

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 80 • № 4 • 2025 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Малахов В.В., Ежова О.В., Ганцевич М.М. Ectopharyngeata и Endopharyngeata вместо Protostomia и Deuterostomia? 219

Оригинальные исследования

- Пустовит О.Б., Кархов А.М., Кузьмин В.С. Ключевые транскриптомные характеристики нативного ритмоводителя сердца крысы, их изменение при культивировании неонатальных кардиомиоцитов и использование для оценки пейсмекерной компетентности. 229
- Булавин И.В., Калмыкова Д.И., Конобеев В.Д., Логвиненко Л.А., Шевчук О.М. Особенности структуры стебля *Myrtus communis* и его гистохимический анализ 242
- Баишникова И.В., Зайцева И.А., Калинина С.Н., Панченко Д.В., Ильина Т.Н. Содержание ретинола и α -токоферола у представителей семейства Cervidae (Mammalia, Cetartiodactyla) на северо-западе России 251
- Моцарь Е.В., Шевелева А.А., Шарко Ф.С., Михайленко А.П., Чирков С.Н. Обнаружение и молекулярный анализ вируса мягкой зеленой мозаики табака на пионе *Paeonia wittmanniana* 262
- Кочетова Э.С., Матвеева Д.К., Мелик-Пашаев А.Э., Романов Ю.А., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Структура коллагенового матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика: влияние условий культивирования. 268

Мнения

- Бондарев А.Д., Тюрин-Кузьмин П.А. Транскриптомика на уровне одиночных клеток в изучении функциональной гетерогенности жировой ткани: Насколько сопоставимы животные модели и человек? 277
- Хохлов А.Н. Статистический анализ в биомедицинских исследованиях: от достоверности к «тенденциям»? 284

- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2025 г. 290

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2025

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 80 • No. 4 • 2025 • OCTOBER — DECEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Reviews

- Malakhov V.V., Ezhova O.V., Gantsevich M.M. Ectopharyngeata and Endopharyngeata instead of Protostomia and Deuterostomia? 219

Research articles

- Pustovit O.B., Karhov A.M., Kuzmin V.S. Key transcriptomic characteristics of the native rat heart pacemaker, their changes during the cultivation of neonatal cardiomyocytes and their use to assess pacemaker competence 229
- Bulavin I.V., Kalmykova D.I., Konobeev V.D., Logvinenko L.A., Shevchuk O.M. *Myrtus communis* stem structure peculiarities and histochemical analysis 242
- Baishnikova I.V., Zaitseva I.A., Kalinina S.N., Panchenko D.V., Ilyina T.N. The level of retinol and α -tocopherol in Cervidae species (Mammalia, Cetartiodactyla) in the Northwest of Russia 251
- Motsar E.V., Sheveleva A.A., Sharko F.S., Mikhailenko A.P., Chirkov S.N. Detection and molecular characterization of tobacco mild green mosaic virus on the peony *Paeonia wittmanniana* 262
- Kochetova E.S., Matveeva D.K., Melik-Pashaev A.E., Romanov Yu.A., Buravkov S.V., Andreeva E.R. The structure of the collagenous matrix produced by human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells: The impact of cultivation conditions 268

Opinion articles

- Bondarev A.D., Tyurin-Kuzmin P.A. Single-cell transcriptomics in elucidating the functional heterogeneity of adipose tissue: How comparable are animal models to humans? 277
- Khokhlov A.N. Statistical analysis in biomedical research: From significance to “trends”? 284

- Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2025 290

© Moscow University Press,
“Lomonosov Biology Journal,” 2025

ОБЗОР

УДК 591:575.86



Ectopharyngeata и Endopharyngeata вместо Protostomia и Deuterostomia?

В.В. Малахов , О.В. Ежова , М.М. Ганцевич*

*Кафедра зоологии беспозвоночных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: mgantsevich@gmail.com*

Использование молекулярно-генетических методов привело к глубокой перестройке системы и филогении трехслойных Bilateria (=Triploblastica). Тем не менее, в большинстве филогенетических деревьев сохраняются две основные клады, совпадающие с Protostomia (первичноротыми) и Deuterostomia (вторичноротыми), установленными К. Гроббеном (Grobbe, 1908) более 100 лет назад. Для обеих клад Triploblastica первичным способом закладки сквозного кишечника является амфистомия. Однако анализ показывает, что только происхождение рта и ануса не позволяет провести различие между этими двумя основными кладами. Все группы, которые были отнесены К. Гроббеном к Protostomia, характеризуются эктодермальной глоткой, поэтому эту кладу правильнее было бы назвать Ectopharyngeata. На основе модификации кутикулы глотки у многих эктофарингеальных развиваются различные структуры, предназначенные для измельчения пищи. Группы, отнесенные К. Гроббеном к Deuterostomia, имеют энтодермальную глотку, поэтому правильнее было бы называть эту кладу Endopharyngeata. Синапоморфия Endopharyngeata заключается в развитии жаберных щелей в стенках энтодермальной глотки и подразделении глотки на две зоны – дорсальную жаберную и вентральную пищеварительную. В процессе эволюции хордовых произошла инверсия сторон тела, и та часть пищеварительной трубки, которая гомологична пищеварительной зоне глотки Hemichordata, стала дорсальной хордой, а жаберная зона глотки оказалась вентральной. Таким образом, разделение Triploblastica на две клады полностью сохраняет свое значение в современной биологии, хотя и основано на ином наборе морфологических признаков, чем тот, который рассматривал К. Гроббен.

Ключевые слова: Bilateria, Triploblastica, амфистомия, эктодермальная глотка, энтодермальная глотка, жаберные щели, эволюция, филогения

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-4

Введение

На протяжении всего XX в. наши представления о филогении и системе животного царства оставались в рамках парадигмы, предложенной австрийским зоологом К. Гроббеном [1], который на основе достижений биологии XIX в. разработал концепцию о том, что все билатерально-симметричные животные могут быть разделены на два ствола – первичноротых (Protostomia) и вторичноротых (Deuterostomia). Согласно этой парадигме, у первичноротых рот является производным blastopora, тогда как у вторичноротых на месте blastopora формируется анус, а рот прорывается независимо от blastopora. На рубеже XX и XXI вв., благодаря развитию молекулярно-филогенетических методов, наши представления о филогении и системе животного царства подверглись таким колоссальным перестройкам, что их можно рассма-

тривать как научную революцию [2, 3]. Методами молекулярной филогенетики было показано существование в пределах Triploblastica четырех крупных групп: Lophotrochozoa, Ecdysozoa, Chordata и Ambulacraria [4–13]. В то же время, в построенных методами молекулярной филогенетики деревьях существуют две клады, в основном совпадающие с выделенными К. Гроббеном [1] Protostomia и Deuterostomia.

Сравнительный анализ процессов формирования сквозного кишечника в онтогенезе Triploblastica показывает, что они далеко не всегда соответствуют правилам «первичноротости» и «вторичноротости» [14–21]. В самом деле, среди Deuterostomia типичная вторичноротость, т.е. превращение blastopora в анус и формирование рта независимо от blastopora, характерна только для иглокожих. В развитии Enteropneusta, blastopora

закрывается (хотя архентерон сохраняет связь с эктодермой), и дефинитивные отверстия пищеварительного тракта образуются заново, при этом рот прорывается на брюшной стороне в передней половине зародыша, а анус — на заднем конце зародыша на месте бластопора [22, 23]. С другой стороны, у типичных Protostomia немало примеров вторичноротости, когда анус формируется на месте бластопора, а рот прорывается на переднем конце без связи с бластопором. Такие примеры известны среди кольчатых червей [24], моллюсков [25], членистоногих [26], приапид [27] и волосатиков [28].

Очевидно, что названия Protostomia и Deuterostomia не отражают тех морфологических признаков, которые отделяют одну кладу от другой. Это приводит к большим трудностям в преподавании зоологии. Преподавателю приходится объяснять студентам, что, несмотря на то, что происхождение рта и ануса не всегда соответствует первичноротости и вторичноротости, сами первичноротые и вторичноротые как две основные клады билатерально-симметричных животных, тем не менее, существуют... Биологи незоологических специальностей часто вообще не в состоянии понять, почему названия Protostomia и Deuterostomia до сих пор используются, если они не отражают тех признаков, на которых основано разделение Triploblastica на две филогенетические ветви.

Если происхождение дефинитивных отверстий пищеварительного тракта не отражает реальных различий между Protostomia и Deuterostomia,

каковы же те морфологические синапоморфии, которые были приобретены предками двух главных клад трехслойных Bilateria на начальных этапах их эволюции? Настоящая статья является попыткой ответить на этот вопрос.

Амфистомия — первичный способ формирования сквозного кишечника у Triploblastica

Во многих группах Triploblastica формирование сквозного кишечника связано с амфистомией (рис. 1, верхний ряд). В этом случае бластопор вытягивается вдоль передне-задней оси, замыкается посередине, отверстие на переднем конце дает рот, а на заднем — анус. Типичная амфистомия характерна для онихофор [29, 30], нематод [31, 32], гастротрих [33, 34]. У аннелид щелевидный бластопор, как правило, замыкается от заднего своего конца к переднему, так, что рот представляет собой остаток бластопора, а анус открывается заново на месте заднего конца бластопора [35–38]. Такой характер замыкания щелевидного бластопора характерен для сипунктид [39], моллюсков [40–45], форонид [46, 47] и Kamptozoa [48, 49]. Среди брахиопод щелевидный бластопор у одних видов замыкается от своего заднего конца к переднему [50, 51], тогда как у других — от переднего конца к заднему [52–54]. Продольная борозда, которая соединяет зачаток стомодеума и проктодеума, характерна для многоножек [55, 56], насекомых [57, 58] и паукообразных [59]. Среди ракообразных щелевидный бластопор описан у Ostracoda [60].

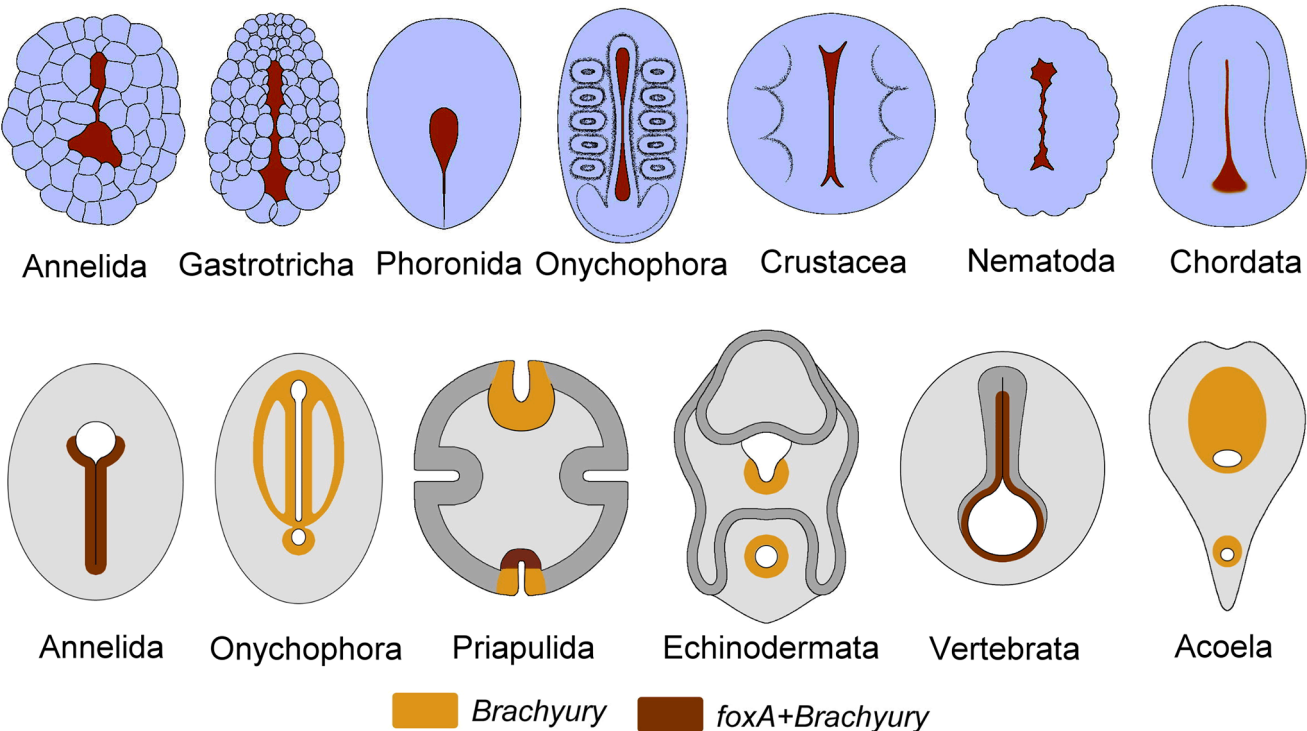


Рис. 1. Формирование сквозного кишечника путем амфистомии в эмбриогенезе Triploblastica. Верхний ряд — примеры щелевидного бластопора в разных группах Triploblastica, нижний ряд — экспрессия регуляторных генов *Brachyury* и *Brachyury+FoxA* в развитии Triploblastica (пояснения в тексте).

На месте замкнувшегося бластопора у личинок аннелид и моллюсков формируется ресничная полоска, соединяющая рот и анус, — невротрох. Заметим, что невротрох формируется также у личинок Deuterostomia, а именно у торнарий Enteropneusta [61]. Как известно, хордовые испытали инверсию сторон тела: их спинная (нейральная) сторона гомологична брюшной стороне других трехслойных Bilateria [62–64]. Процесс гастрюляции у хордовых — так же, как у всех Triploblastica — происходит на вегетативном полюсе яйца, но сам вегетативный полюс соответствует спинной (т.е. нейральной) стороне. Бластопор сужается за счет сближения своих боковых краев и нарастания нейрогенной эктодермы на его переднем краю. На месте бластопора формируется нервная пластинка, края которой образуют нервные валики. Впоследствии нервные валики смыкаются, образуя нервную трубку, а сужающееся отверстие бластопора становится нервно-кишечным каналом [62–69]. Нервная трубка хордовых выстлана изнутри ресничным эпителием — эпендимой [70, 71], что позволяет рассматривать ее как погружившийся невротрох. Таким образом, процессы гастрюляции и нейруляции Chordata представляют собой один из вариантов амфистомии.

Молекулярная генетика развития предоставила новые аргументы в пользу первичности амфистомии как способа формирования сквозного кишечника у Triploblastica (рис. 1, нижний ряд). У животных с выраженным щелевидным бластопором гены *Brachyury* и *FoxA* экспрессируются в зачатках рта, ануса и вдоль линии замыкающегося бластопора [18, 44, 72–75]. У приапулид *Brachyury* экспрессируется в зачатке рта и в зачатке ануса [27, 76]. У Ambulacraria зона экспрессии *Brachyury* локализована в области бластопора (который становится анусом) и в вентральной области, примыкающей к вторичному рту [77–79]. У хордовых зона экспрессии *Brachyury* окружает бластопор, а по мере его замыкания локализуется вдоль средней линии нервной пластинки, соединяя остаток бластопора на заднем конце зародыша и фарингеальную энтодерму — на переднем [18, 19, 80, 81]. Интересно, что у Acoela и Xenoturbellida, которые лишены ануса, экспрессия *Brachyury* имеет место на брюшной стороне вокруг рта и гонопора. При этом вокруг гонопора экспрессируются гены *cdx* и *orthopedia*, которые у Triploblastica со сквозным кишечником экспрессируются вокруг ануса [82–83]. Эти данные говорят о том, что предки Acoela и Xenoturbellida имели сквозной кишечник, при этом заднепроходное отверстие функционировало и как анус, и как гонопор, а после редукции сквозного кишечника сохранило только последнюю функцию. Заметим, что развитие на основе анального отверстия клоаки, в которую открываются кишечник и половая система, встречается у других мелких беспозво-

ночных с внутренним оплодотворением, например, у коловраток и самцов нематод.

Все это позволяет согласиться с высказанным более века назад мнением Мак-Брайда [65] (стр. 335), который писал: “That the mouth and anus in all animals in which two such openings are found, owe their origin to the division of a long slit-like coelenterate mouth I firmly believe.” («Я твердо убежден, что рот и анус у всех животных, у которых есть два таких отверстия, обязаны своим происхождением разделению длинного щелевидного рта кишечнополостных»).

Эктодермальная глотка — синапоморфия кледы Ectopharyngeata (=Protostomia)

Несмотря на то, что признаки, на которых Гроббен [1] основывал разделение билатерально-симметричных животных на Protostomia и Deuterostomia, не соответствуют реальному происхождению рта и ануса, начальная дивергенция двух главных филогенетических стволов трехслойных Bilateria связана с судьбой передних отделов кишечника.

Для всех групп, которые К. Гроббен [1] относил к Protostomia, характерно развитие обширной эктодермальной глотки, поэтому эту кледу правильнее было бы называть Ectopharyngeata (рис. 2, 1). В эмбриогенезе материал эктодермальной глотки мигрирует внутрь зародыша через отверстие на переднем крае щелевидного бластопора, поэтому первичный рот замыкается от своего заднего конца к переднему. Остающееся на переднем конце отверстие становится дефинитивным ртом, что характерно для многих Lophotrochozoa [33–49]. У онихофор, нематод и членистоногих развиты как обширная эктодермальная глотка (стомодеум), так и эктодермальная задняя кишка (проктодеум). В этом случае щелевидный бластопор замыкается посередине, и отверстия стомодеума и проктодеума оказываются одинаково хорошо выраженными в онтогенезе [29–33, 55–60].

Поскольку глотка Ectopharyngeata образована впяченной эктодермой, у организмов с кутикулярными покровами она сохраняет кутикулярную выстилку. На основе модификации кутикулярной выстилки глотки у многих Ectopharyngeata могут развиваться различного строения органы, предназначенные для измельчения пищи (рис. 2, 2–7). Это челюсти Annelida, челюсти и радула Mollusca, мастакс Rotifera, Micrognathozoa и Gnathostomulida, ловчие щетинки Chaetognatha, гиззард Bryozoa, хитиновые склериты провентрикулюса Arthropoda (так называемая «желудочная мельница»), кутикулярные клапаны бульбуса Nematoda, гребенчатые зубы Priapulida и другие подобные образования. В свое время К. Гроббен [1] отнес Chaetognatha к вторичноротым, опираясь на тот факт, что в эмбриогенезе морских стрелок рот и глотка развиваются на переднем конце зародыша независимо от

бластопора. Однако, если принять во внимание такой признак, как развитие эктодермальной глотки с хитиновыми ловчими щетинками, Chaetognatha относятся к кладе Ectopharyngeata. Данные молекулярной филогенетики указывают на близость Chaetognatha к Lophotrochozoa [84, 85].

Подобно многим другим, кутикулярные органы разных представителей Ectopharyngeata устроены по-разному. Маловероятно, чтобы последний общий предок Ectopharyngeata имел какие-то определенные модификации кутикулярной выстилки. Глоточные кутикулярные органы возникли на основе гомологичной структуры — выстиланной кутикулой эктодермальной глотки Ectopharyngeata — и с точки зрения классической сравнительной анатомии являются проявлением гомоплазии [86–88]. В то же время, в некоторых случаях мы можем говорить о гомологии кутикулярных образований в глотке представителей разных типов Ectopharyngeata. Так, например, ventральный фарингеальный орган аннелид, несущий модифицированную кутикулу, занимает то же положение, что и ventральный язык моллюсков, несущий радулу [89, 90]. Это позволяет рассматривать их как гомологичные структуры согласно первому критерию гомологии А. Ремане [91].

Энтодермальная глотка с жаберными щелями — синапоморфия Endopharyngeata (=Deuterostomia)

У представителей тех групп, которые К. Гроббен [1] относил к Deuterostomia, глотка — энтодермальный орган, поэтому эту кладу правильнее было бы называть Endopharyngeata (рис. 2, 8). Разумеется, само по себе наличие энтодермальной глотки нельзя рассматривать как синапоморфию Endopharyngeata, поскольку энтодермальная глотка — это исходный для трехслойных Bilateria признак. Синапоморфией клады Endopharyngeata является развитие в стенках энтодермальной глотки метамерных дыхательных отверстий — жаберных щелей (рис. 2, 9–11). В связи с развитием жаберных щелей глотка Endopharyngeata разделена на две параллельные трубки, или зоны, — пищеварительную (первоначально ventральную) и жаберную (первоначально дорсальную) (рис. 2, 12).

