

Формирование β -структур и фибриллярных ассоциатов молекулами инсулина НовоРапид в присутствии клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

М.А. Прозоров¹, В.В. Рекстина¹, И.Б. Кудряшова¹, О.А. Драгони¹, Р.Х. Зиганшин², О.В. Камзолкина¹, Т.С. Калебина¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Formation of β -structures and fibrillar associates by NovoRapid insulin molecules in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls

М.А. Prozorov¹, V.V. Rekstina¹, I.B. Kudryashova¹, O.A. Dragoni¹, R.H. Ziganshin², O.V. Kamzolkina¹, T.S. Kalebina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Аннотация

Целью исследования явилось изучение способности препарата инсулина НовоРапид формировать β -структуры и фибриллы в присутствии и отсутствии индукторов. Изучение процесса формирования β -структур проводили с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием специфического красителя Тиофлавина Т. Способность инсулина к фибриллообразованию изучали с помощью электронной микроскопии. В качестве индуктора применяли препараты клеточных стенок (КС) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих и не содержащих белок с амилоидными свойствами Bgl2p. Отсутствие Bgl2p в КС было обусловлено делецией кодирующего его гена. С помощью LC-MS/MS-анализа было показано, что набор белков, ковалентно и нековалентно закрепленных на молекулах полисахаридов КС указанных дрожжей, одинаков и отличается только отсутствием Bgl2p в случае штамма *bgl2Δ*. Показано, что в среде инкубации инсулина НовоРапид, к которой в качестве индуктора были добавлены клеточные стенки дрожжей дикого типа, не только увеличивается интенсивность флуоресценции тиофлавина Т при длине волны 485 нм, но и обнаруживаются фибриллярные структуры, достигающие в длину нескольких микрометров. Результаты работы позволяют предположить, что Bgl2p может рассматриваться как индуктор процесса фибриллообразования с участием инсулина НовоРапид, при этом другие компоненты КС участвуют в индукции формирования β -структур в молекулах этого инсулина.

Ключевые слова

Инсулин, клеточные стенки, индукторы, белки, амилоиды.

Summary

The aim of the study was to investigate the ability of NovoRapid insulin preparation to form β -structures and fibrils in the presence and absence of inductors. The formation of β -structures was studied by fluorescence spectroscopy using a specific dye Thioflavin T. The ability of insulin to form fibrils was investigated by electron microscopy. *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall (CW) preparations containing Bgl2p, a protein with amyloid properties and CW lacking it were used as inductors. The absence of Bgl2p in the CW was caused by a deletion of the gene encoding it. LC-MS/MS analysis showed that the set of proteins covalently and non-covalently bound to the CW polysaccharide molecules of these yeast is the same and differs only in the absence of Bgl2p in the case of the *bgl2Δ* strain. It was shown that in the NovoRapid insulin incubation medium, to which wild-type yeast cell walls were added as an inductor, not only the intensity of Thioflavin T fluorescence at a wavelength of 485 nm increases, but also fibrillar structures are detected, reaching a length of several micrometers. The results of this study suggest that Bgl2p can be considered as an inductor of the process of fibril formation in the presence of NovoRapid insulin, while other components of the CW are involved in the induction of the formation of β -structures in the molecules of this insulin.

Keywords

Insulin, cell walls, inductors, proteins, amyloids.

Введение

Инсулин, гормон белковой природы, жизненно важен для регуляции углеводного обмена в организме человека. Нарушения синтеза и биогенеза инсулина приводят к развитию диабета и необходимости для пациентов прибегать к регулярным и многочисленным инъекциям препаратов инсулина. Известно, что инсулин может агрегировать с образованием фибриллярных структур [1-6], в том числе в местах инъекций [1,7,8], образуя амилоиды и вызывая такую патологию как инъекционный инсулиновый амилоидоз, в значительной степени снижающий эффективность терапии [1]. Следует отметить, что способность фибриллизироваться *in vitro* описана в литературе для разных типов инсулина [1-6]. Однако условия, в которых авторы этих работ проводили инкубацию, такие как pH среды, длительность и температура, не дают возможности ответить на вопрос каковы механизмы фибриллизации инсулина после инъекций *in vivo*. Тем не менее, проводятся работы по поиску перспективных ингибиторов амилоидообразования инсулина и его аналогов [9].

