

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОТБОРА МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

А.А. Чиркин, П.Ю. Пинчук

Учреждение образования «Витебский государственный университет  
имени П.М. Машерова», г. Витебск, Республика Беларусь

**Введение.** Изучение системы протеолиза требует использования модельных организмов. При доклинических испытаниях и отработке лечебных технологий обычно используются млекопитающие (мыши, свиньи, обезьяны). Однако из-за этических причин и дороговизны их применение сокращается.

**Цель исследования** – выявить процент идентичности (молекулярно-структурной гомологии) 26 протеолитических ферментов лизосомальной и нелизосомальной локализации у 9 модельных организмов по отношению к человеку.

**Материалы и методы.** Биоинформатический анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей человека разумного (*Homo sapiens*) и девяти модельных организмов.

**Результаты.** Установлен средний уровень молекулярно-структурной гомологии 7 лизосомальных протеолитических ферментов и 14 нелизосомальных протеолитических ферментов пресноводного легочного моллюска *Biomphalaria glabrata* по отношению к человеку (*Homo sapiens*).

**Заключение.** Результаты исследования обосновывают целесообразность использования легочных пресноводных моллюсков как модельных организмов в изучении системы протеолиза, а также использование их протеолитических ферментов в пищевой промышленности и медицине.

**Ключевые слова:** модельные организмы, протеолитические ферменты, нуклеотидные последовательности, аминокислотные последовательности, человек, легочные пресноводные моллюски.

### Введение

Модельные организмы используются для изучения биологических и патологических процессов, которые трудно или невозможно исследовать у более сложных организмов. Логика использования модельных организмов основана на признании того, что жизнь на Земле развилась эволюционно из общих предков. Это означает, что генетические, клеточные и биохимические механизмы являются общими для всех живых существ – от бактерий до человека. Многие важные молекулы и процессы возникли относительно рано и были усовершенствованы в более сложных организмах, поэтому выводы, полученные при изучении молекул и процессов в очень простых организмах, могут иметь важное значение для патогенеза и лечения болезней человека. В экспериментальных исследованиях используют более 100 модельных организмов от одноклеточных до высших млекопитающих. Важнейшим критерием отбора модельных организмов для человека является наличие родственных нуклеотидных последовательностей. Общий размер генома свиньи составляет 2,8 млрд пар нуклеотидов и содержит 21 640 генов, кодирующих белки. Генетическое сходство ДНК свиньи и человека составляет более 98%. Размер генома мыши 2,5 млрд пар нуклеотидов и содержит 23 139 генов,

кодирующих белки. Генетическое сходство ДНК мыши и человека составляет более 95%. Геном рыбок *Danio rerio* (зебрафиш) состоит из 1,4 млрд пар оснований и содержит более 26 000 генов, кодирующих белки. Генетическое сходство ДНК зебрафиш и человека составляет 73%. По данным Бостонского генеалогического университета, а также научным публикациям можно выделить три группы модельных организмов по уровням сходных участков геномов с геномом человека: шимпанзе, свинья, мышь, собака (98,8–80%), зебрафиш, слизняки, цыплята, моллюски, плодовая муха (73–61%), растения, нематода, дрожжи (50–26%) [1, 2, 3]. Несмотря на довольно низкое сходство между геномами человека и рыбками зебрафиш, многие системы этих организмов, в частности сердечно-сосудистая система, взаимодействуют с низкомолекулярными соединениями аналогичным образом. Рыбки зебрафиш используются при исследовании фармакокинетики и токсичности препаратов. Известен широкий перечень патологических состояний, воспроизводимых и изучаемых с помощью рыбок: трансгенные модели рака, модели инфаркта миокарда, воспаления и врожденной недостаточности системы иммунитета позвоночных, туберкулеза, мышечной дистрофии, остеопороза, диабета, ожирения и др. Методами геной

инженерии могут быть разработаны линии *Danio rerio*, специфично имитирующие различные заболевания человека [4].

В Республике Беларусь в качестве модельных организмов используются легочные пресноводные моллюски в нейробиологии для изучения организации нервных центров [5, 6], процессов радиоадаптации моллюсков в загрязненных водоемах [7], роли антиоксидантных систем при действии стрессовых факторов [8], действия тяжелых металлов на жизнеспособность моллюсков [9], оценки биоэкологического состояния поверхностных вод и моделирования нарушений обмена аминокислот и глюкозы [10].