Это зонирование отчетливо выражено у всех Enteropneusta [92–96]. Как известно, хордовые перевернуты относительно других трехслойных Bilateria: их дорсальная сторона гомологична ventральной стороне прочих Triploblastica, а ventральная — гомологична дорсальной [62–64, 66–68, 97, 98]. У Chordata та часть пищеварительной трубки, которая гомологична пищеварительной зоне глотки

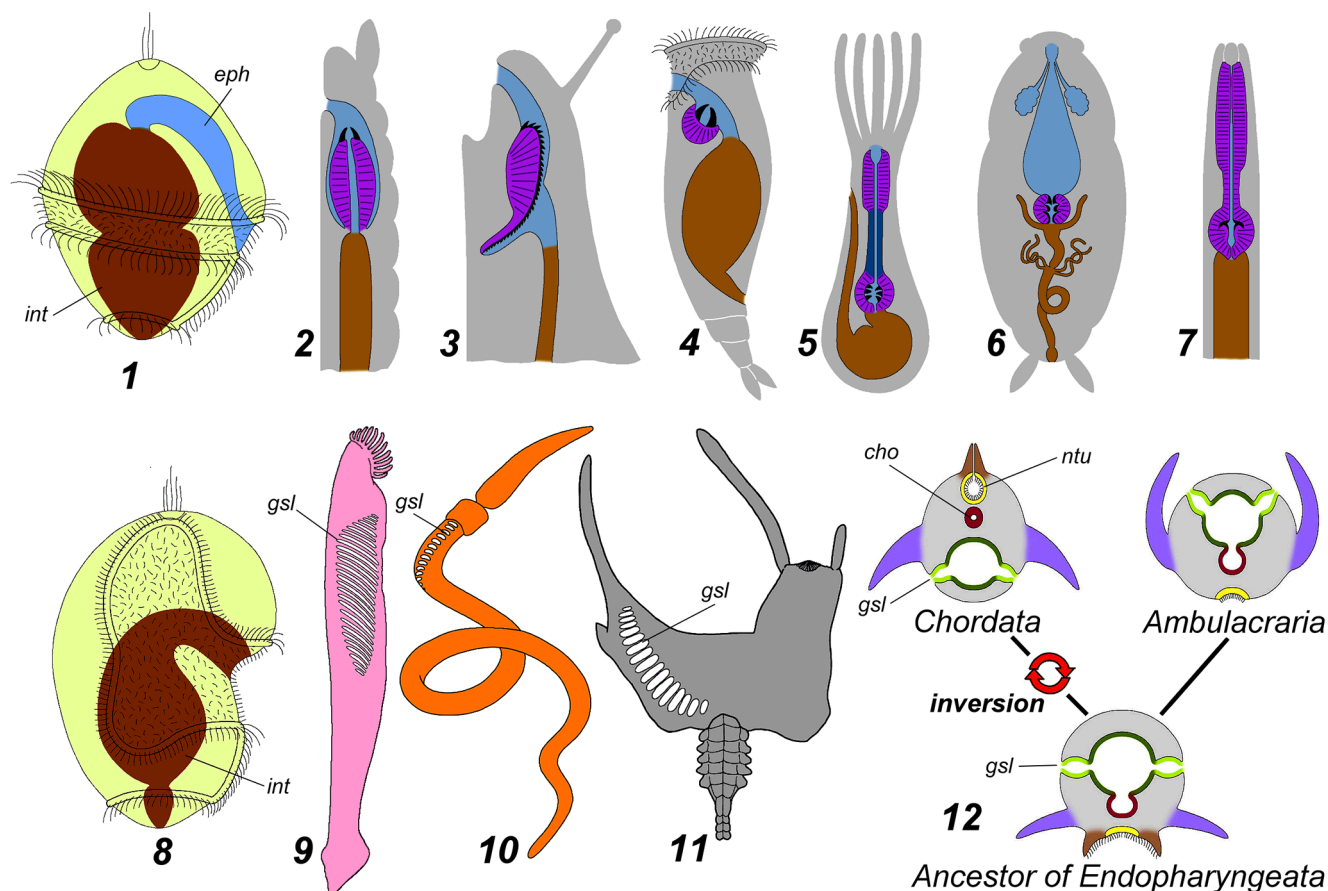


Рис. 2. Синапоморфии Ectopharyngeata и Endopharyngeata. Обозначения: 1 — трохофорная личинка Ectopharyngeata, 2–7 — примеры эктодермальной глотки Ectopharyngeata с кутикулярными склеритами (2 — Annelida, 3 — Mollusca, 4 — Rotifera, 5 — Bryozoa, 6 — Arthropoda, 7 — Nematoda), 8 — диплеврула Endopharyngeata, 9–11 — жаберные щели (9 — Chordata, 10 — Hemichordata, 11 — Stylophora), 12 — схема морфологической эволюции Endopharyngeata. Обозначения: cho — хорда, eph — эктодермальная глотка, gsl — жаберные щели, int — кишечник, ntu — нервная трубка.

Hemichordata, становится дорсальной хордой, а жаберная зона глотки занимает вентральное положение (рис. 2, 12).

Частичная или полная редукция жаберных щелей приводит к исчезновению дифференцировки глотки на жаберную и пищеварительную зоны. Для миниатюрных полухордовых Graptolithoidea (=Pterobranchia) характерна тенденция к редукции жаберных щелей. Две пары жаберных щелей найдены у *Atubaria heterolopha* [99, 100]. Вполне вероятно, однако, что под названием *A. heterolopha* описана ювенильная особь вида рода *Cephalodiscus* [101]. Взрослые представители рода *Cephalodiscus* имеют одну пару жаберных щелей [102–104], а многочисленные виды рода *Rhabdopleura* не имеют жаберных щелей вовсе [102–104]. Современные Echinodermata полностью лишены жаберных щелей и разделения глотки на пищеварительную и жаберную зоны. Однако представители нижнепалеозойской группы Stylophora (рис. 2, 11) имели метамерные дыхательные отверстия, которые рассматриваются как жаберные щели [105–110].

В последние годы стали появляться публикации, в которых показано, что поддержка монофилии Deuterostomia на молекулярных деревьях часто статистически слаба и может быть артефактом (например, следствием «притяжения длинных ветвей»), в то время как монофилия Protostomia поддерживается значительно сильнее [111, 112]. Заметим, что ряд эмбриологических признаков, которые ранее рассматривались как характерные черты Deuterostomia, – радиальное дробление, энтероцельный способ закладки целома и сама вторичноротость – как оказалось, встречаются также у некоторых групп Protostomia и поэтому не могут рассматриваться как синапоморфии вторичноротых. Однако разделение глотки на жаберную и пи-

щеварительную зоны и наличие жаберных щелей – это истинная синапоморфия Endopharyngeata, что подтверждает реальность этого таксона.

Загадочные червеобразные организмы Xenacoelomorpha рассматриваются либо как группа, сестринская ко всем остальным трехслойным Bilateria [113], либо как представители сильно упрощенных вторичноротых [114, 115]. Рассматривать Xenacoelomorpha как упростившихся потомков Deuterostomia возможно только, если принять их происхождение от личиночных стадий Ambulacraria путем прогенеза (=педоморфоза) [116]. Рот Xenacoelomorpha ведет прямо в энтодермальный кишечник или в пищеварительную паренхиму. Эктодермальной глотки у Xenacoelomorpha нет, и это говорит, скорее, в пользу их сближения с Endopharyngeata.

Заключение

Правила приоритета, установленные Международным кодексом зоологической номенклатуры [117], не распространяются на таксоны более высокого ранга, чем надсемейство. Названия Ectopharyngeata и Endopharyngeata информативнее и точнее отражают признаки, характеризующие две главных клады Triploblastica, чем названия Protostomia и Deuterostomia. Употребление терминов Ectopharyngeata и Endopharyngeata оправдано также и тем, что более не потребуется делать тех утомительных и путаных оговорок, которые неизбежны при употреблении названий Protostomia и Deuterostomia. Опыт чтения лекций в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова показывает, что студенты легко и сразу усваивают новые термины, поскольку использование названий Ectopharyngeata и Endopharyngeata исключает несоответствие названий и признаков.

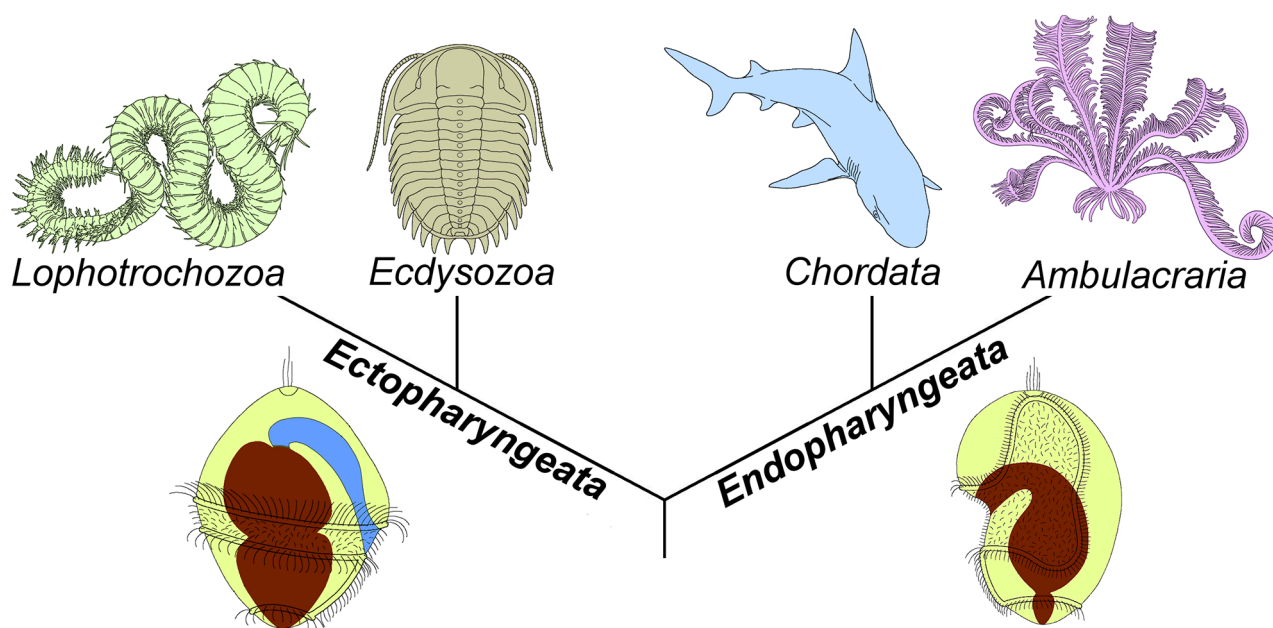


Рис. 3. Филогенетическое дерево Triploblastica.

Суть предлагаемой концепции состоит не в замене названий. Новый фактический материал позволит подтвердить или опровергнуть положения новой концепции. Это справедливо для всех составляющих современной эволюционной тетрады: сравнительной анатомии, биологии развития, молекулярной филогенетики и даже палеонтологии. Так, обнаружение в ископаемом материале глоточных склеритов будет свидетельствовать о принадлежности ископаемых организмов к Ectopharyngeata, тогда как находка отпечатков метамерных отверстий в стенке пищеварительного тракта (подобных тем, которые известны для ископаемых Stylophora) позволит отнести найденные остатки к Endopharyngeata.

Тот факт, что глубокая перестройка зоологической системы на рубеже XX и XXI вв. сохранила

два главных ствола Triploblastica (рис. 3), не противоречит ее трактовке как научной революции. Хорошо известно, что теория относительности, ознаменовавшая научную революцию в физике в начале XX в., сохранила основные положения классической механики [118, 119]. Истинное знание способно выдержать проверку временем. «Tempo è galantuomo...» («Время — честный человек»), как выразился Фигаро в бессмертной комедии Бомарше [120].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00047) и проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grobбен K. Die systematische Einteilung des Tierreiches. *Verh. kaiser.-könig. zool.-bot. Ges. Wien*. 1908;58(10):491–511.
2. Malakhov V.V. A new system of Bilateria. *Her. Russ. Acad. Sci.* 2010;80(3):29–41. DOI: 10.1134/S1019331610010041
3. Malakhov V.V. A revolution in zoology: New concepts of the metazoan system and phylogeny. *Her. Russ. Acad. Sci.* 2013;83(2):123–127. DOI: 10.1134/S1019331613020044
4. Halanych K.M., Bacheller J.D., Aguinaldo A.M., Liva S.M., Hillis D.M., Lake J.A. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science*. 1995;267(5204):1641–1643. DOI: 10.1126/science.7886451
5. Halanych K.M., Dahlgren T.G., McHugh D. Unsegmented annelids? Possible origins of four lophotrochozoan worm taxa. *Integr. Comp. Biol.* 2002;42(3):678–684. DOI: 10.1093/icb/42.3.678
6. Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A., Lake J.A. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 1997;387(6632):489–493. DOI: 10.1038/387489a0
7. de Rosa R., Grenier J.K., Andreeva T., Cook C.E., Adoutte A., Akam M., Carroll S.B., Balavoine G. *Hox* genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature*. 1999;399(6738):772–776. DOI: 10.1038/21631
8. Halanych K.M. The new view of animal phylogeny. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2004;35:229–256. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130124
9. Dunn C.W., Hejnol A., Matus D.Q. *et al.* Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*. 2008;452(7178):745–750. DOI: 10.1038/nature06614
10. Dunn C.W., Giribet G., Edgecombe G.D., Hejnol A. Animal phylogeny and its evolutionary implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2014;45:71–395. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627
11. Giribet G. New animal phylogeny: future challenges for animal phylogeny in the age of phylogenomics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2015;45:371–395. DOI: 10.1007/s13127-015-0236-4
12. Telford M., Budd G., Philippe H. Phylogenomic insights into animal evolution. *Curr. Biol.* 2015;25(19):876–887. DOI: 10.1016/j.cub.2015.07.060
13. Laumer C.E., Fernández R., Lemer S., Combosch D., Kocot K.M., Riesgo A., Andrade S.C.S., Sterrer W., Sørensen M.V., Giribet G. Revisiting metazoan phylogeny with genomic sampling of all phyla. *Proc. Biol. Sci.* 2019;286(1906):20190831. DOI: 10.1098/rspb.2019.0831
14. Малахов В.В. Проблемы построения общей системы многоклеточных. *Современная эволюционная морфология*. Под ред. Э.И. Воробьевой. Киев: Наукова думка; 1991:195–213.
15. Hejnol A., Martindale M.Q. *The mouth, the anus, and the blastopore – open questions about questionable openings. Animal Evolution: Genomes, Fossils, and Trees*. Eds. Telford M. J., and Littlewood D.T.J. Oxford: Oxford Academic; 2009:33–40.
16. Nielsen C. How to make a protostome. *Invertebrate Systematics*. 2012;26(1):25–40. DOI: 10.1071/IS11041
17. Nielsen C. Evolution of deuterostomy and origin of the chordates. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2015;92(1):316–325. DOI: 10.1111/brv.12229
18. Nielsen C., Brunet T., Arendt D. Evolution of the bilaterian mouth and anus. *Nat. Ecol. Evol.* 2018;2(9):1358–1376. DOI: 10.1038/s41559-018-0641-0
19. Nielsen C. Blastopore Fate: Amphistomy, Protostomy or Deuterostomy. *eLS*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2019:1–8. DOI: 10.1002/9780470015902.a0027481
20. Ivanova-Kazas O.M. The secondary mouth and its phylogenetic significance. *Russ. J. Mar. Biol.* 2015;41(1):83–93. DOI: 10.1134/S1063074015020054.
21. Martín-Durán J.M., Passamanek Y.J., Martindale M.Q., Hejnol A. The developmental basis for the recurrent evolution of deuterostomy and protostomy. *Nat. Ecol. Evol.* 2016;1(1):5. DOI: 10.1038/s41559-016-0005
22. Tagawa K., Nishino A., Humphreys T., Satoh N. The spawning and early development of the Hawaiian acorn worm (Hemichordate), *Ptychodera flava*. *Zool. Sci.* 1998;15(1):85–91. DOI: 10.2108/zsj.15.85
23. Miyamoto N., Saito Y. Morphology and development of a new species of *Balanoglossus* (Hemichordata: Enteropneusta: Ptychoderidae) from Shimoda. *Zool. Sci.* 2007;24(12):1278–1285. DOI: 10.2108/zsj.24.1278
24. Akesson B. The embryology of the polychaete *Eunice kobeensis*. *Acta Zoologica*. 1967;48(1–2):141–192. DOI: 10.1111/j.1463-6395.1967.tb00136.x

25. Dautert E. Die Bildung der Kaimblätter bei *Paludina*. *Zool. Jb. Abt. Anat.* 1926;50(4):433–496.
26. Zilch R. Embryologische Untersuchungen an der holoblastischen Ontogenese von *Penaeus trisulcatus* Leach (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphologie*. 1978;90(1):67–100.
27. Martín-Durán J.M., Janssen R., Wennberg S., Budd G.E., Hejnol A. Deuterostomic development in the protostome *Priapulius caudatus*. *Curr. Biol.* 2012;22(22):2161–2166. DOI: 10.1016/j.cub.2012.09.037
28. Малахов В.В., Спиридонов С.Э. Эмбриональное развитие *Gordius* sp. из Туркмении с обсуждением положения волосатиков в системе животного царства. *Зоол. журн.* 1984;63(9):1285–1296.
29. Balfour F.M. Anatomy and development of *Peripatopsis capensis*. *Quart. J. Micr. Soc.* 1883;23(2):213–259.
30. Sedgwick A. The development of *Peripatus capensis*. Part I. *Quart. J. Micr. Soc.* 1885;25(4):449–466.
31. Malakhov V.V. *Nematodes. Structure, Development, Classification, Phylogeny*. Washington and London: Smithsonian Institution Press; 1994. 286 pp.
32. Malakhov V.V. Embryological and histological peculiarities of the order Enoplida, a primitive group of nematodes. *Russ. J. Nematol.* 1998;6(1):41–46.
33. de Beauchamp P.M. La development des Gastrotriches. *Bull. Soc. Zool. France*. 1929;54(5):549–558.
34. Teuchert G. Zur Fortpflanzung und Entwicklung der Macrodasypoidea (Gastrotricha). *Z. Morphol. Tiere*. 1968;63(2):343–418.
35. Treadwell A.L. The cytogeny of *Podarke obscura*. *J. Morphol.* 1901;17(2):399–476.
36. Woltereck R. Trochophorastudien. 1. Ueber die Entwicklung des Annelids bei den Polygordiusarten der Nordsee. *Bibliotheca Zoologica (Stuttgart)*. 1902;34:1–71.
37. Shearer C. The development of the trochophore of *Hydroides (Eupomatus) uncinatus*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1911;56(2):543–590.
38. Akesson B. The embryology of *Tomopteris helgolandicus* (Polychaeta). *Acta Zoologica*. 1962;48(1):135–199.
39. Adrianov A.V., Mayorova A.S., Malakhov V.V. Embryonic development of the peanut worm *Themiste pyroides* (Sipuncula: Sipunculoidea) from the Sea of Japan. *Invertebr. Reprod. Dev.* 2008;52(1):143–151. DOI: 10.1080/07924259.2008.9652282.
40. Patten W. The embryology of *Patella*. *Arb. Zool. Inst. Univ. Wien und Zool. Stat. Triest*. 1886;6(2):149–174.
41. Conklin E.G. The embryology of *Crepidula*. *J. Morphol.* 1897;13(1):1–226.
42. Heath H. The development of *Ischnochiton*. *Zool. Jb. Abt. Anat.* 1898;12(2):567–565.
43. Малахов В.В., Медведева Л.А. Эмбриональное развитие двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* (Mytilida, Mytilidae). *Зоол. журн.* 1985;64(12):1808–1815.
44. Lartillot N., Lespinet O., Vervoort M., Adoutte A. Expression pattern of *Brachyury* in the mollusk *Patella vulgate* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. *Development*. 2002;129(6):1411–1421. DOI: 10.1242/dev.129.6.1411
45. Lyons D.C., Perry K.J., Henry J.Q. Spiralian gastrulation: germ layer formation, morphogenesis, and fate of the blastopore in the slipper snail *Crepidula fornicata*. *EvoDevo*. 2015;6:24. DOI:10.1186/s13227-015-0019-1
46. Rattenbury J. C. The embryology of *Phoronopsis viridis*. *J. Morph.* 1954;95(2):289–349.
47. Temereva E.N., Malakhov V.V. Embryogenesis and larval development of *Phoronopsis harmeri* Pixell, 1912 (Phoronida): dual origin of the coelomic mesoderm. *Invertebr. Reprod. Dev.* 2007;50(2):57–66. DOI: 10.1080/07924259.2007.9652228.
48. Marcus E. Briozoários marinhos brasileiros. 3. *Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Univ. San Paulo. Zool.* 1939;3(1):111–299.
49. Малахов В.В. Описание развития *Ascopodaria discreta* (Coloniales, Barentsiidae) и обсуждение положения Камптозоа в системе животного царства. *Зоол. журн.* 1990;69(10):20–30.
50. Conklin E.G. The embryology of a brachiopod, *Terebratulina septentrionalis* Couthouy. *Proc. Am. Philos. Soc.* 1902;41(1):41–76.
51. Martín-Durán J., Passamanek Y., Martindale M., Hejnol A. The developmental basis for the recurrent evolution of deuterostomy and protostomy. *Nat. Ecol. Evol.* 2016;1(1):5. DOI: 10.1038/s41559-016-0005
52. Ковалевский А.О. Наблюдения над развитием Brachiopoda. *Изв. Им. О-ва любит. естествозн., антропол. этногр.* 1874;14(1):1–40.
53. Nielsen C. The development of the brachiopod *Crania (Neocrania) anomala* (O.F. Müller) and its phylogenetic significance. *Acta Zool.* 1991;72(1):7–28. DOI: 10.1111/j.1463-6395.1991.tb00312.x
54. Vellutini B.C., Hejnol A. Expression of segment polarity genes in brachiopods supports a non-segmental ancestral role of engrailed for bilaterians. *Sci. Rep.* 2016;6:32387. DOI: 10.1038/srep32387
55. Heymons R. Die Entwicklungsgeschichte der Scolopender. *Bibliotheca Zoologica (Stuttgart)*. 1901;13:1–224.
56. Иванов П.П. Эмбриональное развитие сколопендры в связи с эмбриологией и морфологией Tracheata. *Изв. АН СССР. Отдел. биол. наук.* 1940;6:831–861.
57. Wheeler W.M. A contribution to insect embryology. *J. Morphol.* 1893;8(1):1–161.
58. Jura C. Embryogenesis of the alimentary system of the weevil, *Phyllobius glaucus*. *Zool. Poloniae*. 1956;7(1):155–176.
59. Brauer A. Entwicklungsgeschichte des Scorpions. *Z. wiss. Zool.* 1894;57(2):409–432.
60. Weygoldt P. Embryologische Untersuchungen an Ostracoden: Die Entwicklung von *Cyprides litoralis*. *Zool. Jb. Abt. Anat.* 1960;78(2):370–426.
61. Nielsen C., Hay-Schmidt A. Development of the enteropneust *Ptychodera flava*: ciliary bands and nervous system. *J. Morphol.* 2007;268(7):551–570. DOI: 10.1002/jmor.10533
62. Малахов В.В. Проблема основного плана строения в различных группах вторичноротых животных. *Журн. общ. биологии.* 1977;38(4):485–499.
63. Arendt D., Nübler-Jung K. Inversion of dorsoventral axis. *Nature*. 1994;371(6492):26. DOI: 10.1038/371026a0
64. Arendt D., Nübler-Jung K. Dorsal or ventral: similarities in fate maps and gastrulation patterns in annelids, arthropods and chordates. *Mech. Dev.* 1997;61(1–2):7–21. DOI: 10.1016/s0925-4773(96)00620-x
65. MacBride E. W. The formation of the layers in amphioxus and its bearing on the interpretation of the early ontogenetic processes in other vertebrates. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1909;54(3):279–345.
66. Bergström J. Origin of high-rank groups of organisms. *Paleontol. Res.* 1997;1(1):1–14.
67. Nübler-Jung K.N., Arendt D. Dorsoventral axis inversion. Enteropneust anatomy links invertebrates to chordates turned upside down. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 1999;37(2):93–100.