В свою очередь, нельзя исключить наличие молекул, которые могут приводить к интенсификации процесса фибриллизации инсулина после введения препарата в организм. Такие молекулы могут быть представлены в репертуаре белковых продуктов, присутствующих у человека в результате инфекционных заболеваний. По нашим представлениям, эти молекулы могут являться индукторами фибриллизации инсулина. Например, у людей, страдающих или перенёсших ранее микозы различной этиологии, такими индукторами могут являться компоненты клеточной поверхности дрожжей, в частности фрагменты их клеточной стенки (КС), попавшие в организм в результате развития инфекции. Эти фрагменты содержат мажорный, консервативный и конститутивный белок клеточной поверхности как непатогенных, так и патогенных дрожжей – Bgl2p [10-12] и/или другие белки, обладающие свойствами амилоидов. При инъекции КС дрожжей и экстрактов из них показано токсическое воздействие Bgl2p на организм мышей [13] и получены результаты, позволяющие предполагать роль этого белка в индукции у мышей амилоидоза.

В связи со сказанным необходимыми являются исследования способности различных препаратов инсулина формировать фибриллы, а также изучение влияния КС дрожжей на этот процесс.

В качестве модели в данном исследовании был использован коммерческий препарат инсулина для подкожного введения НовоРапид (инсулин

аспарт, ООО «Ново Нордикс» Россия) с модификацией пролина в положении B28 на отрицательно заряженную аспарагиновую кислоту. Эта замена призвана препятствовать олигомеризации этого белка [14]. Широкого изучения фибриллизации и, в частности, увеличения доли β -структур в молекулах инсулина в присутствии КС ранее не проводилось.

Целью нашего исследования было изучить способность препарата инсулина НовоРапид формировать β -структуры и фибриллы в различных условиях как в отсутствии индуктора, так и в присутствии в качестве индуктора препарата клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих и не содержащих Bgl2p.

Материалы и методы исследования

Штаммы дрожжей и условия их выращивания. В работе использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа WT – генотип *MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 leu2 Δ 0* (Euroscarf, Germany) и *bgl2 Δ* – генотип *MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 bgl2 Δ ::URA3*, полученный как описано ранее [15]. Указанные штаммы поддерживали на твёрдых селективных средах YNB [16]. Выращивание дрожжей на жидкой питательной среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона, 2% глюкозы) проводили в колбах объёмом 750 мл с объёмом среды культивирования 200 мл на качалке New Brunswick при 200 об/мин и температуре 30°C.

Выделение и частичная депротеинизация клеточных стенок. Клетки дрожжей поздней логарифмической фазы роста (19 ч роста культуры) осаждали центрифугированием 10 мин при 1650g (центрифуга Eppendorf 5804R), дважды промывали 0,05М калий-фосфатным буфером pH 8,0 и разрушали на шейкере Heidolph с помощью стеклянных шариков баллотини (0,5 мм; Sigma) при охлаждении, далее проводили отмывку КС от внутриклеточного содержимого как описано ранее [18]. Полученные препараты КС депротеинизировали 1% додецилсульфатом натрия в течение 1 часа при 37°C, осаждали центрифугированием и промывали многократно 0,2 М натрий-ацетатным буфером pH 5,6, трижды смесью бутанол:вода в соотношении 1:1 и многократно водой [17]. Оптическую плотность КС в суспензии определяли с помощью спектрофотометра Cary Eclipse (Varian Inc.) при длине волны 540 нм (A540).

Условия для изучения формирования β -структур молекулами инсулина. В работе использовали коммерческий препарат инсулина для подкожного введения НовоРапид (инсулин аспарт, ООО «Ново Нордикс» Россия). Препарат инсулина, разведённый в воде и средах следующего состава:

Нильсен – 0,1 М HCl, 0,1 М NaCl, pH 1,6 [18], Сурин – 20% уксусная кислота, 140 мМ NaCl, pH 2,0 [19] и Филлипс – 10 мМ калий-фосфатный буфер, 140 мМ NaCl, pH 7,4 [20] в соотношении 1:10, инкубировали при температуре 37°C на качалке при 60 об/мин в течение двух или четырёх суток. Индукцию формирования β-структур молекулами инсулина исследовали в воде в присутствии КС штаммов WT и *bgl2Δ* в концентрации 0,004 о.е.(A540)/мл.

