

Применение аполипопротеина А-I в качестве транспортной формы гена зеленого флуоресцирующего белка GFP в гепатоциты крыс

Л.М. Поляков¹, Д.В. Суменкова², М.В. Котова¹, Н.В. Трифонова¹, Р.А. Князев¹

¹ *ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины*

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*

630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

Резюме

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования аполипопротеина А-I (апо А-I) в качестве транспортной формы гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в гепатоциты крыс. **Материал и методы.** В качестве модели использовали культуру выделенных гепатоцитов крыс. Конъюгат апо А-I с флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ) получали путем инкубирования белка апо А-I с ФИТЦ в карбонатном буфере pH 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Плазмиды для трансфекции pE-GAG со встроенным геном *GFP* обогащали в промоторной части цис-элементами типа CC(GCC)3-5 для усиления комплексообразования с апо А-I. Для визуального анализа флуоресценции клеток использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп. **Результаты и их обсуждение.** В работе представлены доказательства проникновения путем рецептор-опосредованного эндоцитоза ФИТЦ-меченного апо А-I в цитоплазму и ядра гепатоцитов крыс. На этом основании предложена попытка использовать апо А-I в качестве средства адресной доставки плазмидной ДНК со встроенным геном белка GFP в клетку. Согласно результатам флуоресцентной микроскопии, использование апо А-I в качестве трансфицирующего агента плазмидной ДНК приводило к накоплению белка GFP в цитоплазме гепатоцитов. Экспрессии гена *GFP* и накопления флуоресцирующего белка в отсутствие апо А-I не наблюдалось. **Заключение.** Полученный результат может свидетельствовать о доставке гена *GFP* в ядерный аппарат клетки, его экспрессии и синтезе белка GFP.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, плазмидная ДНК, ген белка GFP, гепатоциты.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (регистрационный номер 1021050400914-1-1.6.4.) с использованием оборудования ЦКП «Спектрометрические измерения» и ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Автор для переписки: Поляков Л.М., e-mail: plm@niibch.ru

Для цитирования: Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Котова М.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А. Применение аполипопротеина А-I в качестве транспортной формы гена зеленого флуоресцирующего белка GFP в гепатоциты крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(4):91–96. doi: 10.18699/SSMJ20230409

The use of apolipoprotein A-I as a transport form of the green fluorescent protein GFP gene in rat hepatocytes

L.M. Polyakov¹, D.V. Sumenkova², M.V. Kotova¹, N.V. Trifonova¹, R.A. Knyazev¹

¹ *Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine*

630117, Novosibirsk, Timakova st., 2

² *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia*

630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

Abstract

The aim of this study was to investigate the possibility of using apolipoprotein A-I (apo A-I) as a transport form of the green fluorescent protein (GFP) gene into rat hepatocytes. **Material and methods.** A culture of isolated rat hepatocytes was used as a model. Apo A-I conjugate with fluorescein isothiocyanate (FITC) was obtained by incubation of apo A-I protein with FITC in carbonate buffer pH 9.5 at a ratio of 12.5 µg FITC per 1 mg of protein. Plasmids for pE-GAG transfection with an integrated *GFP* gene were enriched in the promoter part with cis-elements of the CC(GCC)3-5 type to enhance complex formation with apo A-I. An inverted fluorescence microscope was used for visual analysis of cell fluorescence. **Results and discussion.** The paper presents evidence of FITC-labeled apo A-I penetration into the cytoplasm and nuclei of rat hepatocytes by receptor-mediated endocytosis. On this basis, it is proposed an attempt to use apo A-I as a means of targeted delivery of plasmid DNA with an integrated GFP gene into the cell. According to the results of fluorescence microscopy, the use of apo A-I as a plasmid DNA transfection agent led to the accumulation of the GFP protein in the cytoplasm of hepatocytes. No fluorescent protein was observed in the absence of apo A-I. **Conclusions.** The result obtained may indicate the delivery of the GFP gene to the nuclear apparatus of the cell, its expression and GFP protein synthesis.