68. Lacalli T.C. The emergence of the chordate body plan: some puzzles and problems. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2010;91(1):4–10. DOI: 10.1111/j.1463-6395.2008.00384.x
69. Veeman M.T., Newman-Smith E., El-Nachef D., Smith W.C. The ascidian mouth opening is derived from the anterior neuropore: reassessing the mouth/neural tube relationship in chordate evolution. *Dev. Biol.* 2010;344(1):138–149. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.04.028
70. Максимов А.А. *Основы гистологии*. Петроград: К.Л. Риккер; 1914. 382 с.
71. Jiménez A.J., Domínguez-Pinos M.D., Guerra M.M., Fernández-Llebrez P., Pérez-Figares J.M. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2014;2:e28426. DOI: 10.4161/tisb.28426
72. Denes A.S., Jékely G., Steinmetz P.R., Raible F., Snyman H., Prud'homme B., Ferrier D.E., Balavoine G., Arendt D. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell*. 2007;129(2):277–288. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.040
73. Arenas-Mena C. *Brachyury*, *Tbx2/3* and *sall* expression during embryogenesis of the indirectly developing polychaete *Hydroides elegans*. *Int. J. Dev. Biol.* 2013;57(1):73–83. DOI: 10.1387/ijdb.120056ca
74. Lauri A., Brunet T., Handberg-Thorsager M., Fischer A.H., Simakov O., Steinmetz P.R., Tomer R., Keller P.J., Arendt D. Development of the annelid axochord: insights into notochord evolution. *Science*. 2014;345(6202):1365–1368. DOI: 10.1126/science.1253396
75. Boyle M.J., Yamaguchi E., Seaver E.C. Molecular conservation of metazoan gut formation: evidence from expression of endomesoderm genes in *Capitella teleta* (Annelida). *EvoDevo*. 2014;5:39. DOI: 10.1186/2041-9139-5-39
76. Martín-Durán J. M., Hejnal A. The study of *Priapulius caudatus* reveals conserved molecular patterning underlying different gut morphogenesis in the Ecdysozoa. *BMC Biol.* 2015;13:29. DOI: 10.1186/s12915-015-0139-z
77. Arendt D., Technau U., Wittbrodt J. Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature*. 2001;409(6816):81–85. DOI: 10.1038/35051075
78. Tagawa K., Humphreys T., Satoh N. Novel pattern of *Brachyury* gene expression in hemichordate embryos. *Mech. Dev.* 1998;75(1–2):139–143. DOI: 10.1016/S0925-4773(98)00078-1
79. Shoguchi E., Satoh N., Maruyama Y.K. Pattern of *Brachyury* gene expression in starfish embryos resembles that of hemichordate embryos but not of sea urchin embryos. *Mech. Dev.* 1999;82(1–2):185–189. DOI: 10.1016/S0925-4773(99)00008-8
80. Davidson A.J., Zon L.I. The caudal-related homeobox genes *cdx1a* and *cdx4* act redundantly to regulate hox gene expression and the formation of putative hematopoietic stem cells during zebrafish embryogenesis. *Dev. Biol.* 2006;292(2):506–518. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.01.003
81. Mudumana S.P., Hentschel D., Liu Y., Vasilyev A., Drummond I.A. *odd skipped related1* reveals a novel role for endoderm in regulating kidney versus vascular cell fate. *Development*. 2008;135(20):3355–3367. DOI: 10.1242/dev.022830
82. Hejnal A., Martindale M. Acoel development indicates the independent evolution of the bilaterian mouth and anus. *Nature*. 2008;456(7220):382–386. DOI: 10.1038/nature07309
83. Andrikou C., Pang K., Børve A., Lu T-M., Hejnal A. Molecular evidence from xenacoelomorph gonopore formation supports homology with the bilaterian anus. *Nat. Ecol. Evol.* 2025;9:2116–2126. DOI: 10.1038/s41559-025-02866-6
84. Marlétaz F., Peijnenburg K.T.C.A., Goto T., Satoh N., Rokhsar D.S. A new spiralian phylogeny places the enigmatic arrow worms among gnathiferans. *Curr. Biol.* 2019;29(2):312–318. DOI: 10.1016/j.cub.2018.11.042
85. Piovani L., Gavriouchkina D., Parey E., Sarre L.A., Peijnenburg K.T.C.A., Martín-Durán J.M., Rokhsar D.S., Satoh N., de Mendoza A., Goto T., Marlétaz F. The genomic origin of the unique chaetognath body plan. *Nature*. 2025;645(8082):964–973. DOI: 10.1038/s41586-025-09403-2. DOI: 10.1038/s41586-025-09403-2
86. Lancaster E.R. On the use of the term homology in modern zoology, and the distinction between homogenetic and homoplastic agreements. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 1870;6(31):34–43.
87. Любичев А.А. Понятие сравнительной анатомии. В кн.: *Вопросы общей зоологии и медицинской паразитологии*. М.: Биомедгиз; 1962:189–214.
88. Beklemishev V.N. *Principles of comparative anatomy of invertebrates: V. 1 Promorphology, vol. 2 Organology*. Univ. Chicago Press; 1969. 1058 pp.
89. Иванов Д.Л., Цетлин А.Б. Возникновение и эволюция кутикулярного глоточного вооружения у трохофорных животных с вентральной глоткой. *Зоол. журн.* 1981;60(11):1445–1454.
90. Tzetlin A., Purschke G. Pharynx and intestine. *Hydrobiologia*. 2005;535/536(1):199–225. DOI: 10.1007/1-4020-3240-4_12
91. Remane A. *Die Grundlagen des natürlichen Systems der vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik*. Leipzig; 1952. 400 S.
92. Spengel J.W. *Die Enteropneusten des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. Fauna und Flora des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. Herausgegeben von der Zoologischen Station zu Neapel*. Berlin: Friedländer. 1893;18:1–757.
93. van der Horst C.J. *Hemichordata. Klassen und Ordnungen des Tierreichs wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild*. Ed. Bronn H.G. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft; 1939: 1–737.
94. Barrington E.J.W. Observations on feeding and digestion in *Glossobalanus minutus*. *Quart. J. Micr. Sci.* 1940;82(2):227–260.
95. Burdon-Jones C. The feeding mechanism of *Balanoglossus gigas*. *Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. Univ. Sao Paulo. Zoologia*. 1962;24(261):255–280.
96. Cameron C.B. Particle retention and flow in the pharynx of the enteropneust worm *Harrimania planktophilus*: the filter-feeding pharynx may have evolved before the chordates. *Biol. Bull.* 2002;202(2):192–200. DOI: 10.2307/1543655
97. Slack J.M.W., Holland P.W.H., Graham C.F. The zootype and the phylotypic stage. *Nature*. 1993;361(6412):490–492. DOI: 10.1038/361490a0
98. Ruppert E.E., Cameron C.B., Frick J.E. Endostyle-like features of the dorsal epibranchial ridge of an enteropneust and the hypothesis of dorso-ventral inversion in chordates. *Invert. Biol.* 1999;118(2):202–212. DOI: 10.2307/3227061
99. Sato T. Vorläufige mitteilung fiber *Atubaria heterolopha* gen. nov., sp. nov., einen in freiem zustand aufgefundenen Pterobranchier aus dem stillen ozean. *Zoologische Anzeiger*. 1936;15(7):97–106.

100. Komai T. Internal structure of the pterobranch *Atubaria heterolopha* with an appendix on the homology of the 'notochord'. *Proc. Japan Acad.* 1949;25(7):19–24.
101. Halanych K. Convergence in the feeding apparatuses of lophophorates and pterobranch hemichordates revealed by 18S rDNA: An interpretation. *Biol. Bull.* 1996;190(1):1–5. DOI: 10.2307/1542669
102. Щепотьев А. *Pterobranchia*. Санкт-Петербург: Типография Стасюлевича; 1907. 248 с.
103. Lester S.M. *Cephalodiscus* sp. (Hemichordata: Pterobranchia): observations of functional morphology, behavior and occurrence in shallow water around Bermuda. *Mar. Biol.* 1985;85(3):263–268. DOI: 10.1007/BF00393246
104. Maletz J., Cameron C.B. Treatise on invertebrate paleontology, part V, chapter 3: introduction to class Pterobranchia Lankester, 1877. *Treatise Online*. 2016;82:1–15.
105. Bather-London F.A. Vortrage und diskussionen auf der Wiener Tagung der Palaeontologischen Gesellschaft im September 1923: *Cothurnocystis*: a study in adaptation. *Paläontologische Zeitschrift*. 1926;7(1):1–15.
106. Jefferies R.P.S. Some fossil chordates with echinoderm affinities. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 1967;20:163–208.
107. Jefferies R.P.S. *The ancestry of the vertebrates*. British Museum (Natural History) & Cambridge University Press; 1986. 376 pp.
108. Ubaghs G. Stylophora. *Treatise on Invertebrate Paleontology. Part S. Echinodermata, vol. 1*. Ed. R.C. Moore. Lawrence: Geological Society of America and University of Kansas Press; 1968:495–565.
109. Ubaghs G. Early Paleozoic echinoderms. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* 1975;3(1):79–98.
110. Ruta M. Brief review of the stylophoran debate. *Evol. Dev.* 1999;1(2):123–135. DOI: 10.1046/j.1525-142x.1999.99008.x
111. Kapli P., Natsidis P., Leite D.J., Fursman M., Jeffrie N., Rahman I.A., Philippe H., Copley R.R., Telford M.J. Lack of support for Deuterostomia prompts reinterpretation of the first Bilateria. *Sci. Adv.* 2021;7(12):eabe2741. DOI: 10.1126/sciadv.abe2741
112. Silva A.S., Natsidis P., Piovani L., Kapli P., Telford M.J. Is the deuterostome clade an artifact? *Curr. Biol.* 2025;35(15):3611–3623. DOI: 10.1016/j.cub.2025.06.045
113. Cannon J.T., Vellutini B.C., Smith J. 3rd, Ronquist F., Jondelius U., Hejnol A. Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature*. 2016;530(7588):89–93. DOI: 10.1038/nature16520
114. Philippe H., Brinkmann H., Copley R.R., Moroz L.L., Nakano H., Poustka A.J., Wallberg A., Peterson K.J., Telford M.J. Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature*. 2011;470(7333):255–258. DOI: 10.1038/nature09676
115. Philippe H., Poustka A.J., Chiodin M. et al. Mitigating anticipated effects of systematic errors supports sister-group relationship between Xenacoelomorpha and Ambulacraria. *Curr. Biol.* 2019;29(11):1818–1826. DOI: 10.1016/j.cub.2019.04.009
116. Martynov A., Lundin K., Picton B., Fletcher K., Malmberg K., Korshunova T. Multiple pedomorphic lineages of soft-substrate burrowing invertebrates: parallels in the origin of *Xenocratena* and *Xenoturbella*. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227173. DOI: 10.1371/journal.pone.0227173
117. *Международный кодекс зоологической номенклатуры*. Изд. 4-е. М.: Т-во науч. изд. КМК; 2004. 223 с.
118. Kuhn T.S. *The Structure of Scientific Revolutions*. University of Chicago Press; 1962. 172 pp.
119. Гинзбург В.Л. О физике и астрофизике: Статьи и выступления. М.: Наука; 1992. 528 с.
120. de Beaumarchais P.-A.C. *La Folle Journee, ou le Mariage de Figaro*. Paris: De l'Imprimerie de la Societe Littéraire-Typographique; 1785. 201 pp.

Поступила в редакцию 18.08.2025

После доработки 01.12.2025

Принята в печать 02.12.2025

REVIEW

Ectopharyngeata and Endopharyngeata instead of Protostomia and Deuterostomia?

V.V. Malakhov , O.V. Ezhova , M.M. Gantsevich* 

Department of Invertebrate Zoology, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: mgantsevich@gmail.com

The use of molecular phylogenetic methods has caused a profound rearrangement of the system and phylogeny of the triploblastic Bilateria (=Triploblastica). Nevertheless, in most phylogenetic trees, two main clades remain, coinciding with Protostomia and Deuterostomia, established by K. Grobбен (1908) more than 100 years ago. For both clades of Triploblastica, amphistomy is the primary way of forming a through intestine. However, the analysis shows that only the origin of the mouth and anus does not allow us to distinguish between the two main clades. All the groups that were referred to Grobбен's Protostomia are characterized by an ectodermal pharynx, therefore this clade would be more correctly called Ectopharyngeata. Based on the modification of the pharyngeal cuticle, many ectopharyngeates develop various structures designed to grind food. The groups attributed by K. Grobбен to Deuterostomia have an endodermal pharynx, therefore it would be more correct to call this clade Endopharyngeata. The synapomorphy of Endopharyngeata is the development of gill slits in the walls of the endodermal pharynx and the

division of the pharynx into two zones – the dorsal branchial zone, and ventral digestive zone. During the evolution of the chordates, the sides of the body were inverted. As a result, that part of the digestive tube, which is homologous to the hemichordate digestive zone of the pharynx, became the dorsal notochord and the branchial zone of the pharynx turned out to be ventral. Thus, the division of Triploblastica into two clades entirely retains its significance in modern biology, although it is based on a different set of morphological features than that considered by K. Grobбен.

Keywords: *Bilateria, Triploblastica, amphystomy, ectodermal pharynx, endodermal pharynx, gill slits, evolution, phylogeny*

Funding: This study was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-14-00047.

Сведения об авторах

Малахов Владимир Васильевич – докт. биол. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: vmalakhov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1637-2354>

Ежова Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: olga_ejova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4533-7769>

Ганцевич Михаил Маркович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: mgantsevich@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4854-2787>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.172+612.179.1

Ключевые транскриптомные характеристики нативного ритмоводителя сердца крысы, их изменение при культивировании неонатальных кардиомиоцитов и использование для оценки пейсмекерной компетентности

О.Б. Пустовит^{1,*} , А.М. Кархов^{1,2} , В.С. Кузьмин^{1,2} ¹Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

*e-mail: k_pustovit@mail.ru

Важной задачей на пути создания компетентного клеточного эквивалента биологического пейсмекера сердца для терапии сердечно-сосудистых заболеваний является оценка способности культивируемых кардиомиоцитов в конгломератах, слоях или псевдоткани к автоматической спонтанной активности. Известно, что электрофизиологические и тканевые свойства культивируемых кардиомиоцитарных структур существенно отличаются от нативных. В данной работе, на основании сопоставления транскрипционного профиля, оценки уровня экспрессии ключевых генов в ткани синоатриального узла (САУ), предсердия, неонатальных и культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов крысы, предложены индексы пейсмекерной компетентности (ИПК), характеризующие способность (компетентность) клеточных структур к функционированию в качестве ритмоводителя. С помощью анализа данных секвенирования мРНК установлено, что при культивировании неонатальных кардиомиоцитов происходит существенное изменение профиля экспрессии функционально значимых генов, которое усиливает отличие фенотипа формирующихся конгломератов как от пейсмекера САУ, так и от сократительного миокарда. Впервые показано, что удовлетворительные ИПК могут быть получены на основе оценки уровня мРНК транскриптов не более четырех генов, включающих антагонистически экспрессируемые в САУ и сократительном миокарде пары транскрипционных факторов (*Tbx3*, *Tbx18* и *Nkx2.5*, *Gata4*) либо пары ионных каналов (*Hcn4*, *Kcnj2*) и щелевых контактов (*Gjc1*, *Gja1*). Использование ИПК упрощает и ускоряет оценку функциональных свойств искусственных спонтанно-активных кардиомиоцитарных клеточных конструкций.

Ключевые слова: ритмоводитель сердца, искусственный биологический пейсмекер, транскрипционный профиль, клеточные конструкции, неонатальные кардиомиоциты, первичная культура кардиомиоцитов

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-1

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются лидирующей причиной смертности в мире и России. Нарушения ритма сердца — аритмии — обуславливают летальность ССЗ. Распространенными формами аритмий являются заболевания, при которых естественный, доминантный, ритмоводитель (пейсмекер) сердца — синоатриальный узел (САУ), или атрио-вентрикулярный узел — теряет способность генерировать нормальный ритм работы сердца и передавать возбуждение в рабочий

миокард, что приводит к дефициту кровоснабжения тканей организма [1, 2]. В настоящее время методы лечения дисфункции САУ основаны на малоэффективном фармакологическом, или интервенционном, подходе, при котором ритм сердца поддерживается за счет имплантации сложных, дорогостоящих и ненадежных кардиостимуляторов. В связи с вышесказанным значительные усилия направлены на создание искусственного биологического пейсмекера (ИБП) [3], замещающего САУ [4], однако проблема ИБП сердца до сих пор

не решена. Функционирование САУ как структуры, задающей момент возбуждения рабочего миокарда и ритм сердца, определяется электрофизиологическими характеристиками отдельных пейсмекерных кардиомиоцитов САУ [5, 6], а также электрофизиологическими свойствами САУ как тканевой структуры [7, 8]. Причины текущей неэффективности ИБП связаны с тем, что кардиомиоциты в составе клеточных структур, созданные с помощью профилирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [9, 10], репрограммирования культивируемых кардиомиоцитов [11–13] или цитокиновой направленной дифференцировки неонатальных кардиомиоцитов, хоть и демонстрируют способность к автоматии — т.е. к спонтанному ритмическому возбуждению и сокращению [14] — но значительно отличаются по электрофизиологическим свойствам и характеру межклеточного взаимодействия от кардиомиоцитов нативного синусного узла [15, 16] и являются некомпетентными с точки зрения способности выполнять роль ритмоводителя сердца.

Важной задачей на пути создания компетентного клеточного эквивалента биологического пейсмекера сердца является оценка способности культивируемых кардиомиоцитов в конгломератах, клеточных слоях или псевдоткани к автоматической, спонтанной, активности.

Следует отметить, что, несмотря на значительный объем данных касательно истории исследования САУ [17, 18] и фенотипа кардиомиоцитов САУ [19, 20], перечень и набор ключевых маркерных генов и/или белков [21], которые высокоспецифически характеризовали бы кластеры нативных клеток, генерирующих ритм сердца, остаются размытым и не до конца определенным [22], особенно в случае САУ лабораторных животных.

Полнопрофильный транскриптомный анализ клеточных культуральных образцов является как ресурсо- так и времязатратным подходом при необходимости многократного тестирования [23]. Применение индексов, характеризующих способность к активации и генерации ритма — индексов пейсмекерной компетентности (ИПК) — может являться решением вышеуказанной задачи. ИПК могут быть использованы для выявления изменений в культивируемых пейсмекероподобных структурах, а также для сопоставления свойств таких структур со свойствами нативных зрелых пейсмекеров.

В связи с вышесказанным, в данной работе впервые предложены ИПК, характеризующие способность клеточных структур к автоматии и сходство с пейсмекерными кардиомиоцитами САУ. ИПК получены на основании сопоставления транскрипционного профиля ткани САУ, сократительного миокарда левого предсердия взрослых крыс, неонатальных кардиомиоцитов и культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов крысы.

2. Материалы и методы

2.1. Получение первичной культуры и культивирование кардиомиоцитов

Культура первичных неонатальных кардиомиоцитов (ННКМ) была получена при помощи энзиматической обработки изолированных желудочков сердца новорожденных крыс (Miltényi Biotec, #130-105-420, согласно инструкции производителя; самцы крыс 20–24 ч после рождения, 1-е сут, P0). Использование новорожденных животных позволяет получить первичную культуру с высокой пролиферативной активностью. Для выделения клеток и получения первичных культур разные пометы объединяли так, чтобы суммарное количество животных составляло не менее 25. Полученные кардиомиоциты от отдельных животных объединяли (около 10 млн клеток), смешивали и высевали из расчета 250 тыс. клеток на лунку (36 лунок). Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioWest, Новая Зеландия), 2 мМ глутамина (ПанЭко, Россия), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере с 21% O₂ и 5% CO₂, смена среды — каждые 48 ч. К 7-м сут культивирования происходило формирование кардиомиоцитарных конгломератов и клеточного псевдослоя, которые демонстрировали автоматическую, квазиритмическую, синхронную или несинхронную сократительную активность.

2.2. Транскриптомное секвенирование культивируемых кардиомиоцитов и тканевых образцов нативного САУ

Для профилирования неонатальных культивируемых кардиомиоцитов было выполнено секвенирование транскриптома клеток в момент получения (P0, n = 3, по 2 млн клеток), а также после 7-суточного периода культивирования (P7, n = 3). Для получения одного образца для секвенирования случайным образом объединяли клеточные слои из 12 лунок культуральных планшетов. Для этого клеточные слои лизировали в 1 мл extractRNA (Евроген, Россия) при +4°C и следовали дальнейшему протоколу или хранили при температуре -80°C.