Флуоресцентная спектроскопия. Формирование β-структур в препаратах инсулина оценивали с помощью флуоресценции красителя тиофлавина Т, имеющего сродство к кросс-β-структурам белков, в концентрации 0,025 мМ. Эмиссию флуоресценции тиофлавина Т возбуждали при длине волны 450 нм и регистрировали максимум интенсивности флуоресценции при 485 нм [21] в случае представления данных в виде столбчатой диаграммы или диапазон 460-520 нм в случае представления данных в виде спектров (флуоресцентный спектрофлуориметр Cary Eclipse, Varian Inc.).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Для обнаружения и исследования структур, формируемых инсулином в присутствии и отсутствии клеточных стенок штаммов WT и *bgl2Δ*, образцы наносили на медные сеточки 200 mesh с формвар/углеродным покрытием (SPI Supplies). Контрастирование проводили раствором 2% фосфорновольфрамовой кислоты, анализировали на просвечивающем электронном микроскопе (JEM-100B, JEOL).

Подготовка проб для LC-MS/MS анализа. Суспензию КС штаммов WT и *bgl2Δ* переводили в 0,1 М Трис-HCl, pH 8,5 с 1% дезоксихолатом и 10 мМ дитиотрейтолом, затем кипятили в течение 10 мин. Дальнейшая подготовка проб, жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ были проведены как описано ранее [22].

Результаты и обсуждение

С использованием флуоресцентной спектроскопии с красителем тиофлавином Т, изменяющим спектр флуоресценции в присутствии β-структур белковых молекул, мы показали, что инсулин НовоРapid в средах Нильсен и Сурин с кислыми значениями pH образует очень незначительное количество β-структур в процессе инкубации в течение двух суток (рис. 1). В среде Филлипс, pH 7,4 и воде, pH 6,2 интенсивность формирования β-структур увеличивалась незначительно (рис. 1). При этом в среде Филлипс инсулин более стабильно формировал β-структуры, в то время как в воде разброс значений интенсивности флуоресценции тиофлавина Т был довольно большим (рис. 1). Та-

ким образом, проведённые эксперименты характеризуют тенденцию к формированию β-структур в исследуемом коммерческом препарате инсулина как весьма низкую.

Дальнейшие эксперименты по индукции было решено проводить в воде, чтобы избежать влияния компонентов сред на этот процесс, ограничившись компонентами, неизбежно сопутствующими инсулину данного препарата, от которых мы не избавлялись, поскольку эти компоненты также присутствуют при инъекции инсулина. В наибольшей степени такого влияния можно было ожидать в экспериментах по изучению индукции фибриллизации инсулина с помощью электронной микроскопии. Из результатов, представленных на рисунке 2, видно, что КС

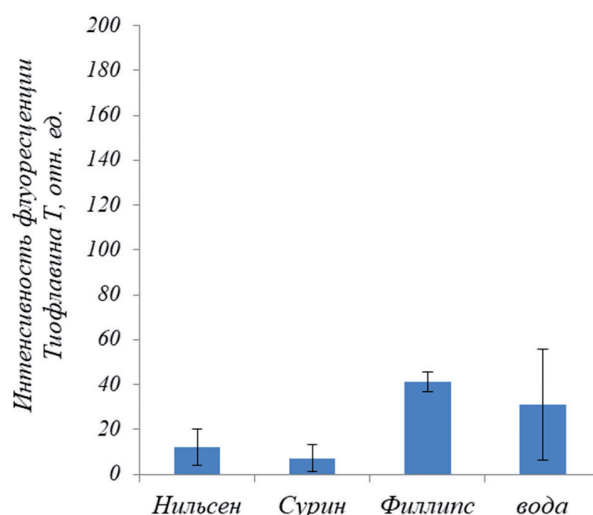


Рис. 1. Формирование β-структур инсулина НовоРapid в различных средах в процессе инкубации в течение двух суток

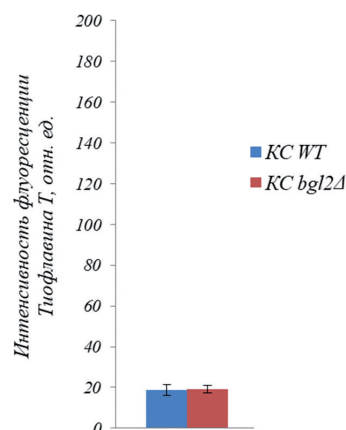


Рис. 2. Формирование β-структур в препаратах клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* штаммов WT и *bgl2Δ* в концентрации 0,004 о.е./мл в воде. Каждый столбик представляет собой средние значения, полученные при измерении флуоресценции тиофлавина, в течение 4 суток инкубации

обоих штаммов в концентрации 0,004 о.е./мл, которая будет использована в дальнейшем в качестве индуктора, также не демонстрируют специфической флуоресценции тиофлавина Т, что говорит об отсутствии тенденции к формированию β -структур белками КС обоих штаммов в воде в процессе инкубации.