Для отбора и использования модельных организмов существуют международные и национальные критерии, которые имеют законодательный характер. Эти критерии включают правило 3R (Replacement – замена, Reduction – сокращение, Refinement – уточнение). «Замена» включает использование компьютерных моделей, неживых тканей и клеток, а также замену животных «высшего порядка» (приматов и млекопитающих) животными «низшего» порядка (например, хладнокровными животными, беспозвоночными). «Сокращение» относится к мероприятиям по минимизации количества животных, используемых в ходе эксперимента. «Уточнение» относится к попыткам сделать экспериментальный план максимально безболезненным и эффективным, чтобы свести к минимуму страдания модельного животного. В 2004 году был введен термин «деградом», который включает перечень протеолитических ферментов, используемых для деградации тканей модельного организма: 626 белков вошли в состав деградума крысы и 561 белок – в деградом человека [11].

**Цель исследования** – выявить процент идентичности (молекулярно-структурной гомологии) 26 протеолитических ферментов лизосомальной и нелизосомальной локализации у 9 модельных организмов по отношению к человеку.

### Материалы и методы

Материалом для сравнения послужили аминокислотные и нуклеотидные последовательности следующих организмов: человек разумный (*Homo sapiens*), свинья (*Sus Scrofa*), мышь домовая (*Mus musculus*), курица домашняя (*Gallus gallus*), зебрафиш (*Danio rerio*), плодовая муха (*Drosophila melanogaster*), нематода (*Caenorhabditis elegans*), пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*) и биомфалирия глабрата (*Biomphalaria glabrata*).

Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся

на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для модельных организмов осуществлялся на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей выполнено при помощи ресурса [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур NS (нуклеотидные последовательности) AAS (аминокислотные последовательности) → оценка третичных структур по архитектуре молекул и их доменной организации. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

Проведен анализ 26 протеолитических ферментов (в скобках курсивом обозначены гены) из них:

12 ферментов локализованы в лизосомах: EC:3.4.16.5 – Cathepsin A (*CTSA*), EC:3.4.18.1 – Cathepsin Z (*CTSZ*), EC:3.4.21.79 – Granzyme B (*GZMB*), EC:3.4.22.1 – Cathepsin B (*CTSB*), EC:3.4.22.15 – Pro-cathepsin L (*CTSL*), EC:3.4.22.16 – Pro-cathepsin H (*CTSH*), EC:3.4.22.27 – Cathepsin S (*CTSS*), EC:3.4.22.34 – Legumain (*LGMN*), EC:3.4.22.38 – Cathepsin K (*CTSK*), EC:3.4.22.41 – Cathepsin F (*CTSF*), EC:3.4.22.42 – Cathepsin O (*CTSO*), EC:3.4.23.5 – Cathepsin D (*CTSD*);

14 ферментов не локализованы в лизосомах: EC:3.4.17.1 – Carboxypeptidase A1 (*CPA1*); EC:3.4.17.2 – Carboxypeptidase B (*CPB1*); EC:3.4.24.56 – Pitrilysin (*PITRMI*); EC:3.4.13.19 – Dipeptidase (*DPEP1*); EC:3.4.24.B18 – ATP-dependent zinc metalloprotease (*YME1L1*); EC:3.4.24.11 – Neprilysin (*MME*); EC:3.4.24.106 – Hepsin (*HPN*); EC:3.4.21.4 – Trypsin (*PRSS*); EC:3.4.22.36 – Caspase 1 (*CASP1*); EC:3.4.22.56 – Caspase 3 (*CASP3*); EC:3.4.22.60 – Caspase 7 (*CASP7*); EC:3.4.22.61 – Caspase 8 (*CASP8*); EC:3.4.22.52 – Calpain 1 (*CAPN1*); EC:3.4.22.53 – Calpain 2 (*CAPN2*).

Авторы благодарны доктору биологических наук В.В. Хрусталёву за внимание и консультативную поддержку биоинформационных исследований на кафедре химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П. М. Машерова.

### Результаты и их обсуждение

Рассмотрим результаты сравнительного биоинформатического анализа 12 ферментов, локализованных в лизосомах, и 14 ферментов, локализованных

ных вне лизосом и относящихся к подклассу пептидазы.