Приготовление библиотек осуществляли набором RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай). Контроль качества библиотек проводили при помощи капиллярного электрофореза (Qsep400, High Sensitivity Cartridge Kit, Bioptic, Тайвань). Концентрацию библиотек измеряли при помощи SpectraQ HS (Raissol, Россия). Секвенирование проводили на приборе SURFSeq 5000 (GeneMind, Китай) с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind, Китай). Оценку качества секвенирования проводили при помощи программного обеспечения (ПО) FastQC.

Прочтения картировали на геном *R. norvegicus* с использованием программного обеспечения (ПО) STAR (версия 2.7.11b, mRatBN7.2) [24]. В качестве эталонного генома и аннотационной информации по генам использовали файлы fasta и gtf mRatBN7.2, полученные из базы данных Ensemble [25]. Секвенирование проводилось с использованием двухстороннего (paired-end) чтения, обеспечивающего среднюю глубину покрытия $42,35 \pm 3,59$ млн прочтений на образец. Количественные значения (TPM, transcripts per million) для каждого гена были определены по результатам выравнивания с помощью ПО featureCounts. Нормализацию данных проводили методом медианы отношений (relative log expression, RLE), при помощи программного пакета DESeq2 [26].

Для оценки степени сходства культивируемых кардиомиоцитов с нативными пейсмерными кардиомиоцитами осуществляли транскриптомное секвенирование ткани нативного САУ ($n = 5$) и рабочего (сократительного) миокарда левого предсердия (ЛП, $n = 5$) самцов взрослых (P60, 250 г) крыс стока Wistar. Секвенирование тканевых образцов осуществляли вышеописанным способом. Эвтаназию и препаровку осуществляли согласно ранее описанному методу [27]. Тканевые образцы САУ (участок ткани «гладкостенной» ткани в межвенной области правого предсердия, окружающий бифуркацию артерии синусного узла, $6,9 \pm 1,1$ мг) и ЛП (трабекуляризованная ткань сегмента ушка левого предсердия, $9,5 \pm 2,1$ мг) помещали в 2 мл RNAlater (Евроген, Россия, 48 ч, $+4^{\circ}\text{C}$), после чего гомогенизировали и осуществляли пробоподготовку по инструкции производителя (GeneMind, Китай).

Исходя из нормализованных значений прочтений (нормализация с помощью RLE и ПО DESeq2) оценивали изменение экспрессии генов ключевых для кардиомиоцитов ионных каналов (*Hcn4* («пейсмерные» каналы, активируемые гиперполяризацией и управляемые [цАМФ]), *Cacna1d* (CaV1.3), *Cacna1g* (CaV3.1)), *Scna5* (NaV1.5), *Kenj2* (Kir2.1), *Kenj12* (Kir2.2), *Cacna1c* (CaV1.2), *Cacna2d2* ($\alpha 2\Delta 2$ -CaV1.2), щелевых контактов *Gjc1* (Cx45), *Gjc3* (Cx29)), *Gja1* (Cx43), *Gja5* (Cx40), транскрипционных факторов (ТФ) — *Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*, *Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*, регуляторных факторов (*Fxyd2* (γ -субъединица NKA), *Nppa* (NPA)), гена тяжелых цепей миозина (*Mylh6*).

Используя значения прочтений для определенного набора генов, экспрессируемых антагонистически (реципрочно) в САУ и предсердном миокарде, рассчитывали индексы, характеризующие свойства миокардиальных структур — ИПК. Из множества комбинаторно полученных индексов отбирали те, которые соответствуют основным условиям: включение в состав индекса не более пары антагонистически экспрессируемых генов; не сложные алгебраические операции; подгонка

целочисленных коэффициентов таким образом, чтобы значение индекса для САУ было равно 1.

Сконструировано четыре типа индексов: (1) учитывающие экспрессию ТФ ключевых для эмбриогенеза САУ; (2) учитывающие экспрессию ТФ, контролирующих гены ионных каналов и коннексинов; (3) учитывающие экспрессию генов, определяющих электрофизиологический фенотип ткани; (4) учитывающие гены, не влияющие напрямую на электрофизиологические свойства, но характеризующие тип миокардиальной ткани. В индексы включали пары или наборы генов, для которых ранее установлена и подтверждена «антагонистическая» или реципрочная экспрессия в двух типах миокардиальной ткани: САУ и рабочем (сократительный) миокарде (примером такой пары являются ТФ *Shox2* и *Pitx1*).

2.3. Статистическая обработка

Анализ дифференциальной экспрессии был проведен с помощью ПО DESeq2 [28]. В анализ дифференциальной экспрессии генов вошли 7068 белок-кодирующих генов с выраженной экспрессией. Средний уровень экспрессии аннотированных генов составлял 5220 TPM (transcripts per million). Поправку на множественность сравнений при выявлении дифференциально экспрессируемых генов проводили методом Бенджамини-Хохберга. При статистической значимости различий $\text{padj} < 0,01$ и разнице в уровне экспрессии более четырех раз (логарифм кратности различий — $\log_2(\text{fold change} > 2)$) гены считали дифференциально экспрессируемыми (дифференциальные гены) в САУ и ЛП.

Для выявления биологических путей и процессов, в которых обнаруживается наибольшее количество дифференциальных генов, проводили анализ обогащения связанных групп генов — т.н. «генных онтологий» (GO, gene ontology). Для анализа обогащения GO использовали функции ПО EnrichGO пакета clusterProfiler [29]. В качестве референтного набора использовали экспрессируемые в образцах гены после удаления низкоэкспрессируемых генов. Группу генов или генную онтологию считали статистически значимо измененной (обогащенной) при $\text{padj} < 0,01$ (с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга).

Непараметрический критерий Мана-Уитни ($p(U) < 0,05$) использовали для выявления различий значения ИПК для САУ и ЛП.

3. Результаты

3.1. Особенности транскрипционного профиля САУ крыс

В зрелом САУ крысы обнаруживается экспрессия ключевых ТФ, участвующих в дифференцировке и определении фенотипа кардиомиоцитов. Экспрессия эмбрионального ТФ *Isl1* составляет лишь

1,48 ± 0,91 TPM (единицы нормализации DESeq2 – 136 ± 11), тогда как для САУ взрослых крыс характерен крайне высокий уровень ключевого «пейсмекерного» ТФ Shox2, в то время как экспрессия ТФ рабочего миокарда Pitx2 в САУ существенно ниже, чем Shox2. Уровень репрессоров транскрипции в САУ, способствующих поддержанию пейсмекерного фенотипа в кардиомиоцитах – TBX3 и TBX18 – является значимым. Важно, что экспрессия в САУ всех «рабочих» ТФ (Tbx5, Tbx20, Nkx2.5, GATA4) также значимо выше фонового уровня, но существенно ниже, чем в ЛП (табл. 1).

В САУ крысы высока экспрессия генов ионных каналов, необходимых для формирования пейсмекерных ионных токов в кардиомиоцитах и функционирования ритмоводителя – *Hcn4*, *Cacna1g* и *Cacna1d*. Также высок уровень экспрес-

сии генов щелевых контактов низкой проводимости *Gjc1* (Cx45) и *Gjc3* (Cx29).

На удивление, в САУ обнаруживается высокий, хотя и меньший, чем в ЛП, уровень мРНК транскриптов «рабочих» щелевых контактов *Gja1* (Cx43), а также высокий, сопоставимый со значениями в ЛП, уровень мРНК транскриптов генов натриевых (*Scna5*, NaV1.5), калиевых *Kcnj2*, *Kcnj12* (Kir2.1/2.2) и кальциевых (*Cacna1c*, CaV1.2) ионных каналов сократительных («непейсмекерных») кардиомиоцитов.

Важно, что в ткани САУ крысы крайне высоко количество мРНК транскриптов гена (*Nppa*) предсердного натрийуретического пептида (ANP, atrial natriuretic peptide): уровень *Nppa* в ЛП является наибольшим для всех выбранных генов (табл. 1).

Таблица 1

Нормализованное количество прочтений фрагментов мРНК ключевых генов, определяющих фенотип кардиомиоцитов в САУ и ЛП, а также в неонатальных кардиомиоцитах (P0) и в культивируемых в течение 7 сут кардиомиоцитах (P7)

	Ген	САУ (P60), n = 5	ЛП (P60), n = 5	неонат. кмц. (P0)	культ. кмц. (P7)
1	<i>Gjc1*</i>	2703 ± 189	2542 ± 229	4097 ± 328	2305 ± 184
	<i>Gja1</i>	62287 ± 4983	125822 ± 8808	27916 ± 2512	21531 ± 1722
	<i>Gja5</i>	3098 ± 248	428 ± 30	3442 ± 275	32619 ± 2610
	<i>Gjc3*</i>	215 ± 17	61 ± 4	17 ± 1	11 ± 1
2	<i>Tbx3*</i>	2719 ± 190	213 ± 15	664 ± 60	136 ± 10
	<i>Tbx18*</i>	4262 ± 384	2975 ± 208	6165 ± 493	2596 ± 182
	<i>Nkx2-5</i>	400 ± 36	462 ± 37	926 ± 74	517 ± 41
	<i>Gata4</i>	11639 ± 815	12625 ± 1010	12835 ± 1027	8458 ± 677
	<i>Tbx5</i>	14256 ± 1141	21002 ± 1680	438 ± 31	306 ± 28
	<i>Tbx20</i>	166 ± 12	386 ± 31	12191 ± 853	4141 ± 290
	<i>Isl1*</i>	136 ± 11	0	16 ± 1	26 ± 2
	<i>Pitx2</i>	652 ± 52	2230 ± 178	129 ± 12	118 ± 9
	<i>Shox2*</i>	19256 ± 1348	211 ± 15	100 ± 8	231 ± 18
3	<i>Hcn4*</i>	12735 ± 1146	1842 ± 166	222 ± 20	86 ± 7
	<i>Scn5a</i>	37258 ± 2608	20193 ± 1615	4903 ± 343	1566 ± 110
	<i>Kcnj2</i>	2514 ± 201	3499 ± 245	3562 ± 249	1709 ± 120
	<i>Kcnj12</i>	6400 ± 576	7407 ± 667	470 ± 38	158 ± 14
	<i>Cacna1g*</i>	20532 ± 1437	19080 ± 1336	4282 ± 300	2418 ± 169
	<i>Cacna2d2</i>	14784 ± 1331	10498 ± 945	2388 ± 215	1274 ± 102
	<i>Cacna1d*</i>	2245 ± 180	1467 ± 117	159 ± 11	341 ± 24
	<i>Cacna1c</i>	4822 ± 434	4998 ± 350	2145 ± 193	1627 ± 146
4	<i>Nppa</i>	959723 ± 76778	2645636 ± 211651	26562 ± 2391	78428 ± 6274
	<i>Fxyd2</i>	1616 ± 129	802 ± 72	105 ± 8	7475 ± 598
	<i>Myh6</i>	1443580 ± 129922	1804878 ± 162439	83357 ± 5835	90854 ± 8177
	<i>Rplp0</i>	5000 ± 450	0	93064 ± 6514	150768 ± 12061

Примечание: 1 – щелевые контакты; 2 – транскрипционные факторы, 3 – ионные каналы, 4 – регуляторные факторы. * – ключевые гены кардиомиоцитов с пейсмекерным электрофизиологическим фенотипом. Неонат.кмц. – неонатальные кардиомиоциты; культ.кмц. – культивируемые кардиомиоциты и формируемые ими клеточные структуры

3.2. Особенности транскрипционного профиля и функциональные свойства неонатальных кардиомиоцитов крысы

Ключевые ТФ (*Isl1*, *Shox2*), определяющие дифференцировку клеток по пейсмерному типу в неонатальных кардиомиоцитах, обнаруживаются на фоновом уровне. Тем не менее, количество мРНК транскриптов гена ТФ – *TBX3*, значимо выше фоновой, а экспрессия другого ТФ, критически значимого для реализации пейсмерной программы – *TBX18* – сравнима с таковой в нативном САУ. Экспрессия в неонатальных кардиомиоцитах «рабочих» ТФ (*Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*) значимо выше фонового уровня: для *Nkx2.5* и *GATA4* уровень экспрессии сопоставим с таковым в зрелом миокарде, а для *TBX20* значения существенно выше, чем в тканевых образцах САУ и ЛВ взрослых крыс.

Для неонатальных кардиомиоцитов крысы характерно значительное количество мРНК транскриптов генов пейсмерных щелевых контактов и ионных каналов – *Gjc1* (*Cx45*), *Cacna1g* (*CaV3.1*). Тем не менее, для неонатальных кардиомиоцитов характерна крайне низкая экспрессия гена *Hcn4*.

Неонатальные кардиомиоциты демонстрируют значительный уровень экспрессии гена высокопроводящих «рабочих» щелевых контактов *Gja1*, заметный уровень экспрессии генов *Snc5a* и *Cacna1c*, характерных для сократительных кардиомиоцитов, а также сопоставимый с уровнем экспрессии *Kcnj2* (*Kir2.1*) в зрелых тканях.

Для неонатальных кардиомиоцитов характерна высокая экспрессия *Nppa*. Следует отметить, что этот уровень почти на два порядка ниже, чем в ЛП, и более чем на порядок ниже, чем в САУ (табл. 1).

3.3. Изменение профиля экспрессии генов при культивировании кардиомиоцитов крысы

При культивировании (P0 → P7) ННKM происходит существенное изменение транскрипционного профиля, сопровождаемое как значимым повышением (270 генов), так и понижением (196 генов) экспрессии (рис. 1А). Дифференциальные гены относятся к множеству групп. Сопоставление транскриптома в группах P0 и P7 позволило обнаружить ГО, что указывает на упорядоченное изменение экспрессии. В частности, анализ функционального обогащения выявил группы, связанные с контро-

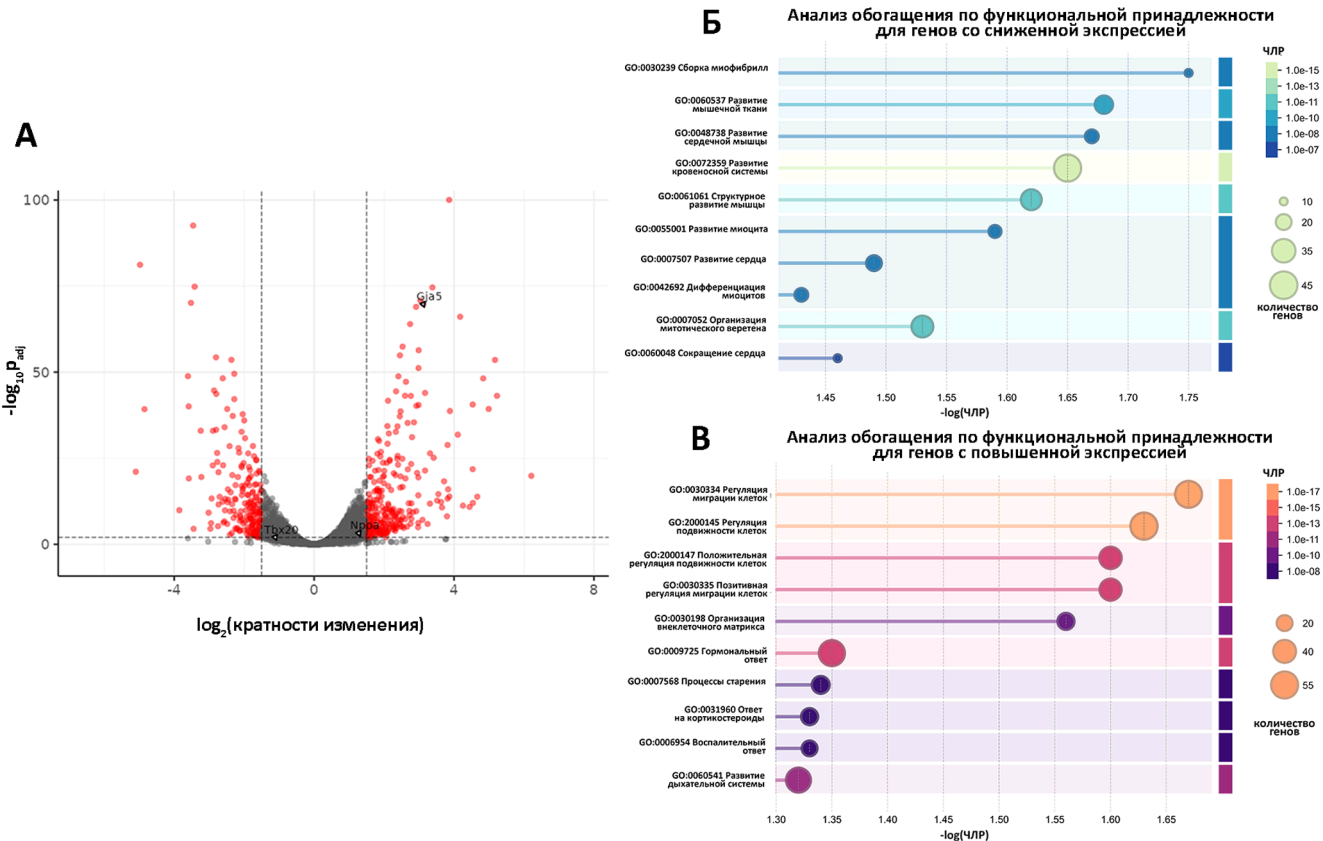


Рис. 1. Изменение профиля экспрессии генов в ходе культивирования митотически активных неонатальных кардиомиоцитов крысы. (А) Диаграмма рассеяния (вулкан-плот), демонстрирующая дифференциально-экспрессируемые гены в неонатальных кардиомиоцитах крысы (P1) и на 7-е сут (P7) культивирования. По оси абсцисс – величина различия (логарифм кратности изменений), по оси ординат – значимость различий (отрицательный логарифм p_{adj}). Красным цветом показаны гены, экспрессия которых значимо изменена ($p_{adj} < 0,01$ или $-\log(p_{adj}) > 2$, а кратность изменения > 2 , P7 vs P1). (Б) Анализ обогащения групп генов со значимо уменьшенной (P7 vs P1) экспрессией, вовлеченных в регуляцию указанных биологических процессов (GO). (В) Анализ обогащения групп генов со значимо увеличенной экспрессией (P7 vs P1), вовлеченных в регуляцию указанных биологических процессов (GO). По оси абсцисс – индекс обогащения, рассчитываемый как $\log_{10}(\text{доля дифференциальных генов группы})$. ЧЛР – частота ложноположительных результатов. Размер маркеров пропорционален количеству генов в аннотированной категории.

лем дифференцировки кардиомиоцитов, индукцией мышечного фенотипа и контролем морфогенеза сердца (рис. 1Б). Среди групп генов, экспрессия которых увеличена, обнаруживаются группы, связанные с подвижностью клеток и продукцией внеклеточного матрикса (рис. 1В).

При рассмотрении отдельных генов, являющихся ключевыми для определения электрофизиологического фенотипа кардиомиоцитов, обнаружили, что недельное культивирование ННКМ сопровождается снижением количества мРНК транскриптов большинства как «пропейсмекерных» (*Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*, *Hcn4*, *Cacna1g* (*CaV3.1*)), *Gjc1* (*Cx45*), *Gjc3* (*Cx29*)), так и «рабочих» генов (*Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*, *Scna5* (*NaV1.5*), *Kcnj2* (*Kir2.1*), *Kcnj12* (*Kir2.2*), *Cacna1c* (*CaV1.2*), *Cacna2d2* ($\alpha 2\Delta 2$ -*CaV1.2*), *Gja1* (*Cx43*)) (рис. 2А–В). Уровень эмбрионального ТФ *Isl1* в ННКМ (P7) близок к фоновому значению, схожему с этим показателем для нативной ткани ЛП.

Особенностью ННКМ является заметное увеличение уровня мРНК транскриптов ТФ *Shox2*, генов ANP (*Nppa*) и *Cx40* (*Gja5*) и регулятора активности Na/K-АТФазы (*Fxyd2*) (табл. 1). В целом, соотношение экспрессии «пропейсмекерных» генов для культивируемых спонтанно активных ННКМ (P7/P0) существенно отличается от такового, наблюдаемого в нативных тканях (САУ/ЛП, рис. 2Г).

3.4. Индексы, характеризующие пейсмекерную компетентность культивируемых миокардиальных структур

Индексы, основанные на экспрессии таких ТФ, как *Isl1*, *Shox2* и *Pitx1*, и их соотношении, позволяют дискриминировать пейсмекерный миокард САУ и рабочий миокард, некоторые – с высокой степенью значимости ($p < 0,001$, табл. 2, строка 1). Однако между значениями для кардиомиоцитов (P0) и культивируемых клеточных структур (P7) не выявлено различий.