Перед исследованием влияния индуктора на способность препарата инсулина НовоРapid формировать β -структуры нами была проведена работа по анализу представленности белков в КС штаммов WT и *bgl2Δ*. Основным индуктором среди белков КС мы предполагаем Bgl2p, однако воздействие других компонентов КС не исключается.

С помощью LC-MS/MS-анализа было показано, что КС штаммов WT и *bgl2Δ* отличаются присутствием Bgl2p (табл. 1). Представленность других мажорных белков КС обоих штаммов была сопоставима по количеству уникальных пептидов

(табл. 1). Данная ситуация позволяла выявить влияние на изучаемые процессы белка Bgl2p и других белков КС дрожжей, поскольку Bgl2p присутствовал только в препарате КС штамма WT и отсутствовал в препарате КС *bgl2Δ*.

Индукция формирования β -структур в препарате инсулина НовоРapid происходила при добавлении КС штаммов WT в одном случае и *bgl2Δ* в другом случае (рис. 3). Из результатов, представленных на рисунке 3, видно, что в обоих случаях флуоресценция тиофлавина Т увеличивалась в 2 раза с течением времени инкубации, что свидетельствует об увеличении доли β -структур и об отсутствии принципиальной роли Bgl2p в индукции их формирования. Тем не менее, флуоресценция тиофлавина Т в экспериментах с препаратами КС, содержащих Bgl2p, выше, хотя и незначительно. На рис. 3 приведены графики типичного эксперимента.

Таблица 1. Сравнение представленности белков клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штаммов WT и *bgl2Δ* с помощью LC-MS/MS-анализа

Название белка	Клеточные стенки штамма WT		Клеточные стенки штамма <i>bgl2Δ</i>	
	Покрытие, %	Количество уникальных пептидов	Покрытие, %	Количество уникальных пептидов
Bgl2p	76	55	–	–
Cwp1p	63	42	50	36
Sag1p	34	47	31	32
Ygp1p	35	16	33	12
Scw4p	52	30	37	22
Scw10p	34	12	35	13
Scw11p	20	6	15	5
Gas1p	33	28	34	29
Gas3p	50	35	44	32
Gas5p	29	14	25	13
Crh1p	29	22	27	21
Crh2p	37	15	26	12
Ecm33p	22	13	23	12
Plb2p	21	11	17	9
Ccw14p	26	26	24	26
Tos1p	42	14	24	9
Hsp150p	23	17	23	15
Cis3p	29	11	23	9
Pir1p	28	9	26	8
Pir3p	32	9	22	5
Inv2p	20	10	17	9
Eng1p	11	9	5	5
Uth1p	29	7	22	7
Sim1p	23	6	13	5
Pst1p	16	6	18	6

Примечание. Покрытие отражает долю идентифицированных пептидных фрагментов от аминокислотной последовательности каждого белка

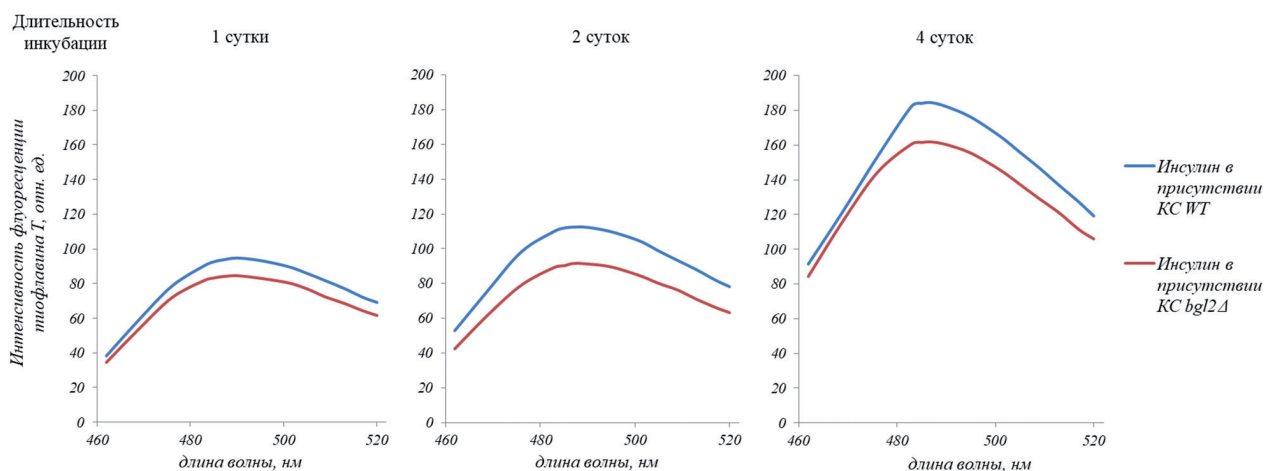


Рис. 3. Формирование β -структур, связывающих специфический краситель тиофлавин Т, в препарате инсулина НовоРапид в воде в присутствии клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* штаммов WT и *bgl2Δ*