Процент гомологии первичных структур ферментов, локализованных в лизосомах, по сравнению с человеком для свиньи составил от 72,73 до 95,45%, для домашней мыши – от 69,70 до 88,70%, для домашней курицы – от 28,40 до 77,06%, для рыбки зебрафиш – от 38,53 до 50,55%, для плодовой мухи – 53,09%, для нематоды – от 40,81 до 61,11%, для растения резуховидки Таля – от 36,12 до 44,62% и для моллюска биомфаларии глабрата – от 27,27 до 67,97%. Для пекарских дрожжей совпадений не найдено,

Процент гомологии первичных структур протеолитических ферментов, не локализованных в лизосомах для свиньи, составил – от 72,78 до 96,65%, для домашней мыши – от 62,13 до 94,83%, для домашней курицы – от 47,89 до 84,00%, для рыбки зебрафиш – от 40,24 до 80,15%, для плодовой мухи – от 38,5 до 44,03%, для нематоды – от 36,83 до 50,00% и для биомфаларии глабрата – от 28,65 до 53,46%. Для пекарских дрожжей и для растения резуховидки Таля совпадений не найдено.

Для наглядности сравнительного анализа в таблице приведены округленные данные о покрытии и идентичности протеолитических ферментов человека и пяти модельных организмов.

В результате биоинформатического сравнения протеаз модельных организмов наиболее высокая степень гомологии характерна для свиньи (*Sus Scrofa*), домашней мыши (*Mus musculus*), домашней курицы (*Gallus gallus*), рыбки зебрафиш (*Danio rerio*) и средний уровень гомологии – для легочного пресноводного моллюска биомфалария глабрата (*Biomphalaria glabrata*). Для всех этих организмов известны аннотированные геномы. Высокие уровни покрытия свидетельствуют о возможности достаточно высокой степени достоверности оценки идентичности первичных и третичных структур белков-ферментов.

Определенный интерес представляет исследование молекулярно-структурной гомологии отдельных протеолитических ферментов модельных организмов с аналогичными ферментами человека. Так, у *Drosophila melanogaster* выявлен один из

12 лизосомальных ферментов – Cathepsin D (покрытие – 94% и идентичность – 53,09%), а также 4 внелизосомальных протеолитических ферментов Neprilysin (покрытие – 92% и идентичность – 41,17%), Hepsin (покрытие – 63% и идентичность – 38,57%), Calpain 1 (покрытие – 94% и идентичность – 44,03%) и Calpain 2 (покрытие – 95% и идентичность – 43,84%). Это средний уровень гомологии. У нематоды *Caenorhabditis elegans* обнаружено 5 лизосомальных ферментов со средним уровнем идентичности: Cathepsin A (покрытие – 94%, идентичность – 40,81%); Cathepsin Z (покрытие – 82%, идентичность – 61,11%); Cathepsin B (покрытие – 97%, идентичность – 47,94%); Procathepsin L (покрытие – 91%, идентичность – 51,13%) и Legumain (покрытие – 93%, идентичность – 42,13%). Кроме того выявлены 3 внелизосомальных протеолитических фермента также со средним уровнем гомологии: ATP-dependent zincmetalloprotease (покрытие – 66%, идентичность – 50,00%); Neprilysin (покрытие – 93% и идентичность – 36,83%, а также Calpain 1 (покрытие – 67%, идентичность – 48,69%). У модельного растения резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) выявлено два лизосомальных протеолитических фермента со средним уровнем идентичности: Cathepsin A (покрытие – 86%, идентичность – 36,12%) и Cathepsin B (покрытие – 92%, идентичность – 44,62%).

При попарном выравнивании аминокислотных последовательностей ферментов исследуемых организмов была выявлена относительно высокая частота совпадений сайтов связывания. Следовательно, можно полагать о выполнении ферментами однотипных функций.

### Заключение

Результаты исследования обосновывают целесообразность использования легочных пресноводных моллюсков как модельных организмов в изучении системы протеолиза. Ближайшим родственником биомфаларии глабрата (*Biomphalaria glabrata*) с аннотированным геномом являются два вида моллюсков, широко распространенных в поверхностных водах Республики Беларусь, отличаю-

Таблица – Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов человека и некоторых модельных организмов

Модельный организм	Протеолитические ферменты лизосом (12)		Протеолитические ферменты вне лизосом (14)	
	Покрытие, %	Сходство, %	Покрытие, %	Сходство, %
<i>Sus Scrofa</i>	91 (86–100)	85 (73–95)	89 (95–100)	87 (72–97)
<i>Mus musculus</i>	96 (90–100)	80 (70–89)	91 (22–100)	76 (62–95)
<i>Gallus gallus</i>	90 (62–100)	68 (28–77)	95 (71–100)	70 (48–84)
<i>Danio rerio</i>	91 (77–98)	61 (38–51)	91 (86–100)	61 (40–80)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	84 (33–98)	43 (27–68)	78 (45–96)	38 (29–53)

щихся по типу транспорта кислорода: прудовик (*Lymnaea stagnalis*) и роговая катушка (*Planorbis cornutus*). Они чувствительны к действию неблагоприятных экологических факторов в водных средах обитания. У них описаны изменения по типу метаболического синдрома, развивающегося у человека при действии стрессовых факторов, а также воспроизводятся признаки экспериментального поражения гепатопанкреаса [10, 12]. При введении этих животных в аквакультуру возможно использование их протеолитических ферментов в пищевой промышленности и медицине.