Key words: apolipoprotein A-I, plasmid DNA, *GFP* gene, hepatocytes.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Financing: The study was conducted within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (registration number 1021050400914-1-1.6.4.) using the equipment of the Common Use Centers “Spectrometric Measurements” and “Proteomic Analysis”, supported by funding of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement number 075-15-2021-691).

Correspondence author: Polyakov L.M., e-mail: plm@niibch.ru

Citation: Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Kotova M.V., Trifonova N.B., Knyasev R.A. The use of apolipoprotein A-I as a transport form of the green fluorescent protein GFP gene in rat hepatocytes. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(4):91–96. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230409

Введение

Проблема транспорта генетического материала в ядра клеток и поиск переносчиков продолжает оставаться актуальной. Хотя в последние годы и произошли заметные улучшения в технологиях доставки генов на основе катионных липидов и вирусных векторов, эти стратегии ограничены с точки зрения безопасности, иммуногенности, специфичности, токсичности и, конечно, стоимости [1, 2]. Невирусные системы включают методы переноса генов на основе белков, которые обладают такими преимуществами по сравнению с вирусными, как простота использования и производства, отсутствие ограничений на размер и тип нуклеиновой кислоты [3, 4]. В качестве одной из транспортных форм генетического материала в клетки эукариот могут выступать липопротеины плазмы крови, а также их белковые компоненты – аполипопротеины. Химическая природа липопротеинов, а также способность проникать в клетки путем рецептор-обусловленного эндцитоза обуславливают их преимущества в качестве естественных переносчиков биологически активных соединений [5]. Нами с использованием флуоресцентных красителей показана ДНК-связывающая способность различных классов липопротеинов плазмы крови. Оказалось, что не менее 12 % внеклеточной ДНК циркулирует в плазме крови в составе комплексов с липопротеи-

нами, из них около 8 % – с фракцией липопротеинов высокой плотности и их основного структурного компонента аполипопротеина А-I (апо А-I) [6]. В других работах показана способность апо А-I транспортировать малые интерферирующие РНК против вирусного гепатита С в гепатоциты мыши посредством скэвенджер-рецепторов [7, 8]. Отмечено также непосредственное участие апо А-I в переносе олигонуклеотидов через гематоэнцефалический барьер [9]. На основании вышесказанного целью настоящего исследования явилось изучение возможности применения апо А-I в качестве трансфицирующего агента гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в гепатоциты крыс.

Материал и методы

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар массой 180–200 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

При наркотизировании животного и проведении перфузии печени следовали общепринятой технике и рекомендациям, описанным в литературе. Ввод перфузата осуществляли через пред-

сердие, отток – через v. portae. Перед экстирпацией печени и проведением рециркуляторной ферментативной перфузии v. cava inf. перевязывали проксимальнее сосудистой ножки правой почки. В качестве среды выделения клеток на этапе декальцинации использовали сбалансированный солевой раствор Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} , содержащий 1,5 мМ ЭДТА- Na_2 (pH 7,4). Раствор пропускали со скоростью 15 мл/мин в течение 7–10 мин.

Гепатоциты выделяли методом рециркуляторной ферментативной перфузии печени крыс с использованием 0,03%-го раствора коллагеназы (ICN Biomedicals, США). Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения трипанового синего (Serva, Германия), составляла не менее 90 %. Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), pH 7,4, содержащей 20 мМ HEPES (ICN Biomedicals), 10 % эмбриональной сыворотки коров (Serva, Германия), 2 мМ L-глутамина («Вектор», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозы, 10 нМ инсулина (Serva, Германия). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе «Cole-Parmer» (США) в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 и 95 % воздуха, при температуре 37 °C, используя 6-луночные планшеты (Orange Scientific, США), покрытые коллагеном. Плотность клеток в первичной монослойной культуре составляла 800 клеток/мм².

