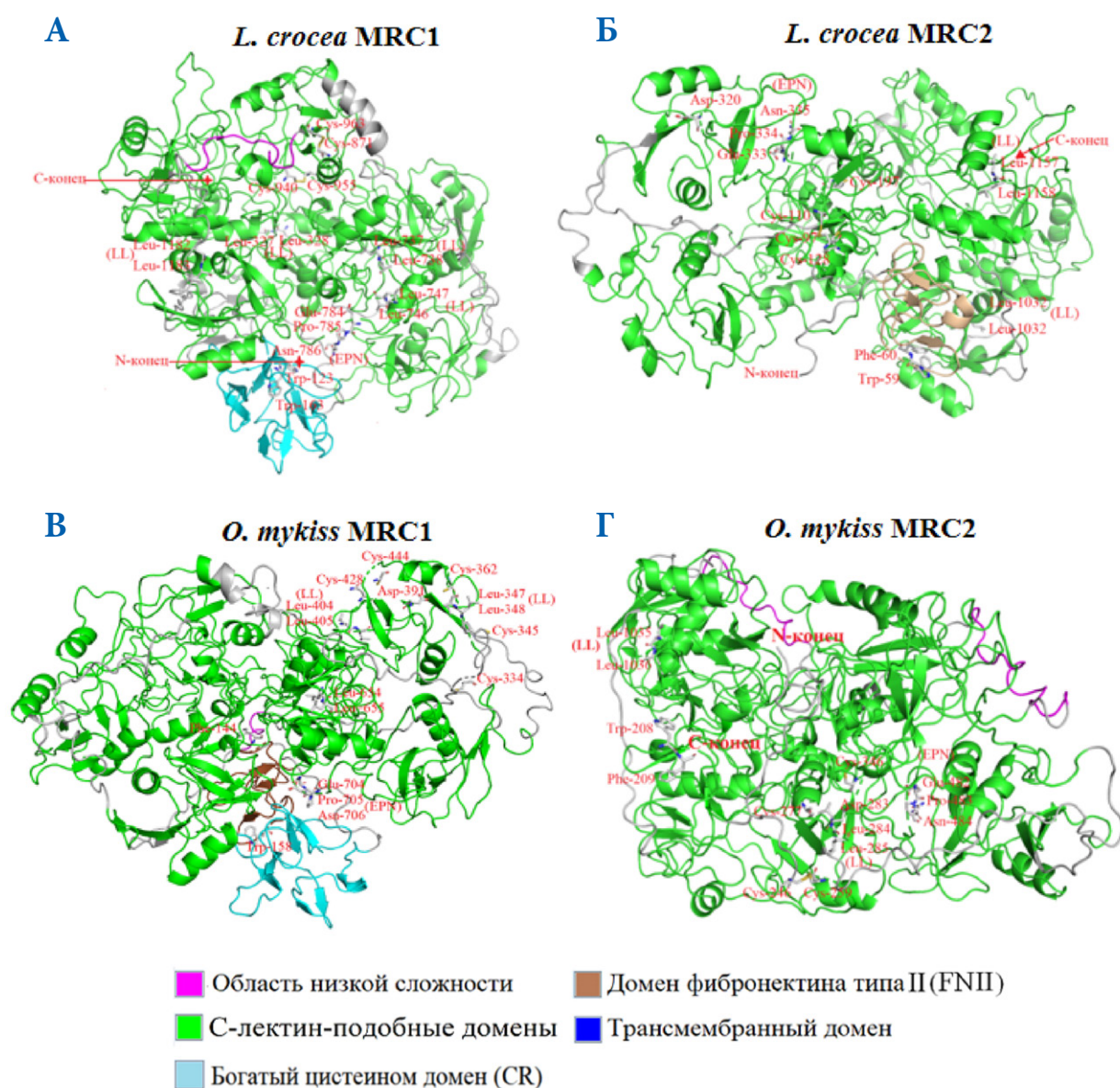


Рис. 5. Трехмерная теоретическая модель MRC1 (А, В) и MRC2 (Б, Г) *L. crocea* и *O. mykiss* с обозначенными критически важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены MRC1 *L. crocea* и *O. mykiss*

Fig. 5. 3D theoretical model of MRC1 (A, B) and MRC2 (Б, Г) of *L. crocea* and *O. mykiss* with the labeled essential amino acids. The structural domains of MRC1 of *L. crocea* and *O. mykiss* are indicated by a color.

(1422–1441 а. о.). Предсказанный молекулярный вес белка — 168,1 кДа, а теоретическое значение pI — 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 домен распознавания углеводов (CRD) (EPN — Glu-Pro-Asn) (рис. 5 Г). Кроме того, в аминокислотной последовательности MRC2 были обнаружены двойной гидрофобный лейцин (LL) и кислый аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты, также как и в предыдущем охарактеризованном нами MRC1 (рис. 5 Г).

В данном исследовании мы провели анализ последовательностей и структур кДНК MRC1 и MRC2 у *L. crocea* и *O. mykiss*. Аминокислотные последовательности MRC1 и MRC2, как и рецепторы маннозы других видов, имеют высококонсервативные структурные области, типичные характеристики семейства рецепторов маннозы, что указывает на то, что MRC1 и MRC2 являются членами суперсемейства лектинов С-типа. Лектины С-типа — это один из классов лектинов со специфическим углевод-связывающим белковым доменом. Особенностью лектинов этого класса является необходимость присутствия кальция для их связывания с лигандом. Белки, содержащие лектиновые домены С-типа, выполняют широкий спектр функций, включая клеточную адгезию, иммунный ответ на патогены и апоптоз.