Завершая статью, авторам хотелось бы отметить, что использование модельных организмов в медицине будет продолжаться до тех пор, пока технологии испытания новых способов воздействия на организм человека будут абсолютно безопасны для человека. На данном этапе поиск новых модельных организмов или создание новых остается весьма актуальной задачей. Не случайно только в текущем году появилась информация о принципиально новых подходах к моделированию. В Томском политехническом университете (РФ) напечатаны на 3D-принтере фантомы крыс и мышей с различающимися по свойствам и близкими к натуральным внутренними тканями. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения 075-15-2021-271 (проект № МК-3481.2021.4). Эти фантомы модельных организмов будут использованы для оптимизации лучевой терапии. Чтобы снизить до минимума негативный эффект от лечения, необходимо правильное планирование терапии: получить томографические данные места облучения, корректно оконтурить опухоль и критические органы, выбрать необходимую дозу облучения, составить корректный план, проверить его с помощью дозиметрического фантома, а затем уже облучать пациентов. В этом же году появилась публикация о создании «гуманизированных дрожжей» [13]. На молекулярном уровне «человек обладает поразительным сходством с микроорганизмами, живущими в дрожжах». Как показали исследования, половину генов дрожжей можно заменить соответствующими генами, взятыми у человека. Если ранее вводились отдельные гены человека, то в данной статье представлены результаты введения комплекса человеческих генов для регуляции метаболизма глюкозы. Сравнивая экспрессию человеческих генов в дрожжах и в естественной среде, в выращенных в пробирке человеческих тканях, удалось получить доказательства того, что свойства человеческих ферментов, выработанных в дрожжах,

на удивление близки к аналогичным свойствам ферментов, естественным образом вырабатывающихся в человеческих клетках. Данный результат показывает, что модельный организм *Saccharomyces cerevisiae*, вероятно, не обладает «деградомом», поскольку это быстро размножающиеся клетки, для которых необходимо питание, т. е. анаболические процессы. В связи с этим дальнейшей перспективой исследований в области модельных организмов может быть градация их по соотношению анаболических и катаболических процессов.

#### Список цитированных источников

- 1 Model organisms in development and disease. In Molecular Basis of Inborn Errors of Development. Eds. / E. Bier [et al.] // Oxford University Press, 2003. – P. 25–45.
- 2 The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome / K. Howe [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 496 (7446). – P. 498–503.
- 3 The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction / F. Chablais [et al.] // BMC Dev Biol. – 2011. – Vol. 11, Article number 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
- 4 MacRae, C. A. Zebrafish as tools for drug discovery / C. A. MacRae, R. T. Peterson // Nature Reviews Drug Discovery. – 2015. – Vol. 14. – P. 721–731.
- 5 Сидоров, А.В. Нейромодуляторное действие пероксида водорода на центральные нейроны пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis* / А.В. Сидоров // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 2017. – Т. 53, № 6. – С. 437–443.
- 6 Сидоров, А.В. Модельные организмы и клеточная организация нервных центров / А.В. Сидоров // Наука и инновации. – 2018. – №6 (184). – С. 10–14.
- 7 Голубев, А.П. Динамика процессов радиоадаптации в популяциях моллюсков из водоемов Белорусского сектора зоны загрязнения ЧАЭС / А.П. Голубев // Экологический вестник. – 2012. – №2 (20). – С. 44–57.
- 8 Khomich, A.S. Assessment of the joint effect of thermal stress, pollution, and parasitic infestation on the activity of antioxidative enzymes in pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis* / A.S. Khomich // Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal. – 2017. – № 2. – P. 184–192.
- 9 Дромашко, С.Е. Влияние тяжелых металлов на большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. / С. Е. Дромашко, С. Н. Шевцова, А. С. Бабенко. – Минск: Беларуская навука, 2018. – 172 с.
- 10 Чиркин А. А., Балаева-Тихомирова О. М. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А. А. Чиркин, О. М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Изд. дом «Среда», 2022. – 124 с.
- 11 Puente, X. A. Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors / X. Puente, C. A. Lopez-Otin // Genome Res. – 2004. – Vol. 14. – P. 609–622.
- 12 Использование легочных пресноводных моллюсков для биомониторинга поверхностных вод / А. А. Чиркин [и др.] // Инновационные технологии в водном, коммунальном хозяйстве и водном транспорте. Материалы II республиканской научно-технической конференции (28–29 апреля 2022 года). – 2022: БНТУ. – С. 452–457.