Выделение и очистку апо A-I из плазмы крови проводили по методике, описанной в работе [10]. Анализ чистоты белков выполняли в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэмбли.

Конъюгат апо A-I с флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ) получали путем инкубирования белка апо A-I с ФИТЦ в течение ночи в карбонатном буфере pH 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Конъюгат от непрореагировавшего ФИТЦ отделяли с помощью гель-фильтрации на Sephadex G 25 (1 мг белка на 10 мл смолы, колонка 1×10 см). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм. Концентрацию белков ($\lambda = 280$ нм) и плазмидной ДНК (пДНК) (при $\lambda = 260$ нм) измеряли на спектрофотометре Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, США) (ЦКП «Спектрометрические измерения», НИИ биохимии ФИЦ ФТМ). Образование конъюгата в полученных хроматографических фракциях подтверждали анализом на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония) на наличие характерных для ФИТЦ пиков возбуждения (490 нм) и эмиссии (520 нм).

Плазмиды для трансфекции pE-GAG (4793 п.н.) со встроенным геном белка GFP

Aequorea victoria обогащали в промоторной части цис-элементами типа CC(GCC)3-5 для усиления комплексообразования с апо A-I. Плазмиды нарабатывали в клетках *E. coli*, штамм *recA*–NovaXGF (Novagen, США) – в среде LB в присутствии 30 мкг/мл канамицина. Качество плазмид и анализ фрагментов ДНК осуществляли методом электрофореза в 0,8–1,2%-м агарозном геле с последующим окрашиванием ДНК бромистым этидием. Плазмиды синтезированы и наработаны в лаборатории генной инженерии НИИ биохимии ФИЦ ФТМ под руководством профессора А.Б. Беклемишева. Связывание апо A-I с вектором показано спектрофлуориметрическим методом тушения триптофановой флуоресценции. Добавление вектора к белку приводило к изменению спектральных характеристик флуоресценции апо A-I с выраженным сдвигом максимума флуоресценции в коротковолновую область, с 340 до 297 нм. Указанные изменения свидетельствовали об образовании комплекса между апо A-I и вектором.

В качестве клеточной модели использовали культуру выделенных гепатоцитов крыс. Инкубирование клеток с комплексами апо A-I-ФИТЦ и апо A-I-GFP проводили после достижения культурой клеток конfluence на уровне 50–60 % в среде RPMI-1640 («Биолот»), pH 7,4, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, в 12-луночных планшетах (Orange Scientific), в CO_2 -инкубаторе EW-39200-15 (Cole-Parmer, США), в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 , при температуре 37 °C, в течение 30 мин.

За основу метода трансфекции взят протокол, прилагаемый фирмой-производителем Lipofectamine 2000 («Invitrogen:Life Technologies», США). На одну лунку использовали от 0,1 до 1,5 мкг ДНК и от 5 до 100 мкг апо A-I. Смесь инкубировали в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре в течение 20–30 минут и добавляли в лунки планшета. На следующие сутки инкубационную среду заменяли на свежую, не содержащую трансфицирующих реагентов.

Для визуального анализа флуоресценции клеток использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 40 CFL (Zeiss AG, Германия). Уровень трансфекции оценивали как долю количества флуоресцирующих клеток от общего числа клеток, наблюдаемых в микроскопическом поле (не менее 20 полей для каждого образца).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с

помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее методом иммуноферментного анализа с использованием специфических антител нами обнаружена апо А-I-иммунореактивность в составе ядерных структур гепатоцитов крыс. Апо А-I в ядрах был представлен двумя белками. Один белок с молекулярной массой 28 кДа соответствовал зрелой форме апо А-I и обнаруживался в транскрипционно активном хроматине и ядерном матриксе, другой, с молекулярной массой 14 кДа, являлся продуктом ограниченного протеолиза апо А-I и находился только в транскрипционно неактивном хроматине [11].