У всех исследованных последовательностей MRC есть общий важный структурных домен — CTLD. В этом домене у белка MRC1 имеется богатый цистеином регион (CR) в отличие от остальных трех исследованных белков. Домен CR ассоциирован с процессом связывания углеводов благодаря способности активного центра к их распознаванию. Также в MRC2 *L. crocea* и *O. mykiss* есть FNII домен. Такой домен является наиболее консервативным доменом в семействе MRC и обладает свойством связываться с коллагеном. MRC1 и MRC2 имеют некоторые структурные различия. Это можно увидеть из схемы структуры белка. Например, у MRC1 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 рецепторов имеют схожие домены, но играют в клетках разные роли. MRC1 в основном участвует в врожденном иммунном ответе, а MRC2 также участвует в иммунном ответе, но согласно данным и предположениям этого исследования, его главная функция может заключаться в основном в опосредованной деградации лизосомного коллагена.

В последовательностях MRC1 и MRC2 *O. mykiss* и *L. crocea* есть похожие функциональные остатки аминокислот. Так, есть консервативный кислотный аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты. При интернализации лиганда и миграции ранних эндосом в клетке играет роль именно этот остаток, без которого этот функциональный сайт молекулы инертен. Кроме того, у *O. mykiss* и *L. crocea* MRC1 и MRC2 были обнаружены спаренные гидрофобные остатки лейцина (LL) и консервативный аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты, необходимый для интернализации лиганда, а также для миграции ранних эндосом внутри клетки для функционирования необходимы два вышеуказанных функциональных сайта. Присутствие триптофанов (рис. 5 А, Б, В, Г) в сайте связывания коллагена аминокислотной последовательности MRC1 и MRC2 *L. crocea* и MRC2 *O. mykiss* позволяет белкам обладать способностью к связыванию коллагена. В последовательности MRC2 обеих рыб в сайте связывания коллагена содержится фенилаланин, отсутствующий в обеих последовательностях MRC1. Область CTLD аминокислотных последовательностей MRC1 и MRC2 имеет консервативный домен распознавания углеводов (CRD) (EPN Glu-Pro-Asn), который специфически связывается с маннозой, что указывает на то, что он может обладать активностью связывания углеводов. Приведенные выше результаты показывают, что сходство последовательностей MRC2 *O. mykiss* и *L. crocea* является относительно высоким, а функциональные аминокислотные остатки относительно схожи, поэтому можно сделать вывод, что биологические функции двух белков относительно схожи. Однако эти активные сайты нуждаются в дальнейших экспериментах для проверки в будущем.

Паттерны экспрессии генов иммунных белков *L. crocea*

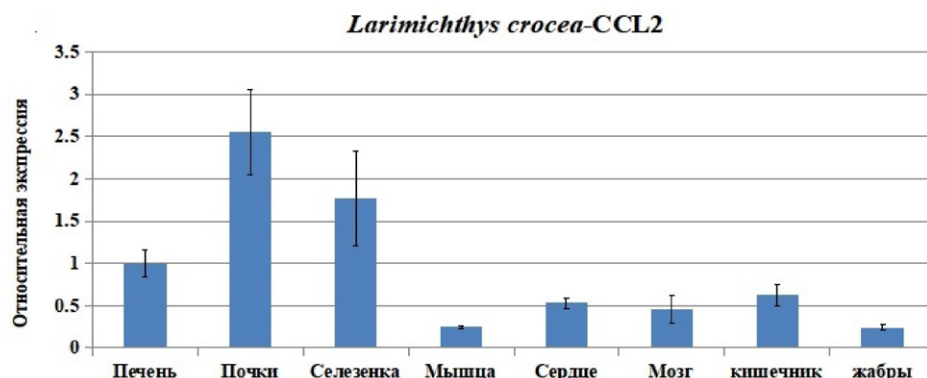
Распределение уровней мРНК хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме

Экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 была обнаружена во всех восьми проанализированных органах: печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах.

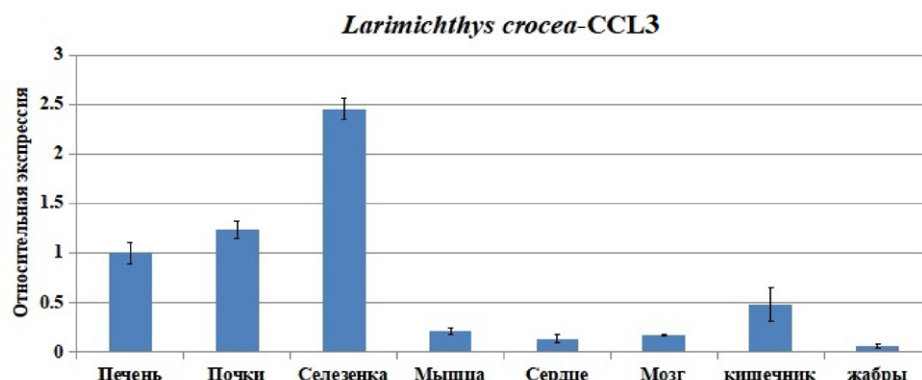
рах перед заражением *Vibrio anguillarum*. Экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 в печени, почках и селезенке была значительно выше, чем в других органах (рис. 6 А, Б, В).