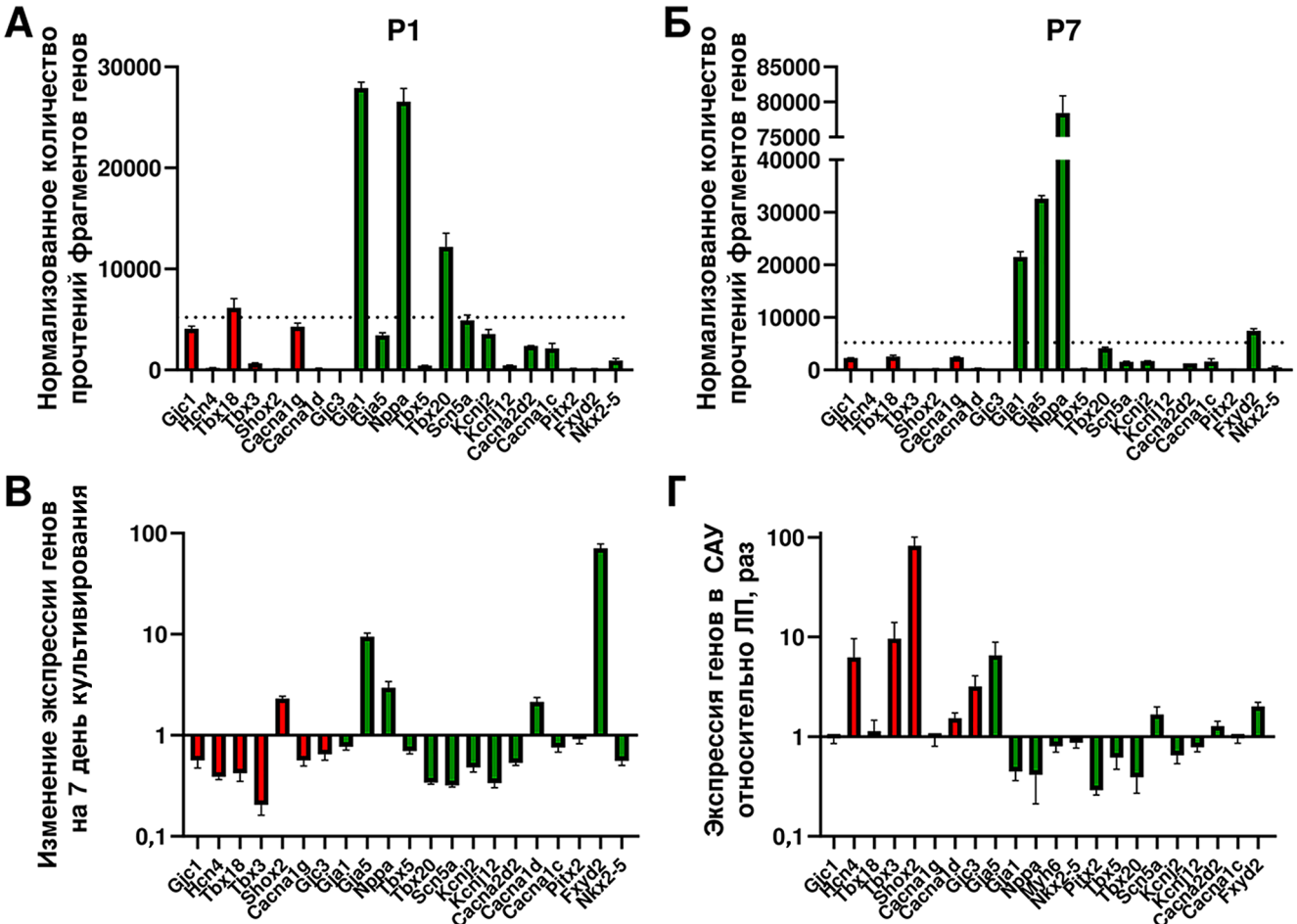


Рис. 2. Экспрессия ключевых генов, определяющих электрофизиологические свойства, пейсмекерных и рабочих кардиомиоцитов в ткани нативного САУ и культивируемых неонатальных кардиомиоцитах. (А, Б) Экспрессия генов ионных каналов (*Hcn4*, *Cacna1d* (*CaV1.3*), *Cacna1g* (*CaV3.1*)), щелевых контактов (*Gjc1* (*Cx45*), *Gjc3* (*Cx29*)), транскрипционных факторов (*Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*), критически важных для реализации автоматической пейсмекерной активности, а также экспрессия ключевых генов «рабочего» (сократительного) фенотипа (*Scna5* (*NaV1.5*), *Kcnj2* (*Kir2.1*), *Kcnj12* (*Kir2.2*), *Cacna1c* (*CaV1.2*), *Cacna2d2* ($\alpha 2\Delta 2$ -*CaV1.2*), *Fxyd2* (γ -субъединица NKA), *Gja1* (*Cx43*), *Gja5* (*Cx40*), *Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nppa* (NPA) в неонатальных кардиомиоцитах крысы (А, P1) и на 7-е сут (Б) культивирования. Пунктиром показан средний уровень экспрессии аннотированных генов, определяемый в образцах. (В) Кратность изменения экспрессии ключевых генов «пейсмекерного», а также «рабочего» фенотипа, обнаруживаемая после недельного культивирования неонатальных кардиомиоцитов. (Г) Соотношение экспрессии генов, определяющих электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов в САУ и рабочем миокарде левого предсердия (ЛП) взрослых крыс.

Среди остальных типов индексов отбирали те, значение которых для САУ стремились к 1, а значение для ЛП < 0,4. Среди всех протестированных индексов для САУ и ЛП отобрано восемь, попадающих в пределы заданных диапазонов и позволяющих значимо дискриминировать САУ и ЛП (p < 0,05).

Среди отобранных дискриминирующих индексов некоторые индексы обладали крайне низкими значениями для неонатальных кардиомиоцитов (P0) или культивируемых ННKM (P7). Таким образом, вышеуказанная группа индексов не позволяет оценить функциональные свойства клеточных структур. Тем не менее, вышеуказанная группа индексов позволяет оценить степень сходства транскрипционного профиля (СТП) (табл. 1, СТП) нативного пейсмекера и клеточных структур, проявляющих способность к автоматии. Другая часть дискриминирующих индексов принимала для групп P0 и P7 значения меньшие, чем для САУ, но существенно большие, чем для рабочего миокарда. Индексы этой группы рассматри-

вались как валидные индексы пейсмекерной компетентности (табл. 2, ИПК №1 – №3), поскольку их значения соотносятся как с транскрипционным профилем, так и с функциональными свойствами нативных и культивируемых структур.

4. Обсуждение

4.1. Особенности транскрипционного профиля ткани нативного зрелого ритмоводителя сердца крысы

Впервые для зрелого нативного САУ крысы определено соотношение экспрессия ключевых генов, участвующих в эмбриогенезе, морфогенезе САУ, дифференцировке кардиомиоцитов по «пейсмекерному» типу и поддерживающих пейсмекерный электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов.

Установлено, что для ткани САУ крысы, помимо экспрессии типичных «пейсмекерных» генов (*Hcn4*, *Cacna1d*, *Cacna1g*, *Gjc1*) характерны такие особенности, как достаточно высокий уровень мРНК транскриптов ТФ *Shox2* и *TBX3*, ассоциируемых с эмбриональными структурами сердца [30];

Таблица 2

Индексы пейсмекерной компетентности (ИПК) и индексы сходства транскрипционного профиля (СТП) для кардиомиоцитов крысы

N	Тип	Индекс	САУ (P60)	ЛП (P60)	Неонат. кмц. (P0)	Культ. кмц. (P7)
1	—	$\frac{Isl1}{Rplp0}$	0,027 ± 0,001	0	0,0002 ± 0,00001	0,0002 ± 0,00001
		$\frac{Shox2}{Pitx2}$	29,5 ± 1,6	0,095 ± 0,006	0,77 ± 0,21	1,95 ± 0,44
2	ИПК1*	$\frac{(3Tbx3 + TBX18)}{(Nkx2.5 + GATA4)}$	1,032 ± 0,081	0,276 ± 0,031	0,592 ± 0,039	0,334 ± 0,029
	СТП1	$\frac{(Tbx3 + TBX18)}{TBX20}$	1,050 ± 0,120	0,276 ± 0,033	0,014 ± 0,006	0,016 ± 0,09
3	ИПК2*	$\frac{(Hcn4 + Gjc1)}{(Kcnj2 + 0,2Gja1)}$	1,031 ± 0,09	0,153 ± 0,09	0,472 ± 0,09	0,397 ± 0,09
	СТП2	$\frac{(Hcn4 + Cacna1d)}{(Kcnj2 + 0,2Gja1)}$	1,001 ± 0,091	0,115 ± 0,018	0,042 ± 0,005	0,071 ± 0,007
		$\frac{(Hcn4 + Cacna2d2)}{10Kcnj2}$	1,094 ± 0,120	0,353 ± 0,044	0,073 ± 0,008	0,079 ± 0,011
4	ИПК3*	$\frac{Hcn4 \times Gjc1}{100\sqrt{Gja1} \times Nppa}$	1,408 ± 0,151	0,081 ± 0,009	0,334 ± 0,029	0,048 ± 0,010
	—	$\frac{Cacna1d \times Gjc1}{25\sqrt{Gja1} \times Nppa}$	0,993 ± 0,098	0,258 ± 0,021	0,956 ± 0,018	0,765 ± 0,088

Примечание: 1–4 – тип индекса. (1) – индексы, учитывающие экспрессию ключевых эмбриональных транскрипционных факторов САУ; (2) – индексы, основанные на ТФ, контролирующих гены ионных каналов и переносчиков; (3) – индексы, учитывающие экспрессию только генов ионных каналов и щелевых контактов; (4) – гибридные индексы, учитывающие экспрессию гена натрий-уретического пептида. СТП1-2 – индексы сходства с транскрипционным профилем САУ, характеризующий «пейсмекероподобность» клеток или структур. САУ – синоатриальный узел, ЛП – левое предсердие, неонат.кмц. – неонатальные кардиомиоциты, культ.кмц. – культивируемые кардиомиоциты и формируемые ими клеточные структуры. * – p(U) < 0,05 (САУ vs ЛП).

высокий уровень генов нетипичных щелевых контактов *Gjc3* (Cx29), генов «рабочих» кальциевых *Cacna1c* (CaV1.2) и других каналов, а также высокий уровень мРНК транскриптов гена ANP (*Nppa*), рассматриваемого как типичный маркер сократительного предсердного миокарда. Наличие мРНК транскриптов вышеперечисленных генов в ткани САУ может быть связано с крайней гетерогенностью клеточной организации пейсмекера и «вкраплением» групп клеток с рабочим фенотипом. Вероятно, такие особенности организации являются необходимыми для реализации пейсмекерной функции САУ и должны быть учтены при моделировании ИБП.

4.2. Особенности транскрипционного профиля неонатальных кардиомиоцитов и его смещение при культивировании клеток

Секвенирование мРНК впервые позволило установить, что для неонатальных кардиомиоцитов характерна экспрессия генов, типичных для «рабочего» миокарда (*Scna5*, *Kcnj2*, *Kcnj12*, *Cacna1c*, *Gja1*). Для ННКМ характерен высокий уровень экспрессии мРНК некоторых ТФ, стимулирующих «рабочий» фенотип и индуцирующих гены сократительного аппарата (*Tbx20*, *GATA4*), что, в целом, характерно для клеток, проходящих физиологическую гипертрофию и развивающихся в кардиомиоциты желудочкового миокарда. Тем не менее, в неонатальных кардиомиоцитах количество мРНК транскриптов типичного «пропейсмекерного» ТФ TBX18 значительно выше среднего уровня экспрессии, что может способствовать активации «пейсмекерных» генов. Действительно, в ННКМ высок уровень *Cacna1g* (CaV3.1) и *Gjc1* (Cx45) — типичных для кардиомиоцитов САУ, демонстрирующих спонтанную автоматическую активность.

Важно, что количество мРНК транскриптов гена *Hcn4*, который рассматривается как основной маркер клеток «истинного» ритмоводителя сердца, в ННКМ крайне низко [31]. Таким образом, ННКМ обладают признаками, характерными для пейсмекерных кардиомиоцитов, демонстрируют «пейсмекерный» потенциал, но существенно отличаются от кардиомиоцитов САУ.

Хорошо известно, что ННКМ после периода адгезии (1–3-е сут культивирования) демонстрируют спонтанную ритмическую активность, проявляющуюся в колебаниях $[Ca^{2+}]_i$ и сокращениях. Учитывая низкий уровень мРНК ТФ (*Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*), а также *Hcn4*, можно предположить, что способность ННКМ к ритмической активности обусловлена, преимущественно, механизмом, связанным с осцилляциями $[Ca^{2+}]_i$ — так называемыми «кальциевыми часами» автоматии [32]. Вероятно, спонтанные колебания $[Ca^{2+}]_i$ обусловлены его поступлением в цитоплазму через Ca-каналы CaV3.1 (*Cacna1g*), экспрессия которых в ННКМ выше, чем *Cacna1d* (CaV1.3).

Формирование кардиомиоцитарных конгломератов и клеточного слоя приводит к существенному изменению транскрипционного профиля неонатальных кардиомиоцитов. При анализе обогащенных функциональных категорий установлено, что при культивировании оказываются изменены гены, связанные с развитием и дифференцировкой ткани миокарда. Подавление экспрессии отдельных генов наблюдается в категориях, ассоциированных с развитием мышечных компонентов миоцитов, что могло бы указывать на сдвиг фенотипа клеток к «пейсмекерному». С другой стороны, культивирование сопровождается снижением уровня мРНК транскриптов «пейсмекерных» генов (за исключением *Shox2*), а также большинства генов, определяющих электрофизиологические свойства. Таким образом, наблюдаемое изменение транскрипционного профиля при культивировании можно рассматривать как признак дедифференцировки клеток либо как смещение от условной антагонистической оси, полюсами которой являются «пейсмекерный» и «рабочий» транскриптом.

Несмотря на снижение уровня экспрессии пейсмекерных генов, ННКМ к P7 сохраняют и демонстрируют устойчивую автоматическую активность. Следует отметить, что при культивировании ННКМ существенно возрастает уровень мРНК транскриптов таких генов, как *Gja5* (Cx40), *Nppa* (ANP) и *Fxyd2*.

ТФ GATA4, NKX2.5 и TBX5 известны как «трансаktиваторы», способствующие усилению экспрессии *Nppa*. Высокий уровень GATA4 в ННКМ на P0/P7 согласуется с достаточно высоким уровнем мРНК транскриптов *Nppa*.

Предсердный натрийуретический пептид хорошо известен как маркер гипертрофии и дифференцировки кардиомиоцитов по «желудочковому» сократительному фенотипу [33, 34]. В таком контексте нарастание уровня мРНК *Nppa* могло бы служить признаком дифференцировки и гипертрофии культивируемых в течение 7 сут клеток [35–38]. Как указано выше, анализ транскриптома не позволяет подтвердить дифференцировку и манифестацию желудочкового фенотипа. Ранее показано, что накопление ANP в культуре или увеличение его продукции нативной тканью связано с гипоксией, закислением среды, повреждением кардиомиоцитов [39]. Таким образом, одним из факторов, обуславливающих увеличение уровня мРНК *Nppa* в ходе культивирования, может являться повышение плотности клеток в среде и снижение доступности кислорода.

Рост экспрессии *Gja5* — гена щелевых контактов, характерных для проводящей системы желудочков [40, 41] — установлен в ходе культивирования кардиомиоцитов впервые в представленной работе. Известно, что дифференцировка Cx40⁺-кардиомиоцитов, являющихся структурными элементами

волокон Пуркинье, происходит под действием эндотелиальных и целого ряда других факторов [42]. Одним из стимуляторов преобразования эмбриональных кардиомиоцитов в клетки волокон Пуркинье является ANP [43]. Наши данные позволяют предположить, что уровень мРНК транскриптов *Nppa* и *Gja5* при культивировании кардиомиоцитов коррелирует. Вероятно, повышение количества мРНК транскриптов *Gja5*, сопровождающееся снижением экспрессии *Gja1* (Cx43) в ходе культивирования, является результатом продукции и накопления значительного количества ANP. Экспрессия *Gja5* может приводить к повышению количества функционального белка щелевых контактов Cx40 в мембране культивируемых клеток. Полученные данные о повышении экспрессии мРНК *Nppa/Gja5* позволяют сформулировать гипотезу, согласно которой культивирование неонатальных кардиомиоцитов может сопровождаться манифестацией фенотипа, характерного для волокон Пуркинье.

4.3. Индексы пейсмекерной компетентности

Поскольку способность к автоматической активности и электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов определяются набором экспрессируемых в них транскрипционных факторов, то логичным начальным подходом для конструирования ИПК могло бы быть использование уровня мРНК ТФ. Одним из основных ТФ, управляющих эмбриогенезом САУ, является *Isl1* [14, 44]. Значительная часть предшественников кардиомиоцитов САУ происходит из пула мезодермальных клеток $Isl1^{+}/Nkx2.5^{-}$. Тем не менее, уровень мРНК транскриптов *Isl1* в изолированных неонатальных и культивируемых кардиомиоцитах, а также в рабочем миокарде сравним с фоновым, что не позволяет использовать этот ТФ в качестве ИПК.

Известно, что *Shox2* и *Pitx2* являются ключевой антагонистической парой ТФ, определяющих тип развивающегося миокарда, экспрессию других ТФ и электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов [14]. Действительно, экспрессия *Shox2* в нативном САУ в 90 раз выше экспрессии *Shox2* в ЛП. Для *Pitx2* наблюдается обратное: его уровень в ЛП существенно выше фонового, а также в 3 раза выше, чем в САУ. Соотношение *Shox2/Pitx2* могло бы быть идеальным ИПК, поскольку для нативных САУ и ЛП различается более, чем в 300 раз. Однако количество прочтений как *Shox2*, так и *Pitx2* в культивируемых кардиомиоцитах является крайне низким и сходным, что делает соотношение *Shox2/Pitx2* ненадежным ИПК при оценке модельных клеточных структур.

Shox2 контролирует активность таких «пропейсмекерных» ТФ как *Tbx3* и *Tbx18* [45], служит репрессором для «рабочих» ТФ *Nkx2.5/GATA4/Tbx5* и *Tbx20* (трансактиватором для которых яв-

ляется *Pitx2*) [46, 47]. Комбинирование пар антагонистических ТФ позволяет получить индексы, адекватно отражающие свойства САУ, предсердного миокарда, культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов. Как указано выше, автоматия любых кардиомиоцитоподобных клеток невозможна без такого смещения профиля ТФ, при котором возникает преобладание «пропейсмекерных» и подавление экспрессии «рабочих» ТФ. В данном контексте разработанные индексы, учитывающие соотношение уровня мРНК ТФ (ИПК1, СТП1, табл. 2), могут использоваться для оценки пейсмекерной компетентности разного рода клеток, индуцированных из плюрипотентных стволовых, мезенхимальных, эмбриональных и прочих клеток.

Количество «фенотипических» ИПК, учитывающих экспрессию генов, кодирующих ионные каналы, щелевые контакты и другие структуры, напрямую определяющие электрофизиологические свойства ткани, может быть гораздо большим, чем количество ИПК вышеуказанных двух типов. Тем не менее, нам удалось сконструировать только три индекса, позволяющих удовлетворительно ранжировать САУ, ЛП, НК (табл. 2, СТП2, ИПК2). Вероятно, причиной сложности создания индексов данного типа является некогерентное смещение экспрессии генов внутри группы, ответственной за «пейсмекерный» или «рабочий» фенотип, как показано в наших экспериментах с культивированием ННКМ.

Наконец, нами показано, что приемлемыми могут являться гибридные индексы, включающие гены, напрямую не касающиеся электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов. Щелевые контакты необходимы для синхронизации активности клеток и передачи волны возбуждения к сократительным кардиомиоцитам, т.е. являются ключевыми молекулами, обуславливающими функцию ритмоводителя как тканевой структуры. Вероятно, культивирование искусственных тканеподобных кардиомиоцит-содержащих структур всегда сопровождается экспрессией *Nppa*, которая, к тому же, регулирует экспрессию генов щелевых контактов. Таким образом, наиболее удачными в этой категории оказались индексы, учитывающие экспрессию генов «антагонистических» щелевых контактов (*Cx43/Cx45*) и *Nppa* (табл. 2, ИПК3).

5. Ограничения расчета и применимости ИПК

«Конструирование» ИПК, очевидно, имеет ограничения и требует учета нескольких факторов. Во-первых, уровень детектирования факторов (экспрессируемых генов), включаемых в ИПК, должен быть существенно выше фонового уровня. Оценка абсолютного значения экспрессии гена (количество прочтений) зависит от качества образцов, сохранности и качества мРНК, метода анализа и пр. Поэтому для норми-

ровки в ИПК должны быть включены гены, которые экспрессируются реципрокно или антагонистически в пейсмекерном и непейсмекерном миокарде. Использование для ИПК «антагонистических» генов позволяет соблюсти принцип дифференциальности, применимый для анализа данных РНК-секвенирования и полимеразной цепной реакции.

Как установлено в наших экспериментах, в клеточных моделях может наблюдаться сильное подавление одного из ключевых «пейсмекерных» генов (например, *Isl1* или *Hcn4*), а также усиление экспрессии других генов (*Tbx18*) с сохранением способности к автоматии. Вероятно, несмотря на необходимость максимального упрощения, ИПК должен включать более двух параметров. Значения ИПК должны различаться в несколько раз (> 3) при его расчете для нативного САУ и рабочего сократительного миокарда. Так как культивируемые, модельные, структуры могут отличаться по транскрипционному профилю и свойствам от нативной ткани САУ и рабочего сократительного миокарда, только значительный диапазон различий позволит их дифференцировать и классифицировать. Очевидно, что в предполагаемом индексе должны быть учтены особенности экспрессии генов, являющихся ключевыми для пейсмекерных кардиомиоцитов САУ и значимыми для реализации пейсмекерной функции. То есть включение в ИПК того или иного фактора (гена ТФ или ионного канала) должно быть функционально обосновано.

6. Заключение

В работе выявлены особенности транскрипционного профиля ткани ритмоводителя взрослых крыс. Ткань САУ, неонатальные и культивируемые кардиомиоциты значительно различаются по соотношению экспрессии генов, участвующих

в морфогенезе, дифференцировке и контроле электрофизиологических свойств. Неонатальные кардиомиоциты, экспрессируя такие гены, как *Shox2*, *Tbx18* и *Gjc1*, демонстрируют «пейсмекерный потенциал». Культивирование неонатальных кардиомиоцитов, сопровождаемое формированием ими тканеподобных структур, приводит к существенному смещению транскрипционного профиля. Это смещение затрагивает группы генов, участвующих в гипертрофии клеток, контроле сократимости, способствует появлению признаков, характерных для кардиомиоцитов проводящей системы желудочков.