С целью доказательства проникновения апо А-I в клетку нами получен конъюгат апо А-I-ФИТЦ. Флуоресцентная микроскопия изолированных гепатоцитов, инкубированных в присутствии апо А-I-ФИТЦ в течение 30 мин при 37 °С, показала наличие выраженного специфического свечения в клетках (рис. 1). Отмечалась равномерная флуоресценция цитоплазмы и ядер. Полученные результаты позволили предполагать, что меченый белок посредством мембранных рецепторов захватывался и попадал в цитоплазму и ядерные структуры гепатоцитов.

Как известно, при 4 °С взаимодействие типа «рецептор – лиганд» на поверхности клеточной мембраны ограничивается только связыванием с рецепторами без последующей интернализации в клетку. В нашем исследовании инкубирование гепатоцитов при 4 °С в течение 30 мин показало связывание апо А-I-ФИТЦ с рецепторами клеточной мембраной без интернализации, что выражалось в равномерном флуоресцентном свечении всей поверхности наружной клеточной мембраны гепатоцитов (данные не приведены). Другим доказательством рецептор-опосредованного взаимодействия апо А-I-ФИТЦ с наружной клеточной мембраной явилось практически полное отсутствие в поле зрения флуоресцирующих клеток после трипсинизации клеток (предварительной обработки 0,25%-м раствором трипсина).

Обнаруженная нами способность ФИТЦ-меченого апо А-I попадать в цитоплазму гепатоцитов и накапливаться в ядрах клетки позволила предполагать возможность использования данного белка в качестве транспортного средства для адресной доставки генетического материала непосредственно в клетку. С этой целью выбрана пДНК с геном *GFP*, в промоторную часть которого были встроены цис-элементы типа CC(GCC) $_n$ для повышения его взаимодействия с апо А-I [12].

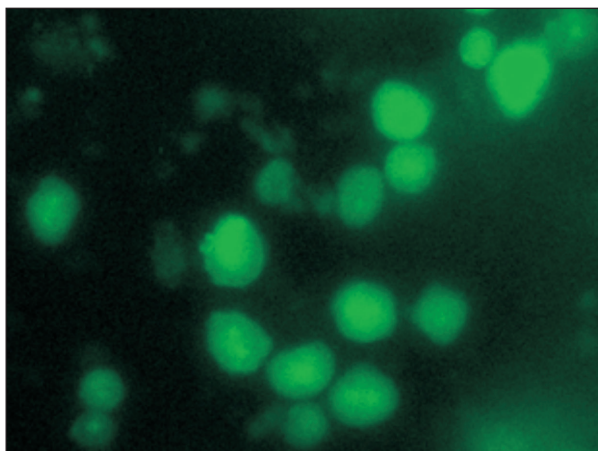


Рис. 1. Поглощение апо А-I-ФИТЦ изолированными гепатоцитами крыс через 30 мин инкубирования при 37 °С (ув. $\times 200$)

Fig. 1. Uptake of apoA-I-FITC by isolated rat hepatocytes after 30 min of incubation at 37 °C ($\times 200$)

Следует указать, что в настоящее время белок GFP – один из самых изучаемых и широко используемых в качестве репортера экспрессии в клеточной биологии белков [13].

Применение апо А-I в качестве трансфицирующего средства доставки пДНК с геном *GFP* оценивали по интенсивности ее экспрессии, выражающейся в накоплении белка GFP. Гепатоциты инкубировали в среде, содержащей 1,25 мкг/мл пДНК и 100 мкг/мл апо А-I, в течение 3 ч при 37 °С, затем выполняли флуоресцентную микроскопию при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны эмиссии 440 нм (рис. 2). Использование апо А-I в качестве трансфицирующего агента пДНК приводило к накоплению белка GFP в цитоплазматическом компартменте (рис. 2, а). Экспрессии пДНК и накопления флуоресцирующего белка в отсутствие в качестве переносчика апо А-I не наблюдалось (рис. 2, б). Полученный результат может свидетельствовать о доставке гена *GFP* в ядерный аппарат клеток, последующей его экспрессии и синтезе на основе мРНК зеленого флуоресцирующего белка GFP в цитоплазме гепатоцитов.