По всей вероятности, увеличение доли β -структур могут индуцировать такие белки как Gas1, Ygp1, для которых описана способность формировать структуры типа амилоидов [23] и некоторые другие менее изученные белки.

С помощью электронной микроскопии нами были обнаружены фибриллярные структуры в препарате инсулина НовоРапид в присутствии КС штамма WT (рис. 4). Средняя длина полученных фибрилл достигает нескольких микрометров.

Подобные структуры не были обнаружены в образцах, содержащих инсулин без КС или в присутствии КС штамма *bgl2Δ* (данные не приведены). Полученный результат можно объяснить тем, что наличие Bgl2p в КС способствует фибриллизации инсулина НовоРапид.

Сопоставление и анализ полученных результатов позволяет с известной долей осторожности

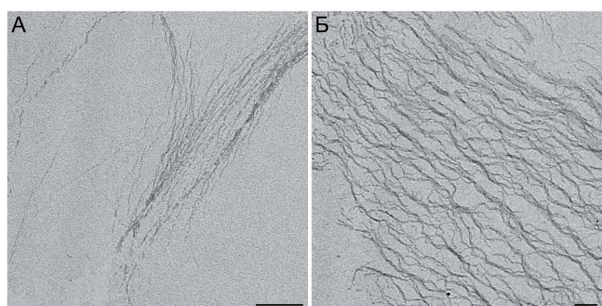


Рис. 4. Просвечивающая электронная микроскопия препарата инсулин НовоРапид в присутствии клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* штамма WT

Примечание. Контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой. Масштабный отрезок 500 нм (А) и 200 нм (Б)

предположить, что наблюдаемое увеличение флуоресценции тиофлавина Т в случае применения в качестве индуктора КС штаммов WT и *bgl2Δ* является следствием различных процессов. В одном случае β -структуры образуются в молекулах инсулина, однако процесс не приводит к фибриллизации его молекул. В другом случае формирование β -структур приводит к формированию фибрилл.

Заключение

Наше исследование является первой попыткой оценить возможную роль клеточных стенок дрожжей в качестве индуктора фибриллизации инсулина и выявить роль белков, входящих в их состав, в этом процессе. Высказанное нами предположение нашло подтверждение в результатах проделанной работы. КС могут служить индукторами процесса фибриллизации инсулина. В работе получены результаты, демонстрирующие, что в препарате инсулина НовоРапид может происходить индукция формирования β -структур в присутствии как КС штамма дрожжей WT, так и *bgl2Δ*, при этом в случае КС штамма WT это может приводить к образованию длинных структур фибриллярной морфологии. Данные свидетельствуют о необходимости продолжения исследований с целью получения ответа на вопрос, насколько препарат инсулина НовоРапид может быть рекомендован к применению лицам, больным микозом.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300088-6.