На основе сопоставления экспрессии группы генов в культивируемых кардиомиоцитах, предсердной ткани и ткани САУ впервые предложены индексы «пейсмекерной компетентности», позволяющие оценить сходство нативной ткани САУ и псевдоткани, а также ее способность функционировать как искусственный биологический пейсмекер.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-75-00023). В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (соглашение №355 от 15.03.2024 г.). Все процедуры осуществляли в соответствии с нормами биоэтики (решение комиссии по биоэтике Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова, председатель комиссии по биоэтике докт. мед. наук Т.И. Арефьева, регистрационный номер «ЛЭС/18.10.24» от 18.10.24 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Csepe T.A., Kalyanasundaram A., Hansen B.J., Zhao J., Fedorov V.V. Fibrosis: a structural modulator of sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front. Physiol.* 2015;6:37.
2. Dobrzynski H., Boyett M.R., Anderson R.H. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation.* 2007;115(14):1921–1932.
3. Cingolani E., Goldhaber J.I., Marbán E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018;15(3):139–150.
4. Naumova N., Iop L. Bioengineering the cardiac conduction system: advances in cellular, gene, and tissue engineering for heart rhythm regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;(9):673477.
5. Воронина Я.А., Кархов А.М., Кузьмин, В.С. Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология.* 2024;79(2S):22–36.
6. Park D.S., Fishman G.I. The cardiac conduction system. *Circulation.* 2011;123(8):904–915.
7. Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 2000;47(4):658–687.
8. Dobrzynski H., Li J., Tellez J., Greener I.D., Nikolski V.P., Wright S.E., Parson S.H., Jones S.A., Lancaster M.K., Yamamoto M., Honjo H., Takagishi Y., Kodama I., Efimov I.R., Billeter R., Boyett M.R. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation.* 2005;111(7):846–854.
9. Schweizer P.A., Darche F.F., Ullrich N.D., Geschwill P., Greber B., Rivinius R., Seyler C., Müller-Decker K., Draguhn A., Utikal J., Koenen M., Katus H.A., Thomas D. Subtypespecific differentiation of cardiac pacemaker cell clusters

- ters from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2017;8(1):229.
10. Protze S.I., Liu J., Nussinovitch U., Ohana L., Backx P.H., Gepstein L., Keller G.M. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(1):56–68.
 11. Zhao H., Wang F., Zhang W., Yang M., Tang Y., Wang X., Zhao Q., Huang C. Overexpression of TBX3 in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) increases their differentiation into cardiac pacemaker-like cells. *Biomed. Pharmacother.* 2020;130:110612.
 12. Gorabi A.M., Hajighasemi S., Khor V., Soleimani M., Rajaei M., Rabbani S., Atashi A., Ghiaseddin A., Saeid A.K., Ahmadi Tafti H., Sahebkar A. Functional biological pacemaker generation by T-Box18 protein expression via stem cell and viral delivery approaches in a murine model of complete heart block. *Pharmacol. Res.* 2019;141:443–450.
 13. Bakker M.L., Boink G.J.J., Boukens B.J., Verkerk A.O., van den Boogaard M., den Haan A.D., Hoogaars W.M., Buermans H.P., de Bakker J.M., Seppen J., Tan H.L., Moorman A.F., 't Hoen P.A., Christoffels V.M. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovasc. Res.* 2012;94(3):439–449.
 14. Кузьмин В.С., Каменский А.А. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология.* 2021;76(4):183–201.
 15. Muñoz V., Campbell K., Shibayama J. Fibroblasts: modulating the rhythm of the heart. *J. Physiol.* 2008;586(10):2423–2424.
 16. Fahrenbach J.P., Mejia-Alvarez R., Banach K. The relevance of non-excitable cells for cardiac pacemaker function. *J. Physiol.* 2007;585(Pt. 2):565–578.
 17. James T.N. Anatomy of the human sinus node. *Anat. Rec.* 1961;141:109–139.
 18. Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., Billeter R., Sharma V., Sigg D.C., Boyett M.R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation.* 2009;119(12):1562–1575.
 19. Dobrzynski H., Anderson R.H., Atkinson A., et al. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and out-flow tract tissues. *Pharmacol. Ther.* 2013;139(2):260–288.
 20. Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., Billeter R., Sharma V., Sigg D.C., Boyett M.R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation.* 2009;119(12):1562–1575.
 21. Aminu A.J., Petkova M., Atkinson A.J., Yanni J., Morris A.D., Simms R.T., Chen W., Yin Z., Kuniewicz M., Holda M.K., Kuzmin V.S., Perde F., Molenaar P., Dobrzynski H. Further insights into the molecular complexity of the human sinus node – The role of ‘novel’ transcription factors and microRNAs. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2021;166:86–104.
 22. Mommersteeg M.T.M., Hoogaars W.M.H., Prall O.W.J., de Gier-de Vries C., Wiese C., Clout D.E., Papaioannou V.E., Brown N.A., Harvey R.P., Moorman A.F., Christoffels V.M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ. Res.* 2007;100(3):354–362.
 23. Goodyer W.R., Beyersdorf B.M., Paik D.T., Tian L., Li G., Buikema J.W., Chirikian O., Choi S., Venkatraman S., Adams E.L., Tessier-Lavigne M., Wu J.C., Wu S.M. Transcriptomic. Transcriptomic profiling of the developing cardiac conduction system at single-cell resolution. *Circ. Res.* 2019;125(4):379–397.
 24. de Jong T.V., Pan Y., Rastas P., et al. A revamped rat reference genome improves the discovery of genetic diversity in laboratory rats. *Cell. Genom.* 2024;4(4):100527.
 25. Ensembl [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.ensembl.org> (дата обращения: 01.02.2025).
 26. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome. Biol.* 2014;15(12):550.
 27. Pustovit O.B., Samoilo D.V., Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S. α 1-adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum. *J. Physiol. Biochem.* 2022;78(4):793–805.
 28. Bioconductor [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> (дата обращения: 01.02.2025).
 29. Bioconductor [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html> (дата обращения: 01.02.2025).
 30. van Eif V.W.W., Devalla H.D., Boink G.J.J., Christoffels V.M. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018;15(10):617–630.
 31. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* 2010;106(3):434–446.
 32. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ. Res.* 2010;106(4):659–673.
 33. Man J., Barnett P., Christoffels V.M. Structure and function of the Nppa-Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2018;75(8):1435–1444.
 34. Samad M., Malempati S., Restini C.B.A. Natriuretic peptides as biomarkers: Narrative review and considerations in cardiovascular and respiratory dysfunctions. *Yale. J. Biol. Med.* 2023;96(1):137–149.
 35. Hotchkiss A., Feridooni T., Baguma-Nibasheka M., McNeil K., Chinni S., Pasumarthi K.B. Atrial natriuretic peptide inhibits cell cycle activity of embryonic cardiac progenitor cells via its NPRA receptor signaling axis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015;308(7):C557–C569.
 36. Eppenberger-Eberhardt M., Messerli M., Eppenberger H.M., Reinecke M. New occurrence of atrial natriuretic factor and storage in secretorily active granules in adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1993;25(7):753–757.
 37. Gassanov N., Er F., Zagidullin N., Hoppe U.C. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J.* 2004;18(14):1710–1712.
 38. Houweling A.C., van Borren M.M., Moorman A.F., Christoffels V.M. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovasc. Res.* 2005;67(4):583–593.

39. Fu S., Ping, P., Wang F., Luo L. Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J. Biol. Eng.* 2018;12(1):2.
40. Kanter H.L., Laing J.G., Beau S.L., Beyer E.C., Saffitz J.E. Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ. Res.* 1993;72(5):1124–1131.
41. Saffitz J.E., Schuessler R.B. Connexin-40, bundle-branch block, and propagation at the Purkinje-myocyte junction. *Circ. Res.* 2000;87(10):835–836.
42. Harris B.S., Spruill L., Edmonson A.M., Rackley M.S., Benson D.W., O'Brien T.X., Gourdie R.G. Differentiation of cardiac Purkinje fibers requires precise spatiotemporal regulation of Nkx2-5 expression. *Dev. Dyn.* 2006;235(1):38–49.
43. Govindapillai A., Hotchkiss A., Baguma-Nibasheka M., Rose R.A., Miquerol L., Smithies O., Maeda N., Pasumarthi K.B.S. Characterizing the role of atrial natriuretic peptide signaling in the development of embryonic ventricular conduction system. *Sci. Rep.* 2018;8(1):6939.
44. Snarr B.S., O'Neal J.L., Chintalapudi M.R., Wirrig E.E., Phelps A.L., Kubalak S.W., Wessels A. Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development. *Circ. Res.* 2007;101(10):971–974.
45. Wiese C., Grieskamp T., Airik R., Mommersteeg M.T., Gardiwal A., de Gier-de Vries C., Schuster-Gossler K., Moorman A.F., Kispert A., Christoffels V.M. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ. Res.* 2009;104(3):388–397.
46. Stefanovic S., Christoffels V.M. GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72(20):3871–3881.
47. Ma Q., Zhou B., Pu W.T. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev. Biol.* 2008;323(1):98–104.

Поступила в редакцию 23.04.2025

После доработки 18.10.2025

Принята в печать 21.11.2025

RESEARCH ARTICLE

Key transcriptomic characteristics of the native rat heart pacemaker, their changes during cultivation of neonatal cardiomyocytes and their use to assess pacemaker competence

O.B. Pustovit^{1,*} , A.M. Karhov^{1,2} , V.S. Kuzmin^{1,2} 

¹Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre of Cardiology, Academician Chazov str. 15a, Moscow, 121552, Russia

*e-mail: k_pustovit@mail.ru

An important task on the way to creating a competent cellular equivalent of a biological heart pacemaker for the treatment of cardiovascular diseases is to assess the ability of cultured cardiomyocytes in conglomerates, layers or pseudo-tissues to automatic, spontaneous activity. It is known that the electrophysiological and tissue properties of cultured cardiomyocyte structures differ significantly from native ones. In this work, based on a comparison of the transcription profile and an assessment of the expression level of key genes in the tissues of the sinoatrial node (SAN), atrium, neonatal cardiomyocytes and cultured cardiomyocyte conglomerates of rats, pacemaker competence indices (PCI) are proposed, characterizing the ability (competence) of cellular structures to function as a pacemaker. Based on the analysis of mRNA sequencing data, it was found that during neonatal cardiomyocytes cultivation, there is a significant change in the expression profile of functionally significant genes, which enhances the difference in the phenotype of emerging cardiomyocyte conglomerates from both the pacemaker of SAN and the contractile myocardium. It has been shown for the first time that satisfactory PCIs can be obtained based on an assessment of the transcript level of no more than four genes, including pairs of transcription factors (*Tbx3*, *Tbx18* and *Nkx2.5*, *Gata4*) or pairs of ion channels (*Hcn4*, *Kcnj2*) and gap junctions (*Gjc1*, *Gja1*) antagonistically expressed in the SAN and contractile myocardium. The PCI simplifies and accelerates the assessment of the functional properties of artificial spontaneously active cardiomyocyte cell structures.

Keywords: heart pacemaker, artificial biological pacemaker, transcription profile, cellular constructs, neonatal cardiomyocytes, primary cardiomyocyte culture

Funding: The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-75-00023). The equipment purchased by Lomonosov Moscow State University as part of the federal project “Development of Infrastructure for scientific research and Training” of the national project “Science and Universities” dated 12/29/2022 No. 15-pr/42 (Agreement No. 355 dated 03/15/2024) was used in the work.

Сведения об авторах

Пустовит Оксана Борисовна — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5137-2187>

Кархов Андрей Михайлович — студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: akarchoff@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0919-0712>

Кузьмин Владислав Стефанович — докт. биол. наук., проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3075-4834>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 633.812+581.84

Особенности структуры стебля *Myrtus communis* и его гистохимический анализ

И.В. Булавин* , Д.И. Калмыкова , В.Д. Конобеев ,
Л.А. Логвиненко , О.М. Шевчук

Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН, Российская академия наук,
Россия, 298648, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, д. 52

*e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Myrtus communis L. (мирт обыкновенный) является одним из важных ароматических и лекарственных растений семейства миртовых (Myrtaceae). В его органах содержатся в достаточном количестве эфирные масла, фенольные кислоты, флавоноиды, танины, антоциановые пигменты и жирные кислоты, что делает растение перспективным объектом для фармацевтической и парфюмерной промышленности. В Российской Федерации *M. communis* введен в культуру как декоративное и эфиромасличное растение на Южном берегу Крыма и на Черноморском побережье Кавказа в XIX в. В условиях Южного берега Крыма у *M. communis* в анатомическом аспекте ранее были исследованы особенности морфологии и структуры листовой пластинки, плодов. Информация о строении стебля остается ограниченной. Поэтому целью данной работы был сравнительный анализ структуры молодых и одревесневших стеблей, а также определение локализации эфирного масла и фенольных соединений в его тканях. Установлено, что молодые и одревесневшие стебли *M. communis* отличаются по цвету и форме, определен потенциал отрастающих осевых органов в накоплении эфирного масла. Впервые показано, что у одревесневших стеблей *M. communis* формируется особый тип феллемы, клетки которой вытянуты в радиальном направлении и имеют тонкие оболочки. Специфика строения перидермы, возможно, обуславливает подмерзание побегов и ограничивает распространение *M. communis* за пределы влажных и сухих субтропиков РФ. Качественные гистохимические исследования выявили во вместилищах молодых и одревесневших стеблей накопление эфирного масла, при этом отмечена суберинизация выстилающих клеток структур внутренней секреции. По мере развития перидермы обнаруживается тенденция к разрушению вместилищ. В тканях стебля обнаруживаются фенольные соединения, часть из которых структурно связана с клеточными стенками, другая — накапливается в протопластах эпидермы, паренхимы, флоэмы, в наибольшем количестве — у молодых (неодревесневших) органов.

Ключевые слова: мирт обыкновенный, осевые органы, анатомия, качественный анализ, эфирное масло, фенолы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-5

Введение

Мировая фармацевтическая, парфюмерная, косметическая и пищевая промышленность испытывает постоянно растущий спрос на натуральные эфирные масла благодаря их составу, который, в отличие от химически синтезированных масел, богат природными ароматическими соединениями, органическими кислотами, фенолами, спиртами, альдегидами и многим другим. Это делает эфирные масла дорогими на мировом рынке и подчеркивает актуальность внедрения и изучения агротехнических приемов выращивания эфиромасличных растений в различных почвенно-климатических зонах [1].

ромасличных растений в различных почвенно-климатических зонах [1].

Myrtus communis L. (мирт обыкновенный) является одним из важных ароматических и лекарственных растений семейства миртовых (Myrtaceae) [2], которое включает примерно 145 родов и более 5500 видов. Этот вечнозеленый склерофитный кустарник или небольшое дерево высотой 1,8–2,4 (3 м) [3] является частью типичной средиземноморской флоры и произрастает в изобилии от северо-западной до восточной части региона, включая соседние страны, а также западную Азию

и Эгейское побережье [4]. Также вид встречается в Южной Европе, Северной Африке, Западной Азии, в Южной Америке, северо-западных Гималаях и Австралии, в северо-западной части Индии [5]. В литературе сообщается, что части растений *Myrtus* sp. содержат в достаточном количестве эфирные масла, фенольные кислоты, флавоноиды, танины, антоциановые пигменты и жирные кислоты [6].

В Российской Федерации *M. communis* введен в культуру как декоративное и эфиромасличное растение еще в 1815 г. на Южном берегу Крыма (ЮБК) в Никитском ботаническом саду и на Черноморском побережье Кавказа с 60-х гг. XIX в. [7].

В условиях ЮБК у *M. communis* исследованы особенности прорастания семян в зависимости от продолжительности хранения [8], морфолого-анатомические характеристики листьев в качестве идентификаторов подлинности перспективного лекарственного растительного сырья [9], анатомия черешков и люминесценция доминирующих биологически активных соединений в их тканях [10], структура плодов [11], накопление эссенциальных элементов (Ca, Mg, K, Fe, Mn, Cu, Zn) в вегетативных (однолетние побеги, листья) и генеративных (плоды) органах растений [12]; эфирное масло и основные его компоненты при порослевой и многолетней культуре возделывания в свежих и воздушно-сухих листьях как источника сырья для фармацевтической и парфюмерно-косметической отрасли [13]; антибактериальная активность водно-спиртовых извлечений из листьев [14].

Информация о структуре стебля остается ограниченной. На сегодня существует малое количество работ, в которых продемонстрировано его строение [15, 16]. Исследование анатомии осевых органов, выявление структур, накапливающих биологически активные вещества, является актуальным с точки зрения фундаментальной науки, а также определения потенциального количества эфирного масла от стеблей и для селекционного отбора на морозостойкость. Поэтому целью данной работы был сравнительный анализ структуры молодых и одревесневших стеблей, а также установление локализации эфирного масла и фенольных соединений в их тканях.

Материалы и методы

Исследования проводили в 2024 г. В качестве объекта выбран мирт обыкновенный (*Myrtus communis* L.), культивируемый на территории Арборетума Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН» (ФГБУН «НБС-ННЦ»), расположенного на высоте 200 м над уровнем моря, в условиях субтропического климата средиземноморского типа. Материал отбирали в период технической зрелости растений (ноябрь).

Значения погодных условий приведены согласно данным ФГБУ «Крымское УГМС» (Агрометеостанция Никитский сад). Температура: средняя — 9,3°C, максимальная — 21,6°C, минимальная — 1,0°C; сумма осадков, мм — 103,3; относительная влажность воздуха, % — 71,3.

Морфологические исследования выполняли на свежем материале. Органы анализировали при помощи стереомикроскопа МСП-1 (Ломо, Россия), оснащенного цифровой камерой E31SPM12000KPA (Korticom, Китай), подключенной к персональному компьютеру с программным обеспечением (ПО) ImageView™ (Carestream, США).

Гистохимический анализ выполняли согласно общепринятым методам на поперечных срезах, изготовленных из свежего материала с использованием замораживающего микротомы МЗ-2 (Точмедприбор, Украина), оснащенного охладителем лабораторным ОЛ-ЗСО 30 (Инмедпром, Россия). Лигнин выявляли 0,5%-ным раствором флороглюцина и концентрированной соляной кислотой. Одревесневшие оболочки окрашивались в красно-малиновый цвет [17]. Локализацию суберина определяли 1%-ным раствором генцианового фиолетового и аммиаком после воздействия на срезы жавелевой водой. Структуры, содержащие суберин, окрашивались в фиолетовый цвет [18]. Выявление эфирного масла осуществляли при помощи обработки срезов спиртовым раствором судана III (1%) [19]. Анализ на качественное присутствие фенольных соединений проводили путем последовательной обработки срезов жавелем, дистиллированной водой, 0,5%-ным раствором толуидинового синего в 2,5%-ном Na₂CO₃ при pH 9 в течение 5 мин, 70%-ным этанолом [20]. Локализацию флавоноидов в тканях определяли посредством применения 1%-го раствора ванилина и концентрированной соляной кислоты. Структуры, содержащие указанные соединения, окрашивались в красный цвет [21].

Анатомические исследования проводили на фиксированном материале. Для этого от побегов отделяли фрагменты стеблей и сразу переносили их в пенициллиновые флаконы с раствором формалина (38%), ледяной уксусной кислоты, спирта этилового (96%) и воды (1:0,5:5:3,5). Дополнительно добавляли несколько капель детергента Твин-20. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах восходящей концентрации. В качестве промежуточной жидкости использовали толуол (Вектон, Россия). Образцы заключали в парафиновую гомогенизированную среду Гистопoint Экстра (МедТехникаПоинт, Россия). Срезы толщиной 12 и 16 мкм изготавливали на полуавтоматическом ротационном микротоме Ротмик 2А (ОрионМедик, Россия), наклеивали на предметные стекла, предварительно обработанные раствором белка куриного яйца, смешанным с глицерином в соотношении 1:1. Стекла со срезами сушили

при помощи нагревательного столика Микростат-30/80 (Техном, Россия). Депарафинирование осуществляли толуолом в стеклянных емкостях Шиффердекера (2 ч). Затем предметные стекла со срезами переносили в 96%-ный спирт (1,5 ч), дистиллированную воду (30 мин), окрашивали водным раствором метиленового синего (0,05%) (30 мин). Для заключения использовали раствор сахарозы (60%) [22].

Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа CX-41 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой SC 50 (Olympus, Германия) и ПО CellSens Imaging Software v. 1.17. Материал после окрашивания на фенольные соединения изучали с помощью зеленого светофильтра.

Статистический анализ данных выполняли в ПО Past v. 3.26 [23]. Для каждого варианта (молодые/одревесневшие стебли, листья) было проанализировано по 10 образцов. Выборки проверяли на нормальность распределения и, в зависимости от полученного результата, использовали либо t-критерий, либо U-тест при $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения.

Результаты и обсуждение

Исследована морфология и анатомия молодых (неодревесневших) и одревесневших стеблей *M. communis*. Молодые стебли были практически голые (наблюдали весьма редкие трихомы), светло-

зеленого цвета с малиновым оттенком, по форме — четырехгранные или округлые с небольшими ребрами. Под покровной тканью были различимы секреторные структуры — вместилища (рис. 1А, Б). Отличием одревесневших стеблей было: светло-коричневый цвет, округлая форма и наличие вместилищ с содержимым янтарного цвета (рис. 1В, Г). Проанализировано количество последних на осевых органах и их поперечных срезах сравнительно с таковым у листовых пластинок. У молодых и одревесневших стеблей первый показатель достигал $9,1 \pm 1,03$ и $6,9 \pm 0,84$ шт./мм² соответственно, листовых пластинок — $10,2 \pm 0,84$ шт./мм². На поперечных срезах количество вместилищ для первых двух вариантов органов составляло $8 \pm 1,56$ и $4,6 \pm 0,6$ шт., для третьего — $19 \pm 1,65$ шт. Установлены статистически значимые различия между количеством вместилищ на поперечных срезах молодых и одревесневших стеблей, а также листьев и молодых побегов, которое было меньше в 1,7 и 2,4 раза соответственно.