В этом эксперименте CCL2, CCL3 и CCL4 *L. crocea* также были обнаружены в печени, почках, селезенке, сердце, мышцах, кишечнике, мозге и жабрах. Показано, что большинство хемокинов рыб экспрессируются в широком

А



Б



В

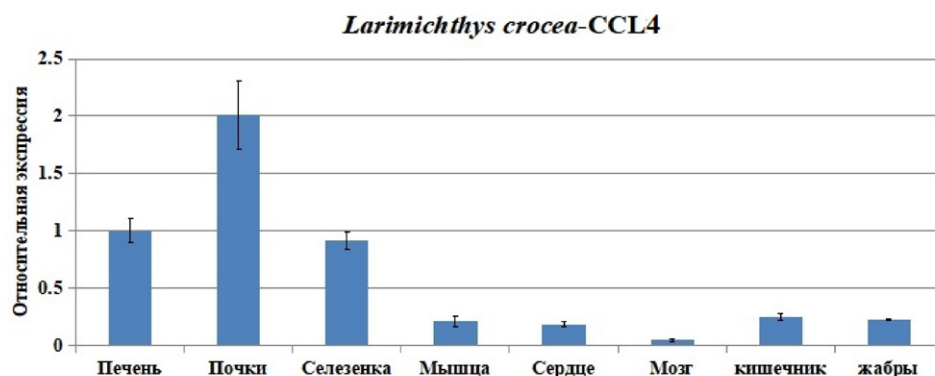


Рис. 6. Распределение уровней экспрессии мРНК CCL2 (А), CCL3 (Б) и CCL4 (В) перед заражением *V. anguillarum* в печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах, полученное методом ПЦР в реальном времени. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 6. Distribution of CCL2 (A), CCL3 (Б), and CCL4 (В) mRNA expression levels prior to *V. anguillarum* infection in the liver, kidney, spleen, muscle, heart, brain, intestine, and gills obtained by real-time PCR. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; $n = 3$ / group / time period

спектре. 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.

Распределение хемокинов в разных тканях в норме различно. Однако большинство хемокинов в основном экспрессируются в тканях, связанных с иммунитетом (печень, почки и селезенка). 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.

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 препарат Poly I:C, вызывающий неспецифическое воспаление.

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии CCL2, CCL3 и CCL4 в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рис. 7). 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 достигло 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.

После экспериментального 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. Показано, что иммунологические эффекты CCL у *L. crocea* слабее, чем у других рыб, что может быть механизмом повышенной инфекционности *L. crocea*.

Эти результаты показали, что хемокины CCL2, CCL3, CCL4 оказывают 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.

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. И CCL17, CCL21 и CCL24 считаются двойными хемокинами, а также гомеостатическими хемокинами. Так, изменения экспрессии CCL21 в печени, почках и селезенке после заражения *V. anguillarum* не были 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:

Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в норме

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

Экспрессия мРНК MRC1 и MRC2 была обнаружена во трех проанализированных органах: печени, почках и селезенке перед заражением *V. anguillarum*. Экспрессия мРНК