Последующий спектрофлуориметрический анализ лизатов гепатоцитов после инкубирования с пДНК показал значительно более выраженную интенсивность флуоресценции при использовании апо А-I в качестве трансфицирующего агента ($120,0 \pm 24,3$ у. е.) по сравнению с контролем без апо А-I ($20,0 \pm 4,3$ у. е.) ($p < 0,05$). Следует отметить, что лизаты гепатоцитов также флуоресцировали, что, скорее всего, было обусловлено не наработкой белка GFP, а наличием флуоресцирующих в исследуемом спектре естественных

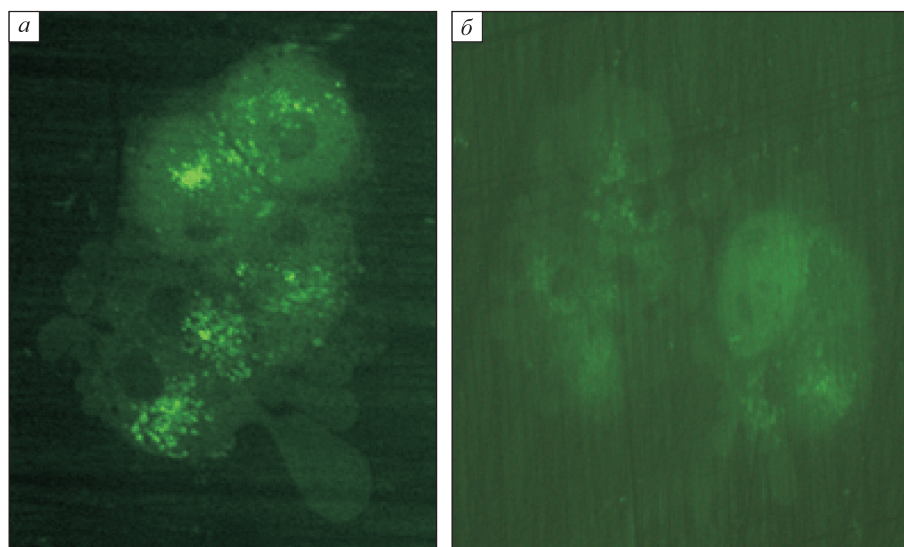


Рис. 2. Флуоресценция изолированных гепатоцитов крыс после инкубации с пДНК, содержащей ген белка GFP, с использованием апо А-I в качестве трансфицирующего агента (а) и без него (б) (ув. $\times 400$)

Fig. 2. Fluorescence of isolated rat hepatocytes after incubation with plasmid DNA, containing GFP gene, using apoA-I as a transfecting agent (a) and without it (b) ($\times 400$)

клеточных метаболитов и продуктов перекисного окисления липидов [14]. Поэтому данный уровень флуоресценции можно принять как фоновый.

Заключение

На культуре гепатоцитов крыс посредством рецепторного захвата показана способность меченного флуоресцентной меткой апо А-I попадать в цитоплазму и ядра клетки и возможность применения апо А-I в качестве трансфицирующего средства пДНК, содержащей ген белка GFP.