Изучено анатомическое строение неодревесневших стеблей *M. communis*. Топографически на поперечных срезах выделяли эпидерму, кору и центральный цилиндр. Эпидерма была представлена плотно сомкнутыми овальными (овально-прямоугольными) клетками, внешние тангентальные стенки которых имели кутикулярный слой. В состав коры входили колленхима, паренхима и слабовыраженная эндодерма. В наружных слоях

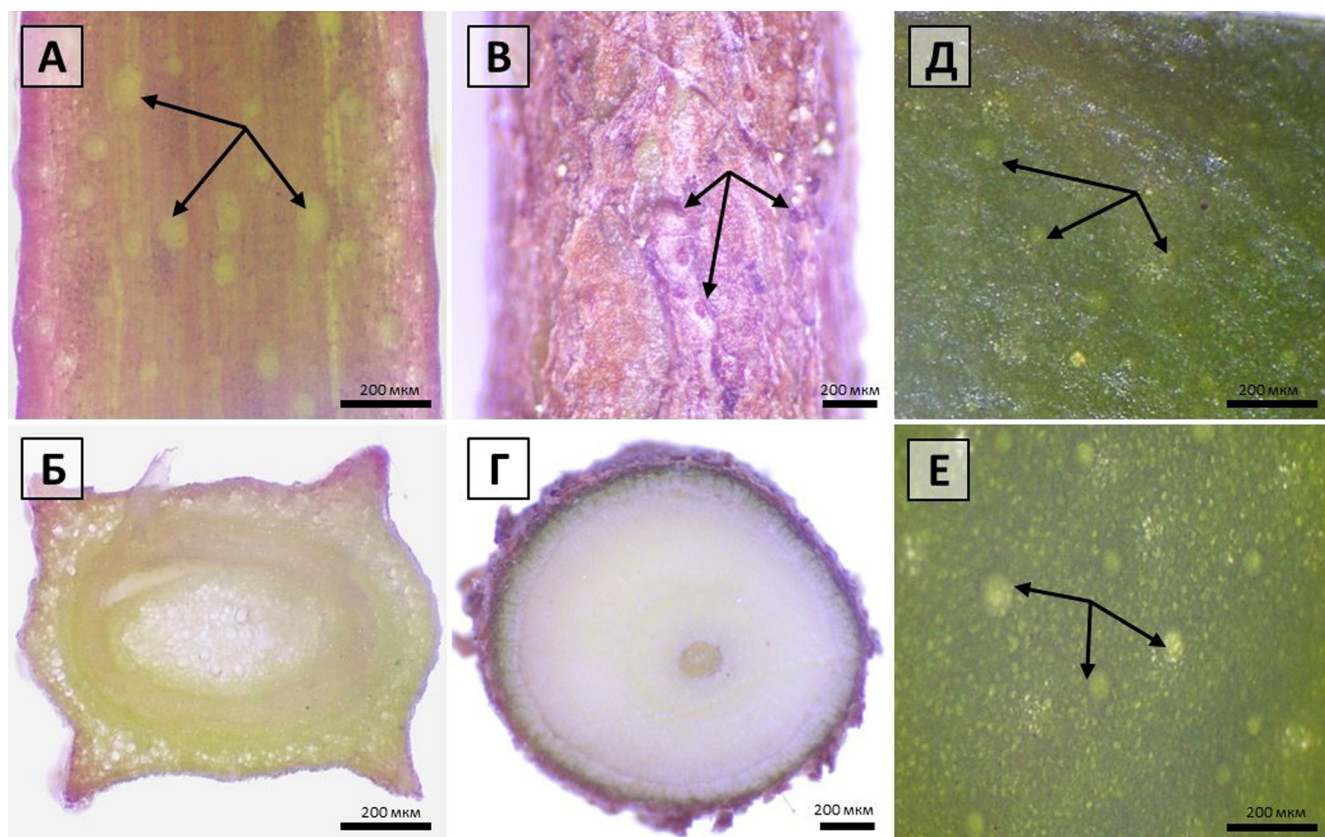


Рис. 1. Морфология молодых (А–Б) и одревесневших (В–Г) стеблей и листьев (Д–Е) *Myrtus communis*. Стрелочками показаны вместилища с эфирным маслом.

кору формировались вместилища. В центральном цилиндре располагались тяжи склеренхимы перидиклического происхождения (могли отсутствовать), непучковая биколлатеральная проводящая система, паренхима сердцевины (рис. 2А).

В древесном стебле *M. communis* толщиной до 0,5 см (рис. 2Б), выделяли кору, камбий, древеси-

ну и сердцевину. В состав коры входили эпидерма, остатки первичной коры, ткани которой сминались. Под эпидермой дифференцировали либо целые вместилища или их части. Глубже в тканях были четко заметны волокна склеренхимы перичиклического происхождения. Отмечено наличие клеток, вытянутых в радиальном направлении.

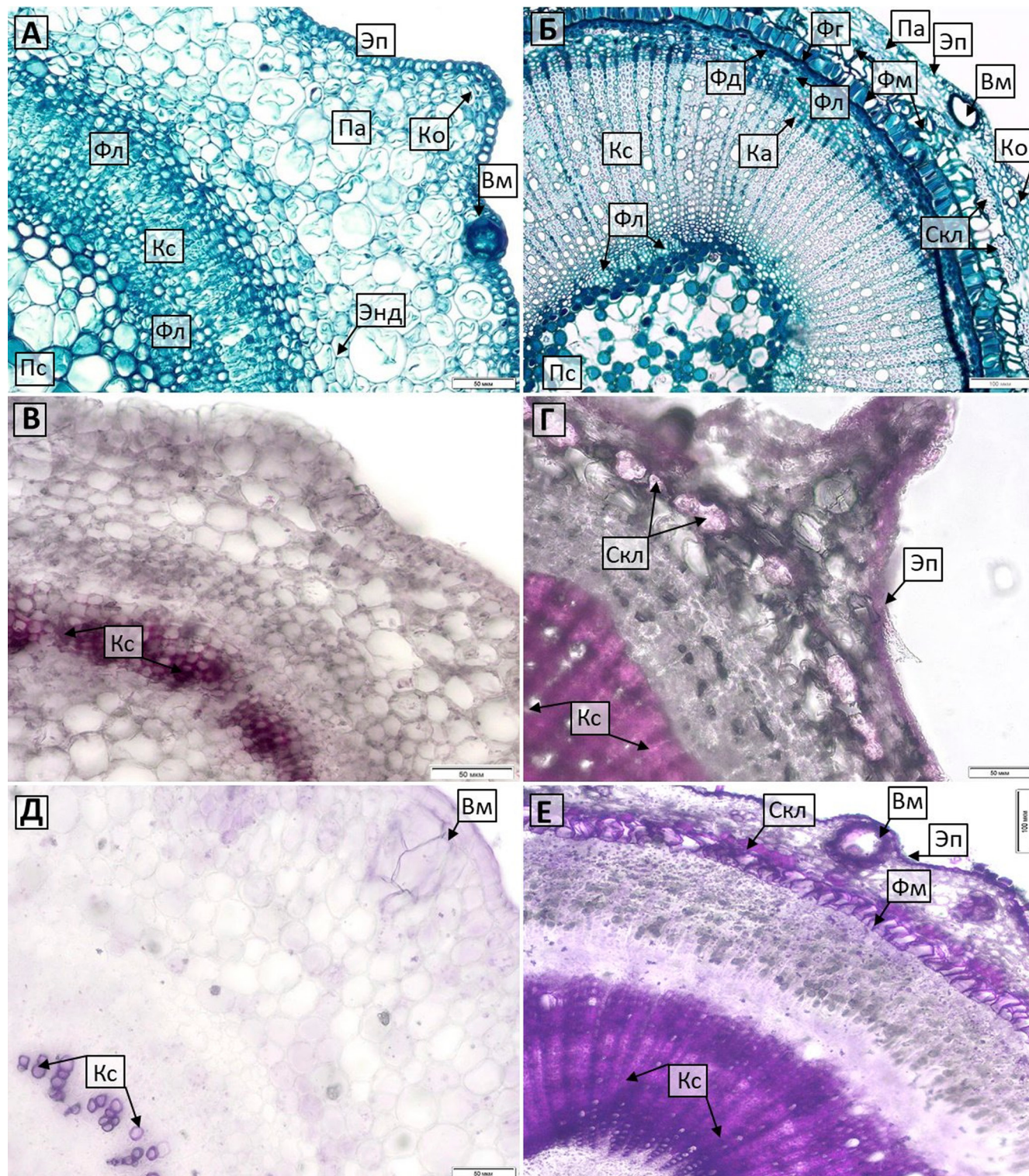


Рис. 2. Поперечные срезы молодых (А, В, Д) и одревесневших (Б, Г, Е) стеблей *Myrtus communis*; А, Б – окрашивание метиленовым синим; В, Г – качественная гистохимическая реакция на лигнин; Д, Е – качественная гистохимическая реакция на суберин. Вм – вместилище, Ка – камбий, Ко – колленхима, Кс – ксилема, Па – паренхима, Пс – паренхима сердцевины, Скл – склеренхима, Фг – феллоген, Фд – феллодерма, Фл – флоэма, Фм – феллема, Энд – эндодерма, Эп – эпидерма (световая микроскопия).

Качественный гистохимический анализ на лигнин (рис. 2Г) и суберин (рис. 2Е) выявил в указанных клетках наличие последнего и подтвердил наше предположение о том, что это феллема. Далее располагались феллоген, феллодерма и вторичная кора, представленная флоэмой (первичной, вторичной), за которой находилась камбиальная зона и древесина, составленная вторичными и первичными элементами. В самом центре стели наблюдали паренхиму.

Исследовано накопление эфирного масла (ЭМ) и фенольных соединений в тканях стеблей и листовых пластинок *M. communis*. Согласно полученным результатам, ЭМ наблюдали во местилищах, расположенных в паренхиме анализируемых вегетативных органов (рис. 3Г). Также отмечено окрашивание выстилающих клеток местилищ при использовании спиртового раствора судана III (рис. 3А, Б) и генцианового фиолетового при реакции на суберин (рис. 2Д, Е).

Анализ локализации фенольных соединений показал, что в стеблях изменение цвета происходило в эпидерме, выстилающих клетках местилищ, склеренхиме, феллеме и ксилеме (рис. 3Д, Е). В листе в области центральной жилки окрашивание приобретали эпидерма (внешняя тангентальная часть), ксилема, склеренхима, выстилающие клетки местилищ (рис. 3Ж). В боковой части листовой пластинки (рис. 3З) зеленое

окрашивание наблюдали в эпидермальных клетках, выстилающих клетки местилищ, ксилеме боковых жилок.

Качественные гистохимические реакции на флавоноиды показали их присутствие в эпидерме, клетках первичной коры, выстилающих клетках местилищ, флоэме, паренхиме сердцевинки молодых стеблей (рис. 3И). У одревесневших органов красный оттенок наблюдали в эпидерме и выстилающих клетках местилищ. Наиболее слабое окрашивание выявлено во флоэме и паренхиме сердцевинки (рис. 3К). В листьях интенсивный красный цвет появлялся в эпидерме, флоэме, выстилающих клетках местилищ, слабый — колленхиме центральной жилки, палисаде, некоторых клетках губчатого мезофилла (рис. 3Л, М).

В литературе имеются сведения о морфологии листовой пластинки *M. communis*. При описании ее поверхности отмечается наличие ароматических железок, плотность которых на дорсальной стороне больше и составляет $966,63 \pm 15,212$ шт./см², на вентральной — $736,97 \pm 16,563$ шт./см² [24], а частота встречаемости находится в диапазоне 0–14 шт./мм² [9]. Нами впервые проведено сравнительное исследование количества местилищ на поверхности молодых и одревесневших стеблей и листьев. Показан наибольший потенциал по накоплению ЭМ для листьев и молодых (зеленых) стеблей, что согласуется с данными литературы.

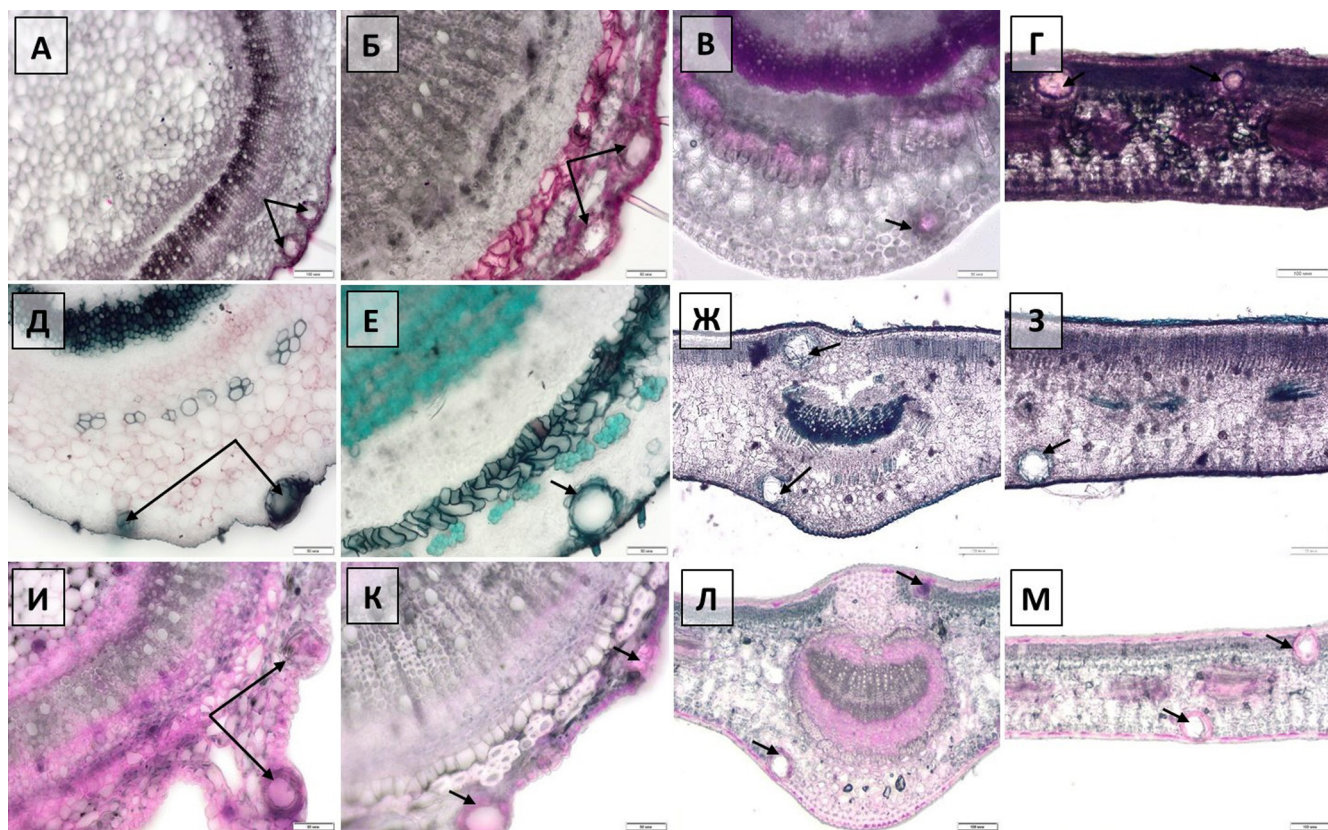


Рис. 3. Поперечные срезы молодых (А, Д, И), одревесневших стеблей (Б, Е, К), а также листьев (В, Г, Ж, З, Л, М) после проведения качественных гистохимических реакций. А–Г — выявление эфирного масла; Д–З — выявление фенолов; И–М — выявление флавоноидов (световая микроскопия). Стрелочками указаны местилища.

В работе Л.А. Логвиненко показано, что при извлечении ЭМ из одревесневших побегов его содержание было весьма незначительным и определены следовые количества [13].

По данным М.А. Аль-Хадиси [15] стебель *M. communis* покрыт однорядной эпидермой с кутикулой, затем располагается многослойная кора, состоящая из колленхимы и паренхимы, хлоренхима отсутствует. Сосудистые пучки биколлатеральные, формируют кольцо. Сердцевина представлена паренхимными клетками. В работе Ю.С. Черятовой указано, что стебель *M. communis* характеризуется непучковым типом строения. В паренхиме коры стебля обнаружены выделительные структуры, представленные сферическими схизолизигенными эфиромасличными вместилищами, полость которых была выстлана эпителиальными клетками и одиночными эфиромасличными клетками [16]. Нами на поперечных срезах отмечены несколько слоев клеток, вытянутых в радиальном направлении. Гистохимические исследования показали накопление в них суберина, что подтвердило их принадлежность к феллеме. Они не опробковывают полностью и формируют одну из феллем, сходную с таковой у *Rhododendron maximum* L. [25]. Перидерма — это сложная ткань, состоящая из феллогена или пробкового камбия — вторичной латеральной меристемы — и двух типов тканей, которые он производит — феллемы (также обычно называемой пробкой) и феллодермы [26]. Во время вторичного роста, за счет увеличения обхвата растительных органов, перидерма заменяет эпидерму как самую внешнюю ткань и выступает в качестве первой линии защиты внутренних структур осевых органов растений от абиотических и биотических воздействий. Таким образом, перидерма может закладываться непосредственно под первичной покровной тканью (гиподермально — часто) или в более глубоких слоях тканей органов (например, вблизи волокон, прилегающих к флоэме) [27, 28]. Многократное заложение феллогена приводит к образованию множественных перидерм, формирующих корку (ритидом). Наиболее характерным свойством феллемы является высокая степень опробкования ее вторичных клеточных стенок, при этом их утолщения могут быть как равномерными, так и неравномерными [25]. Например, у *Quercus suber* L. высота клетки корки 30–40 мкм, а толщина ее оболочки 1–1,5 мкм [29]. Перидерма у *Vaccinium praestans* Lamb. закладывается в первый год нарастания стебля, к третьему — представляет непрерывное многослойное кольцо. Феллема гомогенная, тонкостенная, в радиальном ряду поперечного среза ткани имеются три клетки, тангентальный размер которых составляет $9,9 \pm 0,32$, а радиальный — $6,9 \pm 0,37$ мкм [30]. Нами впервые показано, что у одревесневших побегов *M. communis* феллема закладывается в более глубоких слоях коры и формирует несколько рядов тонкостенных клеток.

Возможно, такое ее строение обуславливает подмерзание мелких побегов растений, что и ограничивает распространение *M. communis* за пределы влажных и сухих субтропиков РФ.

Сырье мирта является ценным источником целого комплекса биологически активных веществ (фенольные кислоты, флавоноиды, ЭМ и др.), с чем связан широкий спектр его терапевтической активности. Вторичные метаболиты мирта обладают антибактериальным, противогрибковым, противовоспалительным, антиоксидантным, противовирусным, антидиабетическим действием, укрепляют иммунную систему [16].

Вместилища с ЭМ (секреторные полости) являются важной особенностью семейства Myrtaceae и изучаются с середины XVIII в. Ранее данные структуры рассматривали лишь как место синтеза и хранения терпеноидов [32]. Нами отмечено, что стенки выстилающих клеток вместилищ стебля при окрашивании спиртовым раствором судана III приобретают розовый оттенок. В анатомической практике судан III также используется для выявления пробки (в составе которой имеется суберин) и кутикулы, а также жиров [17]. Таким образом, стенки выстилающих клеток вместилищ в стебле содержат суберин, что подтверждено нашими дополнительными гистохимическими исследованиями поперечных срезов стеблей. Подобные результаты приведены в работе Х.Ф. Ричит с соавторами для вместилищ листовых пластинок девяти представителей семейства Myrtaceae [32]. По мнению исследователей, суберинизация снижает проницаемость клеточных стенок секреторных структур, обеспечивая изоляцию вторичных метаболитов и предотвращая диффузию секретируемых химических веществ в окружающие ткани [32].

При исследовании локализации фенольных соединений с использованием толуидинового синего окрашивание наблюдали преимущественно в покровных, механических, проводящих и секреторных тканях (стенки выстилающих клеток вместилищ). Стебли исследуемых органов покрыты эпидермой, внешние тангентальные клетки которых формируют кутикулярный слой. С химической точки зрения кутикула состоит из набора соединений с различными физико-химическими свойствами. Этими соединениями могут быть воски, кутин и/или кутан, полисахариды, фенольные соединения и минеральные элементы [33]. Вероятно, наличие в кутикуле фенолов объясняет окрашивание внешней тангентальной части клеток эпидермы. В процессе развития проводящей системы одни из составляющих ее элементов (сосуды) подвергаются лигнификации. Лигнин, в свою очередь, содержит фенольную гидроксильную группу [34], что, возможно, и дает цветную реакцию, характерную для фенольных соединений. Склеренхима состоит из непроводящих клеток,

которые имеют толстую лигнифицированную вторичную клеточную стенку. Феллема стебля является неотъемлемой структурной единицей перидермы (пробкой). С химической точки зрения пробка состоит как из нерастворимых, так и из растворимых компонентов. К нерастворимым компонентам относятся алифатический суберин, ароматический суберин (лигниноподобный), целлюлоза и гемицеллюлозы. Растворимые компоненты в основном состоят из липидов и фенольных соединений. Состав пробки сильно варьирует и может содержать 33–50% алифатического суберина; 13–29% лигниноподобного ароматического суберина; 6–25% полисахаридов; 13–24% экстрактивных веществ и 1–7% золы. Наиболее распространенными экстрактивными веществами обычно являются воски и дубильные вещества [35].