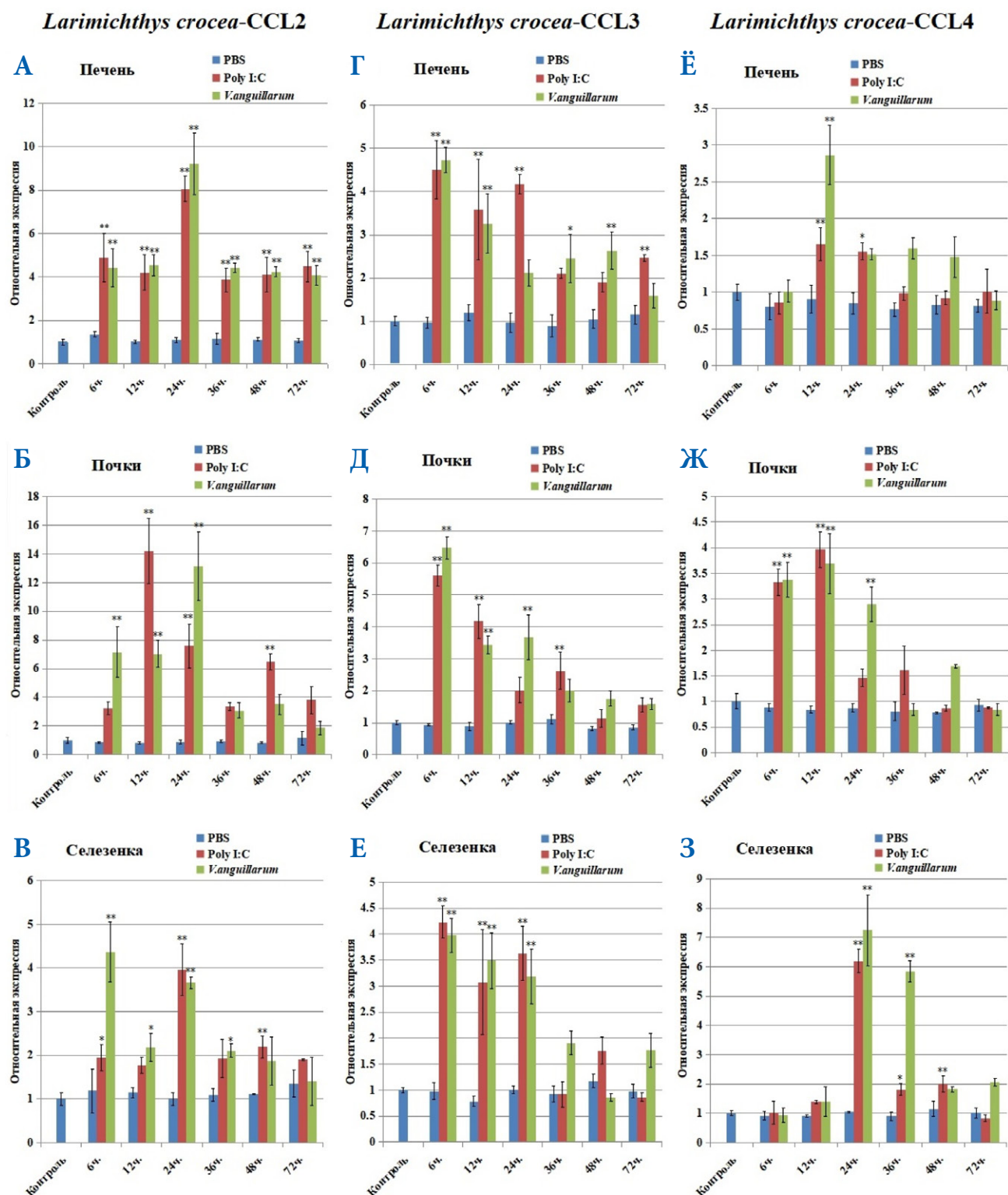


Рис. 7. Результаты ПЦР в реальном времени экспрессии в динамике хемокинов *L. crocea* в печени, почках и селезенке после введения PBS (отрицательный контроль), Poly I:C (положительный контроль наличия воспаления) и *V. anguillarum*. А, Б, В — CCL2; Г, Д, Е — CCL3; Е, Ж, З — CCL4 в тканях печени, почек и селезенки после заражения *V. anguillarum*, Poly I: C и PBS. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; звездочки над полосами представляют собой статистически значимые отличия от контрольных образцов; * — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,01$, $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 7. Real-time PCR of dynamic expression of *L. crocea* chemokines in the liver, kidney, and spleen after administration of PBS (negative control), Poly I:C (positive control for the presence of inflammation), and *V. anguillarum*. А, Б, В — CCL2; Г, Д, Е — CCL3; Е, Ж, З — CCL4 in the liver, kidney, and spleen tissues after infection with *V. anguillarum*, Poly I:C, and PBS. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; asterisks above bars represent statistically significant differences from control samples; * — at $p < 0.05$, ** — at $p < 0.01$, $n = 3$ / group / time period

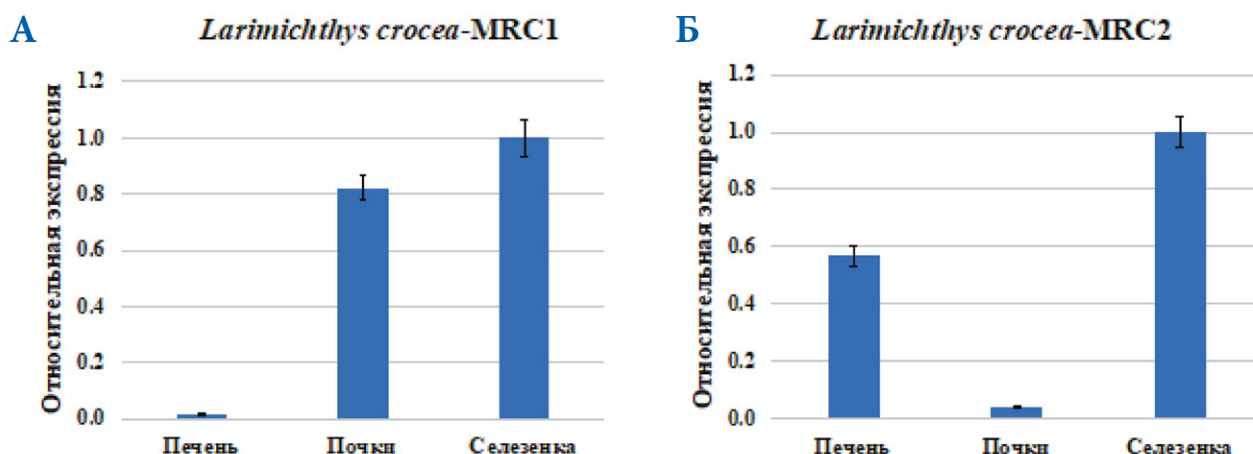


Рис. 8. Результат RT-PCR экспрессии мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) перед заражением *V. anguillarum* в ткани печени, почек, селезенки у *L. crocea*. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 8. RT-PCR result of MRC1 (A) and MRC2 (B) mRNA expression prior to *V. anguillarum* infection in the liver, kidney, and spleen tissue in *L. crocea*. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; $n = 3$ / group / time period

MRC1 и MRC2 в печени, почках и селезенке была значительно выше нормы (рис. 8 А, Б).

Показано, что для разных генов максимальные значения экспрессии появляются в разных органах в зависимости от основных биологических функций генов.

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 (рис. 9 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 рецепторов маннозы была существенно повышена по сравнению с контролем, в 24–36 часов относительная экспрессия достигла максимальных значений (рис. 9 А, Б, В). Но уровни экспрессии мРНК MRC2 разнятся с мРНК MRC1: накопление продуктов экспрессии MRC2 происходит только спустя 24–36 часов после заражения (рис. 9 Г, Д, Е), а MRC1 экспрессировался уже спустя 6 часов во всех исследованных органах (рис. 9 А, Б, В). Очевидно, это связано с особенностями экспрессии этого рецептора при системном воспалении. В промежутке между 36 и 48 часами и до конца

эксперимента наблюдалось общее снижение уровней мРНК рецепторов маннозы (рис. 9 А, Б, В, Г, Д, Е). Что касается введенного неспецифического агента Poly I:C, для мРНК MRC1 за 12 часов в трех органах относительная экспрессия достигла максимальных значений, а для мРНК MRC2, как после заражения *V. anguillarum*, за 6 часов в трех органах острая фаза воспаления была уже пройдена и экспрессия всех трех рецепторов маннозы была существенно повышена по сравнению с контролем (рис. 9 Г, Д, Е).

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 рецепторы маннозы участвуют в иммунитете рыб против бактериальной инфекции, что согласуется с общемировой литературой.