Литература

1. Nakamura M., Misumi Y., Nomura T. et al. Extreme Adhesion Activity of Amyloid Fibrils Induces Subcutaneous Insulin Resistance. *Diabetes*. 2019; 68(3): 609-616. doi:10.2337/db18-0846
2. Chernii S., Losytsky M., Kelm A. et al. Study of tetraphenylporphyrins as modifiers of insulin amyloid aggregation. *J Mol Recognit*. 2020; 33(1): e2811. doi:10.1002/jmr.2811
3. Surin A.K., Grishin S.Y., Galzitskaya O.V. Determination of amyloid core regions of insulin analogues fibrils. *Prion*. 2020; 14(1): 149-162. doi:10.1080/19336896.2020.1776062
4. Mastrotto F., Bellato F., Andretto V. et al. Physical PEGylation to Prevent Insulin Fibrillation. *J Pharm Sci*. 2020; 109(1): 900-910. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.020
5. Meesaragandla B., Karanth S., Janke U., Delcea M. Biopolymer-coated gold nanoparticles inhibit human insulin amyloid fibrillation. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 7862. doi:10.1038/s41598-020-64010-7
6. Mori W., Kaneko N., Nakanishi A. et al. Insulin amyloid fibrils interact directly with the NLRP3, resulting in inflammasome activation and pyroptotic cell death. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2021; 35: 20587384211038357. doi:10.1177/20587384211038357
7. Nilsson M.R. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. *Amyloid*. 2016; 23: 139-147. doi:10.1080/13506129.2016.1179183
8. Ansari A.M., Osmani L., Matsangos A.E., Li Q.K. Current insight in the localized insulin-derived amyloidosis (LIDA): clinico-pathological characteristics and differential diagnosis. *Pathol Res Pract*. 2017; 213(10): 1237-1241. doi:10.1016/j.prp.2017.08.013
9. Akbarian M., Yousefi R., Farjadian F., Uversky V.N. Insulin fibrillation: toward strategies for attenuating the process. *Chem Commun (Camb)*. 2020; 56(77): 11354-11373. doi:10.1039/d0cc05171c
10. Sarthy A.V., McGonigal T., Coen M. et al. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology*. 1997; 143(2): 367-376. doi:10.1099/00221287-143-2-367
11. Jeng H.W., Holmes A.R., Cannon R.D. Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med. Mycol*. 2005. 43(3): 209-217. doi:10.1080/13693780410001731637
12. Mouyna I., Hartl L., Latgé J.P. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol*. 2013; 4: 81. doi:10.3389/fmicb.2013.00081
13. Калебина Т.С., Рекстина В.В., Горковский А.А. и др. Сочетанное воздействие белка с амилоидными свойствами Bgl2p и других компонентов клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на состояние кожных покровов и поведение мышей. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2021; 3: 86-97. doi:10.14427/jipai.2021.3.86
14. Owens D., Vora J. Insulin aspart: a review. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2006; 2: 793-804. doi:10.1517/17425255.2.5.793
15. Калебина Т.С., Кулаковская Е.В., Рекстина В.В. и др. Влияние делеции генов, кодирующих Pho3p и Bgl2p, на уровень полифосфатов, адаптацию к стрессу и закрепление этих белков в клеточной стенке *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия*. 2023; 88(1): 125-135. doi:10.31857/S0320972523010098
16. Sherman F. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*. 2002; 350: 3-41. doi:10.1016/s0076-687950954-x
17. Rekstina V.V., Sabirzyanova T.A., Sabirzyanov F.A. et al. The post-translational modifications, localization, and mode of attachment of non-covalently bound glucanoglycosylases of yeast cell wall as a key to understanding their functioning. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 8304. doi:10.3390/ijms21218304
18. Nielsen L., Frokjaer S., Brange J. et al. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry*. 2001; 40: 8397-8409. doi:10.1021/bi0105983
19. Сурин А. К., Гришин С. Ю., Галзитская О. В. Определенные амилоидогенных участков, входящих в остов фибрилл инсулина. *Биохимия*. 2019; 84(1): 128-137. doi:10.1134/s0320972519010111
20. Phillips, N. B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., et al. Insulin fibrillation and protein design: topological resistance of single-chain analogs to thermal degradation with application to a pump reservoir. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2012; 6(2): 277-288. doi:10.1177/193229681200600210
21. Hudson S.A., Ecroyd H., Kee T.W., et al. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS Journal*. 2009; 276: 5960-5972. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x
22. Kulak N. A., Pichler G., Paron I. et al. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods*. 2014; 3: 319-324. doi:10.1038/nmeth.2834
23. Ryzhova T.A., Sopova J.V., Zadorsky S.P. et al. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome. *Curr Genet*. 2018; 64(2): 469-478. doi:10.1007/s00294-017-0759-7

Сведения об авторах

Прозоров М.А. — студент биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. E-mail: m.a.prozorov@yandex.ru.

Рекстина В.В. — мастер ТСП кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. E-mail: vrexstina@gmail.com.
Кудряшова И.Б. — научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. E-mail: newsmol2009@yandex.ru.

Драгоны О.А. — студент биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. E-mail: oliviadragoni@gmail.com.

Зиганшин Р.Х. — старший научный сотрудник группы масс-спектрометрии центра коллективного пользования «Биоорганика» ИБХ им. академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10. E-mail: rustam.ziganshin@gmail.com.

Камзолкина О.В. — доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. E-mail: o-kamzolkina@yandex.ru.

Калебина Т.С. — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. E-mail: kalebina@gmail.com.

Поступила 8.08.2023.