- 13 Full humanization of the glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* / F.J. Boonekamp [et al.] // Cell Reports – 2022. – Vol. 39, Issue 13. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111010.
- References**
- 1 Bier E, McGinnis W. Model organisms in development and disease. In *Molecular Basis of Inborn Errors of Development*. Eds. C.J. Epstein, R.P. Erikson, A. Wynshaw-Boris. 2003. Oxford University Press. P. 25-45.
  - 2 The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013. Vol. 496 (7446). pp. 498–503.
  - 3 Chablais F. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev : Biol*. 2011. Vol. 11, no. 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
  - 4 MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015. Vol. 14. pp. 721–731.
  - 5 Sidorov, A.V. Neyromodulyatornoye deystviye peroksida vodoroda na tsentral'nyye neyrony pishchevoy seti mollyuska *Lymnaea stagnalis* Zhurn. *evolyuts. biokhim. i fiziol*. 2017. iss. 53, no. 6. pp. 437–443.
  - 6 Sidorov AV. Model'nyye organizmy i kletochnaya organizatsiya nervnykh tsentrov. *Nauka i innovatsii*. 2018. no. 6 (184). pp. 10–14.
  - 7 Golubev AP. Dinamika protsessov radioadaptatsii v populyatsiyakh mollyuskov iz vodoyemov Belorusskogo sektora zony zagryazneniya CHAES. *Ekologicheskiy vestnik*. 2012. no. 2 (20). pp. 44–57.
  - 8 Khomich AS. Assessment of the joint effect of thermal stress, pollution, and parasitic infestation on the activity of antioxidative enzymes in pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal*. 2017. no. 2. pp. 184–192.
  - 9 Dromashko SYe, Shevtsova SN, Babenko AS. Vliyaniye tyazholykh metallov na bol'shogo prudovika *Lymnaea stagnalis* L. Minsk: Belaruskaya navuka, 2018. 172 p.
  - 10 Chirkin AA, Balayeva-Tikhomirova O.M. Molekulyarno-strukturnaya gomologiya proteoliticheskikh fermentov: monografiya. Cheboksary: Izdatel'skiy dom «Sreda», 2022. 124 p.
  - 11 Puente XA, Lopez-Otin CA. Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors. *Genome Res*. 2004. Vol. 14. pp. 609–622.
  - 12 Chirkin AA, Balayeva-Tikhomirova OM, Katsnel'son Yel, Pinchuk PYu. Ispol'zovaniye legochnykh presnovodnykh mollyuskov dlya biomonitoringa poverkhnostnykh vod. V sb.: Innovatsionnyye tekhnologii v vodnom, kommunal'nom khozyaystve i vodnom transporte. Materialy II respublikanskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii (28–29 aprelya 2022 goda). 2022: BNTU. pp. 452–457.
  - 13 Boonekamp FJ, Knibbe E, Viera-Lara MA. Full humanization of the glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Reports*. 2022. Vol. 39, no. 13. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111010

## MOLECULAR BIOLOGICAL CRITERIA FOR SELECTION OF MODEL ORGANISMS FOR BIOMEDICAL STUDIES

*A.A. Chirkin, P.Yu. Pinchuk*

*Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Republic of Belarus*

**Background.** The study of the proteolysis system requires the use of model organisms. Mammals (mice, pigs, monkeys) are usually used in preclinical trials and development of therapeutic technologies. However, due to ethical reasons and high cost, their use is declining.

**Objective.** To identify the percentage of identity (molecular structural homology) of 26 proteolytic enzymes of lysosomal and non-lysosomal localization in 9 model organisms in relation to humans.

**Materials and methods.** Bioinformatic analysis of amino acid and nucleotide sequences of *Homo sapiens* and nine model organisms.

**Results.** The average level of molecular structural homology of 7 lysosomal proteolytic enzymes and 14 non-lysosomal proteolytic enzymes of the freshwater lung mollusk *Biomphalaria glabrata* with respect to humans (*Homo sapiens*) has been established.

**Conclusion.** The results of the study substantiate the expediency of using pulmonary freshwater mollusks as model organisms in the study of the proteolysis system, as well as the use of their proteolytic enzymes in the food industry and medicine.

**Keywords:** model organisms, proteolytic enzymes, nucleotide sequences, amino acid sequences, human, freshwater lung mollusks.

*Поступила 29.08.2022*