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

На основе полученных данных, уровни экспрессии в печени, почках и селезенке в органах *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* были значительно увеличены,

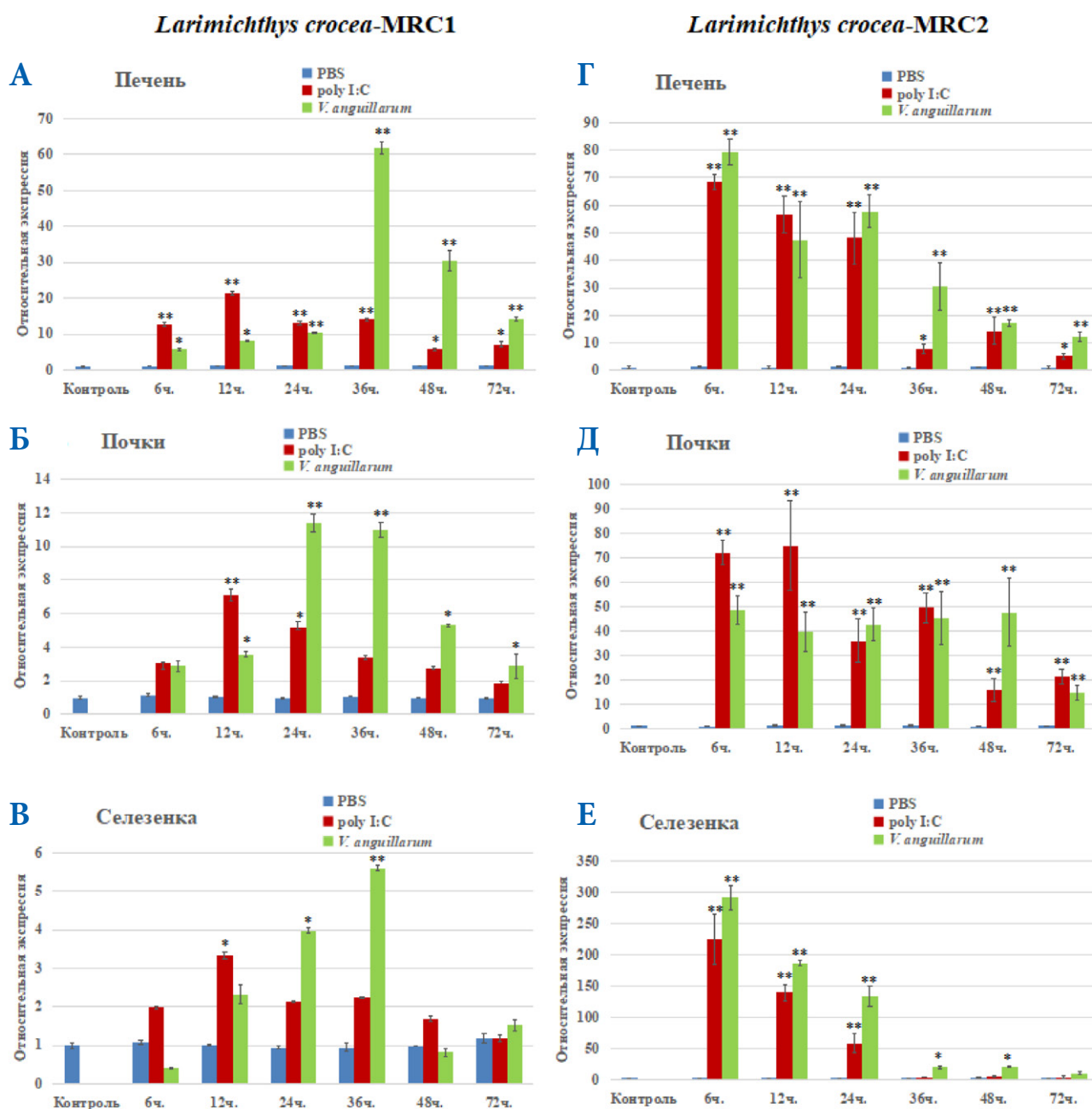


Рис. 9. Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у *L. crocea* в печени, почках и селезенке после заражения *V. anguillarum*, Poly I: C и PBS. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; звездочки над полосами представляют собой статистически значимые отличия от контрольных образцов; * — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 9. MRC1 (A, Б, В) and MRC2 (Г, Д, Е) mRNA expression in *L. crocea* liver, kidney, and spleen after infection with *V. anguillarum*, Poly I: C and PBS. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; asterisks above bars represent statistically significant differences from control samples; * — at $p < 0.05$, ** — at $p < 0.01$; $n = 3$ / group / time period

что указывает на то, что гены рецепторов маннозы 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 противоинфекционного иммунного ответа рыб и для контроля болезни большого желтого горбыля.

Анализ экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 в печени, почках и селезенке у *L. crocea* после заражения *V. anguillarum* показал, что кривая экспрессии MRC1 отличается от кривой экспрессии MRC2. Для мРНК MRC1 относительная экспрессия в печени, почках и селезенке сначала медленно увеличивалась в течение 24 и 48 часов, изменение относительной экспрессии достигло максимального значения,

а затем экспрессия медленно снижалась. Но для мРНК MRC2 относительное изменение экспрессии в печени, почках и селезенке в течение 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.

Паттерны экспрессии генов иммунных белков *O. mykiss*

Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в норме

Предварительная оценка уровней экспрессии генов рецепторов маннозы была проведена для понимания общих нормальных (фоновых) уровней экспрессии рецепторов маннозы 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 была самой высокой в селезенке, а экспрессия мРНК MRC2 — в печени (рис. 10 А, Б).

мРНК MRC рыб широко экспрессируется во многих органах, особенно в почках и селезенке, и играет важную роль в бактериальном иммунном ответе [1–9].

Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 в модели аэромоноза

Во время вскрытия рыб в конечных точках эксперимента была проведена морфологическая оценка их состояния в сравнении с контролем. После заражения *A. salmonicida* ssp. изменение поверхности тела *O. mykiss* было неочевидно, но 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. 11 А, Б, В, Г, Д, Е). Проведена ПЦР в реальном времени исследованных органов (печень, почки, селезенка) для мРНК MRC1 *O. mykiss* в различных временных точках. Для MRC1 в почках и селезенке (рис. 11 Б, В) и для MRC2 в печени и селезенке было обнаружено (рис. 11 Г, Е), что острая фаза воспаления наступала спустя 24–36 часов после начала эксперимента: экспрессия рецепторов маннозы была существенно повышена по сравнению с контролем, в 24–36 часов относительная экспрессия достигла максимальных значений (рис. 11 Б, В, Г, Е).