Список литературы / References

1. Kouraklis G. Gene therapy for cancer: From the laboratory to the patient. *Dig. Dis. Sci.* 2000;45(6):1045–1052. doi: 10.1023/a:1005592309466
2. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(21):7413–7417. doi: 10.1073/pnas.84.21.7413
3. Balicki D., Beutler E. Gene therapy of human disease. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(1):69–86. doi: 10.1097/00005792-200201000-00005
4. Jung H.J., Hwang D.S., Wei Q.D., Cha H.J. Carassius auratus – originated recombinant histone H1 C-terminal peptide as gene delivery material. *Biotechnol. Prog.* 2008;24(1):17–22. doi: 10.1021/bp070069b
5. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины высокой плотности и аполипопротеин А-I: регуляторная роль и новые терапевтические стратегии лечения атеросклероза. *Атеросклероз*. 2013;9(1):42–53.
6. Polyakov L.M., Panin L.E. High-density lipoprotein, and apolipoprotein A-I: a regulatory role and novel therapeutic strategies for the treatment atherosclerosis. *Ateroskleroz = Atherosclerosis*. 2013;9(1):42–53. [In Russian].
7. Суменкова Д.В., Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины как транспортная форма внеклеточной ДНК. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2012;154(11):577–579.
8. Sumenkova D.V., Polyakov L.M., Panin L.E. Plasma lipoproteins as a transport form of extracellular DNA. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013;154(11):622–623. doi: 10.1007/s10517-013-2014-7
9. Kim S.I., Shin D., Lee H., Ahn B.Y., Yoon Y., Kim M. Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J. Hepatol.* 2009;50(3):479–488. doi: 10.1016/j.jhep.2008.10.029
10. Michell D.L., Vickers K.C. Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;(12 Pt B): 2069–2074. doi: 10.1016/j.bbailip.2016.01.011
11. Kratzer I., Werning K., Panzenboeck U., Bernhart E., Reicher H., Wronski R., Windisch M., Hammer A., Malle E., Zimmer A., Sattler W. Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier. *J. Control. Release.* 2007;117(3):301–311. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.11.020
12. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. Анализ взаимодействия липопротеинов

со стероидными гормонами. *Биомед. химия*. 2011;57(3):308–313. doi:10.18097/pbmc20115703308

Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Panin L.E. The analysis of the interaction of lipoproteins and steroid hormones. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2011;57(3):308–313. [In Russian]. doi: 10.18097/pbmc20115703308

11. Panin L.E., Russkikh G.S., Polyakov L.M. Detection of apolipoprotein A-I, B, and E immunoreactivity in the nuclei of various rat tissue cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 2000;65(12):1419–1423. doi: 10.1023/a:1002861008363

12. Panin L., Gimautdinova O., Kuznetsov P., Tuzikov F. The mechanism of interacting biologically active complexes dehydroepiandrosterone- or tetrahydrocortisol-apolipoprotein A-I with DNA and their role in enhancement of gene expression and protein biosynthe-

sis in hepatocytes. *Curr. Chem. Biol.* 2011;5(1):9–16. doi: 10.2174/2212796811105010009

13. Степаненко О.В., Верхуша В.В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии. *Цитология*. 2007;49(5):395–420.

Stepanenko O.V., Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. Fluorescent proteins: physicochemical properties and use in cell biology. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*. 2007;49(5):395–420. [In Russian].

14. Zhang H., Forman H.J. Signaling by 4-hydroxy-2-nonenal: Exposure protocols, target selectivity and degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017;617:145–154. doi: 10.1016/j.abb.2016.11.003

Сведения об авторах:

Поляков Лев Михайлович, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: polyakov47@yandex.ru

Суменкова Дина Валерьевна, д.б.н., e-mail: dinasumenkova@mail.ru

Котова Мария Владимировна, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru

Трифоновна Наталия Викторовна, e-mail: ibch@niibch.ru

Князев Роман Александрович, к.б.н., ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru

Information about the authors:

Lev M. Polyakov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: polyakov47@yandex.ru

Dina V. Sumenkova, doctor of biological sciences, e-mail: dinasumenkova@mail.ru

Mariya V. Kotova, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru

Natalia V. Trifonova, e-mail: ibch@niibch.ru

Roman A. Knjazev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.2023

После доработки 11.05.2023

Принята к публикации 08.06.2023

Received 09.02.2023

Revision received 11.05.2023

Accepted 08.06.2023