Спустя 24 часа от начала заражения наблюдалось временное повышение экспрессии MRC1 в почках (рис. 11 Б), в то время как в печени его экспрессия снизилась (рис. 11 А). После этой переломной точки в экспрессии наблюдалась вторая волна экспрессии MRC1 в печени в точках 36 и 48 ч (рис. 11 А). Этот феномен требует

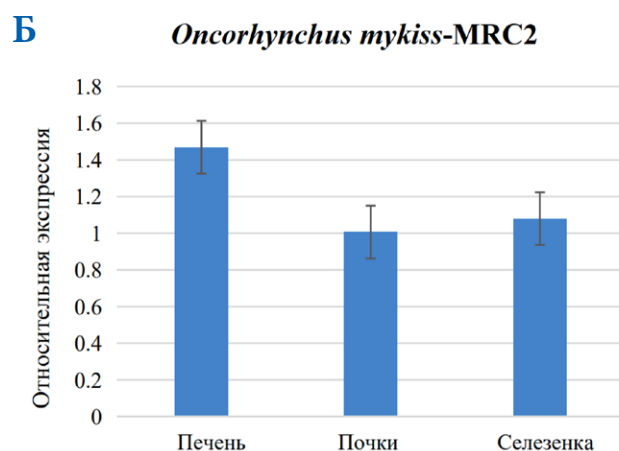
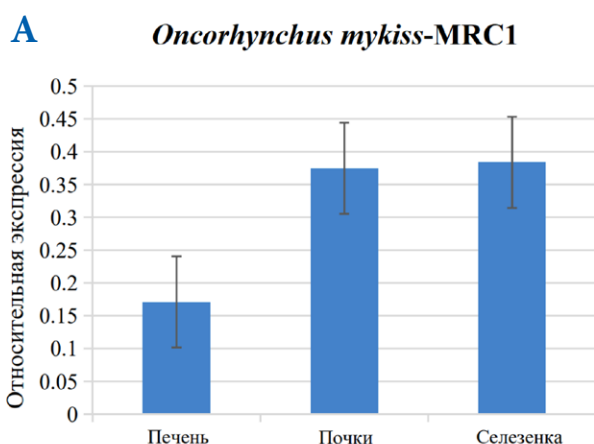


Рис. 10. Экспрессия мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) в печени, почках и селезенке здоровых образцов у *O. mykiss*. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 10. MRC1 (A) and MRC2 (B) mRNA expression in the liver, kidney, and spleen of healthy *O. mykiss* specimens. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; $n = 3$ / group / time period

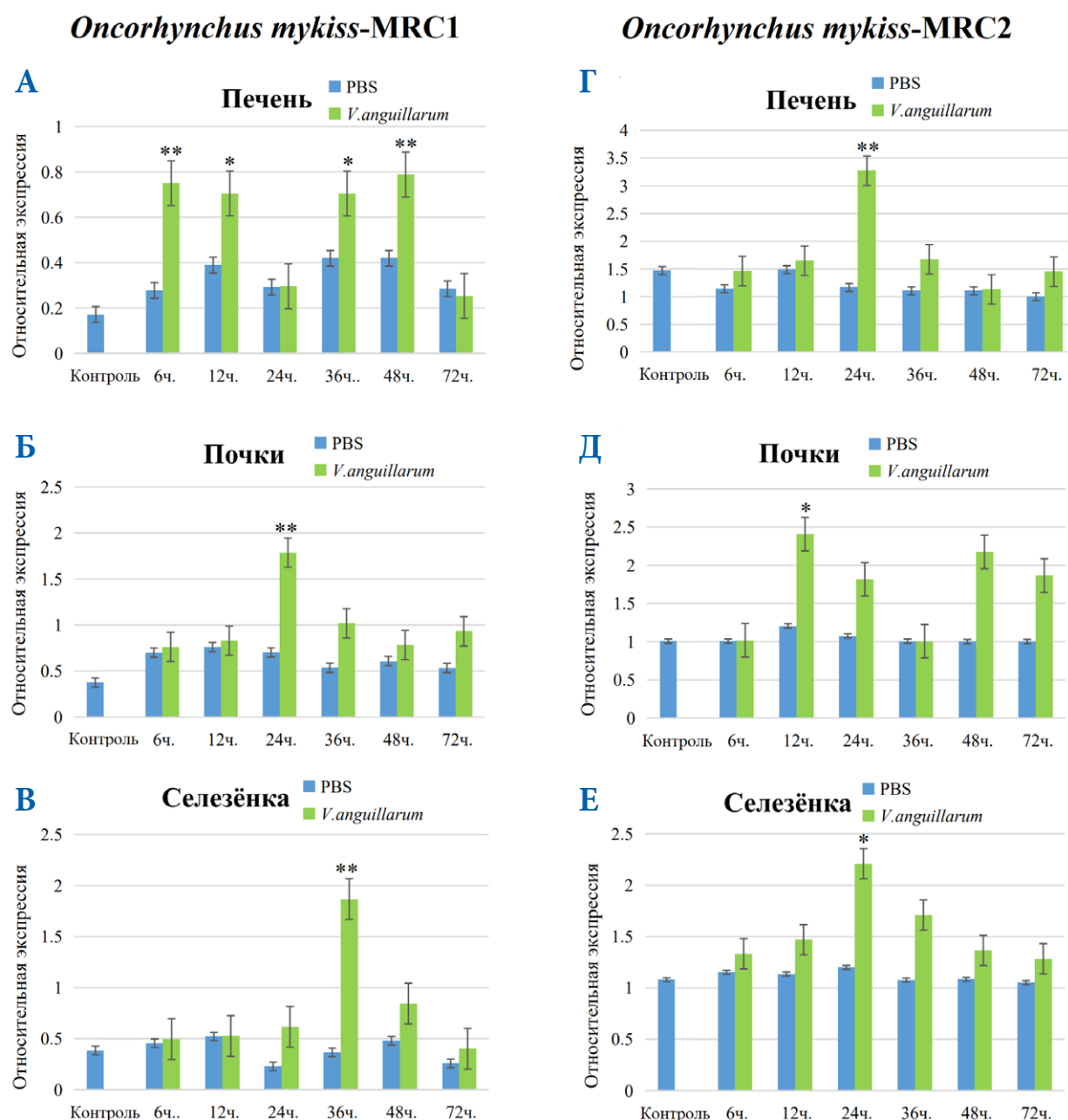


Рис. 11. Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у *O. mykiss* в печени, почках и селезенке после заражения *A. salmonicida* ssp. и PBS. Стандартное отклонение ($\pm$ SD) представлено по пяти техническим повторностям; звездочки над столбцами представляют статистически значимые отличия от контрольных образцов; * — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

Fig. 11. MRC1 (A, B, V) and MRC2 (Г, Д, Е) mRNA expression in the *O. mykiss* liver, kidney, and spleen after infection with *A. salmonicida* ssp. and PBS. Standard deviation ($\pm$ SD) is presented across five technical repetitions; asterisks above bars represent statistically significant differences from control samples; * — at $p < 0.05$, ** — at $p < 0.01$; $n = 3$ / group / time period

дополнительных экспериментов и подтверждений перед достоверными выводами и предположениями.

В результате изучения уровней экспрессии маннозных рецепторов у форели и большого желтого горбыля можно заключить, что уровни их экспрессии не были равны 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 *L. crocea* в 60 (MRC1) (рис. 9 А) и 70 раз (MRC2) (рис. 9 Г) выше, чем у контрольной группы, и даже относительные уровни экспрессии мРНК MRC2 в селезенке после заражения *V. anguillarum* в 250 раз больше

(рис. 9 В), чем в контрольной группе. С другой стороны, в печени *O. mykiss* после заражения *A. salmonicida* ssp. относительная экспрессия мРНК MRC1 (рис. 11 А) и MRC2 (рис. 11 Г) была всего в 4 и 2 раза выше, чем у контрольной группы. Это показывает, что, хотя мРНК MRC1 и MRC2 широко экспрессируется в тканях *L. crocea* и *O. mykiss*, ее специфическая экспрессия отличается, что связано с температурой, размером рыбы и типом инфицированных бактерий, иммунным статусом рыб.

Проанализированный иммунный ответ генов хемокинов *L. crocea* и маннозных рецепторов *O. mykiss* в моделях вибриоза и аэромороза соответственно дополнит имеющиеся знания о развитии заболеваний промысловых видов рыб в динамике и поможет осуществить дальнейшие исследования в области их иммунитета и механизмов общей иммунной регуляции.

Выводы

1. Впервые построены теоретические пространственные структуры хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 двух промысловых и выращиваемых в условиях аквакультуры видов рыб Китая (*L. crocea*) и России (*O. mykiss*). Установлено, что CCL3 и CCL4 являются структурно гомологичными белками, а в структуре CCL2 отсутствует трансмембранный домен. Подтвержден факт высоких идентичностей первичных последовательностей маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у обоих видов рыб, достигающих 84 %, а также

и 3D-моделей, что подтверждает высокую консервативность этих белков вне зависимости от вида и среды их обитания.

2. Созданы *in vivo* модели двух типичных заболеваний аквакультурных видов рыб — вибриоз на примере *L. crocea* и аэромороз на примере *O. mykiss* с помощью инъекций культур патогенных бактерий *V. anguillarum* и *A. salmonicida* spp. Подтверждена эффективность заражения визуальными морфологическими изменениями внутренних органов рыб.

3. Установлено, что хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 распределены в норме по всем органам рыбы, а наибольшая их экспрессия наблюдается в печени, почках и селезенке. В модели вибриоза их относительные уровни экспрессии генов в печени, почках и селезенке схожи. Гены CCL2 и CCL3 реагируют на инфекцию значительно быстрее, проявляя максимум активности спустя 6 часов, а экспрессия CCL4 достигает своего максимума лишь спустя 12 часов.

4. Исследованы паттерны экспрессии маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в различных органах и тканях у тепловодного и холодноводного промыслово-аквакультурных видов рыб Китая и России в моделях вибриоза и аэромороза соответственно. Установлено, что при схожих локализациях их экспрессии (печень, почки, селезенка) у тепловодного *L. crocea* иммунный ответ на заражение в созданных моделях наступает быстрее и проявляется интенсивнее, чем у холодноводного *O. mykiss*.

Список литературы

1. 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;54:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.006>
2. 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;458:107–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.003>
3. 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 & Shellfish Immunology. 2016;50:297–309. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.009>
4. Li J., Zu T., Dong X., Yang X., Liu W., 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;50(4):1199–1600. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.4.1373.1380>

5. Шилин М.Б., Жигульский В.А., Бобылев Н.Г., Ахмад Алаа, 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;(3):178–188.
6. Дун С., Шилин М.Б., Апаликова О.В., Лукина Ю.Н. Исследование молекулярных механизмов иммунитета для борьбы с инфекциями в аквакультуре. В: География: развитие науки и образования. Коллективная монография по материалам ежегод. междунар. науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 22–25 апр. 2020 г. Т. 2. Санкт-Петербург: Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена; 2020, с. 48–52.
7. Дун С., Шилин М.Б., Лукина Ю.Н. Исследование механизмов иммунного ответа для разработки новой технологии защиты рыб от инфекций в условиях аквакультуры. В: Современные проблемы гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды на пространстве СНГ. Сб. тезисов Междунар. науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 22–24 окт. 2020 г. Санкт-Петербург: Российский государственный гидрометеорологический университет; 2020, с. 497–498.
8. Дун С., Шилин М.Б. Текущее состояние аквакультуры и методы защиты аквакультуры в Китае. В: Гидрометеорология и Экология: Достижения и перспективы развития / МГО 2020 им. Л. Н. Карлина: тр. IV Всерос. конф., Санкт-Петербург, 16–17 дек. 2020 г. Санкт-Петербург: Химиздат; 2020, с. 131–134.
9. Дун С., Шилин М.Б. Современное состояние и задачи развития аквакультуры в Китае. В: Экологическая деятельность и экологическое просвещение: региональный аспект. Материалы Всерос. науч. конф., Санкт-Петербург, 16 дек. 2020 г. Санкт-Петербург: Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина; 2020, с. 255–258.
10. Дун С. Обеспечение устойчивого развития аквакультуры путем повышения естественного иммунитета культивируемых рыб. В: XXV юбилейные Царскосельские чтения. Материалы междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 20–21 апр. 2021 г. Т. I. Санкт-Петербург: Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина; 2021, с. 77–82.

References

1. 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;54:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.006>
2. 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;458:107–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.003>
3. 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 & Shellfish Immunology. 2016;50:297–309. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.009>
4. Li J., Zu T., Dong X., Yang X., Liu W., 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;50(4):1199–1600. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.4.1373.1380>
5. Shilin M.B., Zhigulsky V.A., Bobylev N.G., Ahmad A., Lednova J.A., Don S. Development a complex of compensation measures to reduce the negative impact of Port Bronka construction on the South Coast of Nevskaya Lip. Natural and technical sciences. 2020;(3):178–188. (In Russ.).
6. Dong X., Shilin M.B., Apalikova O.V., Lukina Yu.N. Study on the molecular mechanisms of anti-infection in aquaculture. Geography: Development of Science and Education. Collective monograph on the materials of Scientific-Practical Conference LXXIII Herzen readings 22–25 April 2020. Vol. 2. Saint Petersburg: Russian State Pedagogical University named after A. I. Herzen; 2020, p. 48–52. (In Russ.).
7. Dong X., Shilin M.B., Lukina J.N. Investigation of the mechanisms of the immune response to develop a new technology for protecting fish from infections in aquaculture. In: Modern problems of hydrometeorology and environmental monitoring in the CIS. Collection of abstracts of the International scientific and practical conference, Saint Petersburg, October 22–24, 2020. Saint Petersburg: Russian State Hydrometeorological University; 2020, p. 497–498. (In Russ.).

8. Dong X., Shilin M.B. Chinese Aquaculture. In: Proceedings of the IV Russian national conference "Hydrometeorology and ecology: scientific and educational achievements and perspectives" / MGO 2020 named after L. N. Karlin. Saint Petersburg: Himizdat Publ.; 2020, p. 131–134. (In Russ.).
9. Dong X., Shilin M.B. Current status and development objectives of aquaculture in China. In: Environmental activities and environmental education: regional aspect. Proc. of the All-Russian scientific conf., Saint Petersburg, December 16, 2020. Saint Petersburg: A.S. Pushkin Leningrad State University; 2020, p. 255–258. (In Russ.).
10. Dong X. Ensuring sustainable development of aquaculture by enhancing the natural immunity of cultured fish. In: XXV anniversary Tsarskoye Selo readings. Proc. int. scientific conf., Saint Petersburg, April 20–21, 2021. Saint Petersburg: A.S. Pushkin Leningrad State University; 2021, p. 77–82. (In Russ.).

Сведения об авторах

Дун Сянли — старший преподаватель, Чжэцзянский океанический университет, Национальный инженерный исследовательский центр морской аквакультуры, провинция Чжэцзян, г. Чжоушань, южная дорога Хайда № 1, 316022.
Web of Science ResearcherID: LFT-8047-2024
Scopus Author ID: 57118590900
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1217-2013>
e-mail: dongxiangli@zjou.edu.cn

Шилин Михаил Борисович — доктор географических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский государственный гидрометеорологический университет», 195027, Санкт-Петербург, пр. Металлистов, 3
Scopus Author ID: 6603362644
ORCID: 0000-0002-1388-8649
SPIN-код: 1926-8802
Author ID: 77284
e-mail: shilin@rshu.ru

Леонтьева Екатерина Олеговна — аспирант, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29
SPIN-код: 3709-2980
Author ID: 1203809
e-mail: katerina.leonteva.ol@gmail.com

Information about the authors

Dong Xiangli — Lecturer, National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Haide South Road 1, Zhoushan 316022, China. Zhejiang Ocean University.
Web of Science ResearcherID: LFT-8047-2024
Scopus Author ID: 57118590900
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1217-2013>
e-mail: dongxiangli@zjou.edu.cn

Mikhail B. Shilin — Professor, Russian State Hydrometeorological University of St. Petersburg, St Petersburg, Russia
Scopus Author ID: 6603362644
ORCID: 0000-0002-1388-8649
SPIN-code: 1926-8802
Author ID: 77284
e-mail: shilin@rshu.ru

Ekaterina O. Leonteva — Postgraduate Researcher, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St Petersburg, Russia
SPIN-code: 3709-2980
Author ID: 1203809
e-mail: katerina.leonteva.ol@gmail.com

Вклад авторов

Дун Сянли — разработка концепции исследования, проведение экспериментов, подготовка иллюстративного материала;

Шилин Михаил Борисович — разработка концепции исследования, обработка материалов экспериментов;

Леонтьева Екатерина Олеговна — обработка статистического материала, подготовка статьи к публикации.

Authors' contributions

Dong Xiangli — development of the research concept, conducting experiments, preparation of illustrative material;

Mikhail B. Shilin — development of the research concept, processing of experimental materials;

Ekaterina O. Leonteva — processing of statistical material, preparation of the article for publication.