Проведенные нами гистохимические исследования также выявили локализацию флавоноидов. В молодых стеблях данные соединения присутствуют в большей части тканей, за исключением ксилемы. У одревесневших органов накопление флавоноидов снижается, о чем свидетельствует разница в интенсивности окрашивания групп гистологических элементов сравнительно с молодыми стеблями. Для листьев также характерно присутствие флавоноидов. Полученные нами данные находят подтверждение в литературе. С помощью люминесцентной микроскопии показано накопление флавоноидов в паренхиме ксилемы, флоэмы и мезофилле поперечных срезов черешка *M. communis* [10]. В листьях при использовании гистохимических методов анализа накопление флавоноидов отмечено в клетках мезофилла [36] и, согласно биохимическим исследованиям, их общее содержание незначительно превышает таковое в стеблях ($6,56 \pm 0,57$ и $6,11 \pm 0,30$ мг/г в пересчете на катехин) [37]. По сведениям других авторов, содержание флавоноидов в стеблях может быть выше, чем в листьях (5, 17 и 3 мг/г соответ-

ственно) [38]. Тем не менее, в этих работах показано, что наибольшее суммарное количество фенольных соединений характерно для листьев [38].

Заключение

Проведенные нами сравнительные морфологические исследования показали отличия между молодыми и одревесневшими стеблями *M. communis* по цвету и форме. Количественные исследования секреторных структур на поверхности осевых органов подтвердили потенциал неодревесневших стеблей в накоплении ЭМ. Анатомически впервые показано, что у одревесневших стеблей *M. communis* формируется особый тип феллемы, образование которой происходит вследствие заложения феллогена не гиподермально, а в более глубоких слоях коры. Клетки феллемы вытянуты в радиальном направлении, а ее оболочки тонкие. Особое строение перидермы, возможно, обуславливает подмерзание побегов и ограничивает распространение *M. communis* за пределы влажных и сухих субтропиков РФ. Основным местом накопления ЭМ в тканях осевых органов являются вместилища, выстилающие клетки которых суберинизируются, что препятствует выходу вторичных метаболитов в окружающие ткани. По мере развития перидермы наблюдается тенденция к разрушению эндогенных секреторных структур. В тканях стебля обнаруживаются фенольные соединения, при этом часть из них структурно связана с клеточными стенками, а другая — накапливается в протопластах эпидермы, паренхимы, флоэмы, в наибольшем количестве — у молодых (неодревесневших) органов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН «НБС-ННЦ» (проект № FNNS-2024-0004). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dudchenko V.V., Svydenko L.V., Markovska O.Y. Morphobiological and biochemical characteristics of *Monarda* L. varieties under conditions of the Southern Steppe of Ukraine. *J. Ecol. Eng.* 2020;21(8):99–107. DOI: 10.12911/22998993/127093
2. Snow N., McFadden J., Evans T.M., Salywon A.M., Wojciechowski M.F., Wilson P.G. Morphological and molecular evidence of polyphyly in *Rhodomyrtus* (Myrtaceae: Myrteae). *Syst. Bot.* 2011;36(2):390–404. DOI: 10.1600/036364411X569570
3. Sumbul S., Ahmad M.A., Asif M., Akhtar M. *Myrtus communis* Linn. — A review. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2011;2(4):395–402.
4. Baytop T. *Türkçe bitki adları sözlüğü*. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları, 1997; 578 pp.
5. Nadkarni K.M. *Indian materia medica*. 3rd ed. Bombay: Popular Prakashan Pvt. Ltd, 1989; 968 pp.
6. Kanoun K., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Atik Bekkara F. Comparative studies on antioxidant

activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. *Int. Food Res. J.* 2014;21(5):1957–1962.

7. Соколов С.Я. *Деревья и кустарники СССР: Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. 1: Голосеменные*. Москва, Ленинград: Изд-во АН СССР, 1965. 464 с.

8. Логвиненко Л.А. Особенности прорастания семян *Myrtus communis* L. var. *belgica*, полученных в условиях культуры Южного Берега Крыма. *Аграрный вестник Урала*. 2019;(6(185)):15–21. DOI: 10.32417/article_5d47f7f2cc7a67.558517

9. Бакова Е.Ю., Меликов Ф.М., Коновалов Д.А., Бобкова Н.В. Анатомо-морфологическая характеристика листьев мирта обыкновенного, произрастающего в условиях Южного Берега Крыма. *Фармацевтическая химия и фармакогнозия*. 2021;70(2):29–35. DOI: 10.29296/25419218-2021-02-05

10. Маслова В.Д., Державина Е.Р., Куркин В.А., Рыжов В.М. Морфолого-анатомическое исследование листьев мирта обыкновенного (*Myrtus communis* L.). *Аспирантский вестник Поволжья*. 2024;24(2):93–101. DOI: 10.35693/AVP636473
11. Бакова Н.Н., Шевчук О.М., Логвиненко Л.А., Бакова Е.Ю., Суслова А.А. Анатомическое строение и биохимическая характеристика плодов мирта обыкновенного. *Бюллетень ГНБС*. 2022;(145):151–157. DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-151-157
12. Дунаевская Е.В., Логвиненко Л.А. Содержание эссенциальных элементов в сырье *Myrtus communis* L. в основные фазы. *Аграрный вестник Урала*. 2018;(5(172)): 20–26.
13. Логвиненко Л.А. Культура мирт обыкновенный (*Myrtus communis* L.) в условиях Южного Берега Крыма. *Аграрный вестник Урала*. 2017;(9(163)):16–23.
14. Маслова В.Д., Куркин В.А., Рыжов В.М., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Бакова Н.Н., Бакова Е.Ю. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений из листьев мирта обыкновенного в отношении штаммов, выделенных от пациентов с муковисцидозом. *Фармация и фармакология*. 2024;12(6):410–419. DOI: 10.19163/2307-9266-2024-12-6-410-419
15. AL-Hadeethi M.A. Anatomical and palynological study of *Myrtus communis* L. *Diyala Journal for Pure Sciences*. 2016;12(4):1–15.
16. Черятова Ю.С. Особенности строения и формирования эфирномасличных вместилищ *Myrtus communis* L. *Разнообразие растительного мира*. 2023;2(17):5–11. DOI: 10.22281/2686-9713-2023-2-5-11
17. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джаилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. *Основы микротехнических исследований в ботанике. Справочное руководство*. М.: Изд. каф. высш. растений биол. ф-та Моск. гос. ун-та; 2000. 127 с.
18. Симагина Н.О., Лысякова Н.Ю., Булавин И.В. Аллелопатические аспекты симбиотических взаимоотношений некоторых видов семейства Orchidaceae. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. 2009;(1(20)):50–56.
19. Тамахина А.Я., Локьяева Ж.Р. Гистохимический анализ биологически активных веществ в корневых и корнях *Inula helenium* L., произрастающего на территории Кабардино-Балкарской Республики. *Известия КБГАУ*. 2014;3(5):35–39.
20. Dhakshinamoorthy S., Mariama K., Elsen A., De Waele D. Phenols and lignin are involved in the defence response of banana (*Musa*) plants to *Radopholus similis* infection. *Nematology*. 2014;16(5):565–576. DOI: 10.1163/15685411-00002788
21. Никитина А.С., Логвиненко Л.А., Никитина Н.В., Нигарян С.А. Морфометрическое и гистохимическое исследование травы мелиссы лекарственной из коллекции Никитского ботанического сада. *Фармация и фармакология*. 2018;6(6):504–534 DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-504-534
22. Солдатов Д.К., Булавин И.В., Калмыкова Д.И., Логвиненко Л.А., Шевчук О.М. Структура листовой пластинки некоторых представителей рода *Echinacea* Moench в условиях интродукции на Южном берегу Крыма. *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2024;(3(172)):66–78.
23. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):4–9.
24. Khan S.D., Zaki M.J., Khad A. Leaf architecture, ornamentation and estimation of lamina area in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Int. J. Biol. Biotechnol.* 2016;13(4):537–550.
25. Эверт Р.Ф. *Анатомия растений Эзау. Меристемы, клетки и ткани растений: строение, функции и развитие*; пер. с англ. под ред. канд. биол. наук А.В. Степановой. М.: Лаборатория знаний; 2015. 603 с.
26. Serra O., Mähönen A.P., Hetherington A.J., Ragni L. The making of plant armor: The periderm. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2022;73:405–432. DOI: 10.1146/annurev-arplant-102720-031405
27. Odell A.E., Vander Kloet S.P., Newell R.E. Stem anatomy of *Vaccinium* section *Cyanococcus* and related taxa. *Can. J. Bot.* 1989;67(8):2328–2334. DOI: 10.1139/b89-298
28. Campilho A., Nieminen K., Ragni L. The development of the periderm: the final frontier between a plant and its environment. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2020;53:10–14. DOI: 10.1016/j.pbi.2019.08.008
29. Leite C., Pereira H. Cork-containing barks – A review. *Front. Mater.* 2017;3:63. DOI: 10.3389/fmats.2016.0006
30. Конанина А.В., Еремин В.М. Анатомия коры представителей семейства Ericaceae, произрастающих на Сахалине и Курильских островах. *Бот. журн.* 2012;97(8):77–95.
31. Джелдубаева Э.Р., Ярмолюк Н.С., Чуюн Е.Н., Шевчук О.М., Бакова Н.Н. Анальгетический и противовоспалительный эффекты фармацевтически активных компонентов *Myrtus communis* L. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2023;9(75):36–48.
32. Richit J.F., Díaz S.V.N., Dick L.F.P., Mariath J.E.A. Neither lysigenous nor just oil: Demystifying myrtaceous secretory cavities. *Botany*. 2023;110(11):e16248. DOI: 10.1002/ajb2.16248
33. Fernández V., Guzmán-Delgado P., Graça J., Santos S., Gil L. Cuticle structure in relation to chemical composition: Re-assessing the prevailing model. *Front. Plant Sci.* 2016;7:427. DOI: 10.3389/fpls.2016.00427
34. Mahmood Z., Yameen M., Jahangeer M., Riaz M., Ghaffar A., Javid I. Lignin as natural antioxidant capacity. *Lignin – Trends and Applications*. Ed. M. Poletto. London: InTech; 2018:181–205. DOI: 10.5772/intechopen.73284
35. Pinheiro C., Wienkoop S., de Almeida J.F., Brunetti C., Zarrouk O., Planchon S., Gori A., Tattini M., Ricardo C.P., Renaut J., Teixeira R.T. Phellem cell-wall components are discriminants of cork quality in *Quercus suber*. *Front. Plant Sci.* 2019;10:944. DOI: 10.3389/fpls.2019.00944
36. Kuster V.C., Vale F.H.A. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2016;26(6):673–678. DOI:10.1016/j.bjp.2016.05.015
37. Kanoun K., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaiza N., Atik Bekkara F. Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. *Int. Food Res. J.* 2014;21(5):1957–1962.
38. Aidi Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M.E., Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.* 2010;48(5):1362–1370. DOI: 10.1016/j.fct.2010.03.002

Поступила в редакцию 01.07.2025

После доработки 20.12.2025

Принята в печать 29.12.2025

RESEARCH ARTICLE

Myrtus communis stem structure peculiarities and histochemical analysis

I.V. Bulavin* , D.I. Kalmykova , V.D. Konobeev , L.A. Logvinenko , O.M. Shevchuk 

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, Russian Academy of Sciences,
Russia, 298648, Yalta, Nikita, Nikitskiy spusk, 52

*e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Myrtus communis L. (common myrtle) is one of the important aromatic and medicinal plants of the family Myrtaceae. Its organs contain sufficient quantities of essential oils, phenolic acids, flavonoids, tannins, anthocyanin pigments, and fatty acids, which make it a promising object for the pharmaceutical and perfume industries. In the Russian Federation, *M. communis* has been cultivated as an ornamental and essential oil plant on the Southern Coast of Crimea and the Black Sea coast of the Caucasus since the 19th century. In the Southern Coast of Crimea conditions, *M. communis* leaf blade and fruit morpho-anatomical characteristics were investigated. However, data on the stem structure is still limited overall. Therefore, the aim of this work was a comparative analysis of the non-woody (young) and woody stem anatomy, as well as the detection of the localization of essential oil and phenolic compounds in its tissues. It was estimated that the young and woody stems of *M. communis* differed in color and shape and a possible contribution of the axial organs to a whole portion of the essential oil yield was determined. For the first time it was shown that the woody stems of *M. communis* had a special type of phellem cells that were elongated in the radial direction with thin cell walls. The special structure of the secondary dermal tissue may cause freezing of shoots and limit the spread of *M. communis* beyond the humid and dry subtropics of the Russian Federation. Qualitative histochemical studies revealed accumulation of essential oil in the cavities of young and woody stems, with suberization of the endogenous secretory structure sheath layer cells and a tendency for their destruction as the periderm develops. Phenolic compounds are found in stem tissues, some of which are structurally linked to cell walls, while others accumulate in the protoplasts of the epidermis, parenchyma, and phloem, in the greatest quantities in young (non-woody) organs.

Keywords: common myrtle, axial organs, anatomy, qualitative analysis, essential oil, phenols

Funding: This study was performed under the state assignment of the FSFIS “NBG-NSC” FNNS-2024-0004.

Сведения об авторах

Булавин Илья Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9929-0946>

Калмыкова Дарья Ивановна — мл. науч. сотр., лаборатория клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: krikbas@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3759-8136>

Конобеев Василий Дмитриевич — мл. науч. сотр., лаборатория биохимии, физиологии и репродуктивной биологии растений Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: vasilikonobeev@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2480-5052>

Логвиненко Лидия Алексеевна — науч. сотр., лаборатория лекарственных и ароматических растений Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: logvinenko-1963@list.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0936-1895>

Шевчук Оксана Михайловна — докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зам. директора по науке, зав. отделом технических культур и биологически активных веществ Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3811-3161>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 599.735.3:591.133.16(470.2)

Содержание ретинола и α -токоферола у представителей семейства Cervidae (Mammalia, Cetartiodactyla) на северо-западе России**И.В. Баишникова* , И.А. Зайцева , С.Н. Калинина ,
Д.В. Панченко , Т.Н. Ильина** *Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Российская академия наук, Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11***e-mail: iravbai@mail.ru*

Содержание витаминов в организме является одним из важнейших показателей, который отражает уровень питания крупных копытных млекопитающих, обитающих на северной периферии ареала в условиях ограниченного доступа кормовых ресурсов в холодный период года. В данной работе исследовали уровень ретинола (витамин А) и α -токоферола (витамин Е) в органах и тканях диких лосей (*Alces alces*) разного возраста и пола, а также содержащихся в полувольных условиях европейского благородного оленя (*Cervus elaphus*) и марала (*C. e. sibiricus*) на северо-западе России (Республика Карелия и Ленинградская область). Биологический материал был получен от животных, добытых в результате легальной охоты в период с октября по январь. Уровни витаминов у исследованных животных в целом согласовались со значениями, установленными для оленьих, обитающих в других регионах мира, в том числе и с более мягким климатом. Относительно низкое содержание витаминов, выявленное у представителей рода *Cervus*, требует дополнительного изучения. У лосей не было обнаружено половых и возрастных различий в содержании витаминов А и Е, за исключением более низкого уровня α -токоферола в почках взрослых самок по сравнению с молодыми. Беременные самки лосей отличались сравнительно низким содержанием ретинола в исследованных органах и тканях. Обнаружено влияние района, в котором были добыты лоси, на содержание ретинола в печени и α -токоферола в сердце, что может быть связано с природно-климатическими особенностями районов исследования, которые определяют состав фитоценозов и кормовую ценность растений. Полученные результаты могут быть использованы при оценке состояния и разработке плана управления популяциями крупных копытных.

Ключевые слова: ретинол, α -токоферол, олени, лось, благородный олень, периферия ареала, адаптация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-6

Введение

Копытные млекопитающие, как важные компоненты биогеоценозов, оказывают влияние на формирование и продуктивность растительных сообществ, а также являются неотъемлемым звеном в трофических цепях. Видовой и численный состав копытных, обитающих на той или иной территории, тесно связан с природно-климатическими условиями. Для Республики Карелия аборигенными видами являются два представителя семейства Оленьи (Cervidae): лось (*Alces alces*) и лесной северный олень (*Rangifer tarandus*) [1]. Лось – самый крупный представитель оленьих и один из главных ресурсных видов на данной территории. В Северном полушарии имеет довольно большой ареал обитания, южный ареал ограничен

высокими летними температурами. Самая высокая плотность популяции лосей в мире наблюдается в западной Фенноскандии, преимущественно в ее прибрежных районах, чему способствуют оптимальные климатические условия обитания и кормления, а также интенсивное лесопользование [2]. На северо-западе России численность вида значительно ниже, что связано с более суровыми климатическими условиями, прессом хищников и браконьерством [2, 3].

Европейский благородный олень (*Cervus elaphus*) и марал (*C. e. sibiricus*) не являются типичными обитателями северо-запада России, однако существует практика полувольного разведения представителей этого вида в охотничьих хозяйствах в загонах большой площади для расширения

видового состава и увеличения численности охотничьих животных, а также проведения высокосервисной охоты [4]. Наряду с изучением некоторых закономерностей освоения этими животными новых угодий, оценки экологических последствий их влияния на фито- и зооценозы [4] представляет интерес оценка их физиологического состояния при обитании в нетипичных природно-климатических условиях.

Климатические условия, с которыми тесно связаны доступность и качество пищевых ресурсов, оказывают большое влияние на численность популяций крупных копытных [5]. От условий питания зависят вероятность размножения осенью, выживаемость зимой, показатели лактации самок, взаимодействие с хищниками и другие факторы, влияющие на выживание и успешное воспроизводство. Упитанность животных, ключевым параметром которой является содержание жира в организме, отражает кумулятивный энергетический баланс за относительно длительный период и в конечном итоге определяет численность и динамику популяции [6, 7]. Важнейшими нутриентами, уровень и обмен которых в организме животных тесно связаны с метаболизмом липидов, являются витамины А и Е, поступающие в организм исключительно с пищей. Они необходимы для успешного размножения, роста, регуляции иммунной функции, а также участвуют в адаптационных процессах [8–10]. Строение и функционирование пищеварительной системы жвачных определяет особенности усвоения витаминов из растительных тканей, при этом степень деградации и высвобождения витаминов в процессе микробной ферментации корма в рубце является существенной характеристикой их биодоступности [11, 12].

Основным источником витамина А для растительноядных являются обладающие провитаминной активностью каротиноиды, преимущественно β -каротин, которые также выполняют собственные биохимические функции в организме животных. Потери β -каротина в рубце вследствие окисления и деградации бактериями в среднем составляют 20% [11]. При этом трансформация каротина в ретиноиды у жвачных начинается в преджелудках [13]. Преобладающей формой витамина А в организме является ретинол, тогда как биологическая активность этого витамина связана в основном с действием ретиналя, необходимого для зрения, и ретиноевой кислоты, которая регулирует важнейшие физиологические процессы, такие как клеточная дифференцировка, развитие и иммунная защита [8].

Витамин Е включает в себя жирорастворимые антиоксиданты растительного происхождения: α -, β -, γ - и δ -токоферолы, а также соответствующие токотриенолы. Среди них α -токоферол обладает наибольшей биологической активностью и селек-

тивно удерживается в тканях млекопитающих [14]. В биологических мембранах α -токоферол является структурным компонентом, взаимодействующим с мембранными фосфолипидами, а также антиоксидантом, защищающим полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) и другие липиды от перекисного окисления и повреждения свободными радикалами [9]. Этот витамин необходим для размножения, при его дефиците наблюдаются гибель плода и аборт. Кроме того, его недостаток способствует развитию миодистрофии, при которой наблюдаются дегенеративные изменения тканей сердечной и скелетной мускулатуры [10, 15]. Для обитающих в естественных условиях оленей, имеющих возможность в весенне-летне-осенний период употреблять богатые токоферолами зеленые части растений, недостаток витамина Е маловероятен, однако зимой разнообразие и качество кормов существенно снижаются. В этот период исследование уровня витамина Е, который не накапливается в организме в значительных количествах, является актуальным. В литературе есть сведения о дефиците витамина Е в популяции лосей на Аляске, которые содержались в неволе и большую часть года получали гранулированный рацион [16].

При анализе физиолого-биохимического состояния копытных, обитающих в северных условиях при ограниченном доступе кормовых ресурсов в холодный период года, оценка содержания витаминов А и Е в организме может дать важную информацию об уровне питания животных. Эти данные могут быть использованы при оценке состояния и разработке плана управления популяциями крупных копытных. Сведения об уровне витаминов А и Е в органах и тканях этих животных, обитающих в естественных условиях, немногочисленны, представленная информация в основном касается содержания витаминов в печени и мышечной ткани у разных видов оленей [17–20]. Изучение уровня витаминов у крупных копытных на северо-западе России прежде не проводилось. Ранее нами были опубликованы данные по содержанию витаминов А и Е у небольшой выборки лосей ($n = 16$), добытых в трех районах Республики Карелия (Лахденпохский, Сортавальский и Пряжинский), полученные в рамках исследования содержания ртути и низкомолекулярных антиоксидантов в организме диких копытных млекопитающих [21]. В данной работе представлены результаты расширенного исследования содержания ретинола (витамин А) и α -токоферола (витамин Е) в органах и тканях лосей разного возраста и пола, охватившего восемь районов Республики Карелия и Приозерский район Ленинградской области. Кроме того, представлены данные об уровне витаминов у европейского благородного оленя и марала, содержащихся в полувольных условиях в охотничьем хозяйстве в Сортавальском районе Республики Карелия.

Материалы и методы

Биологический материал был получен от лосей, благородных оленей и маралов, добытых в результате легальной охоты, поэтому для исследования не требовалось одобрения биоэтического комитета Института биологии Карельского научного центра РАН. Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Объекты исследования. Исследованы лоси ($n = 61$) обоих полов в возрасте от 6 мес. до 8 лет, добытые в восьми районах Республики Карелия (Лоухском, Костомукшском, Беломорском, Пряжинском, Кондопожском, Прионежском, Лахденпохском, Сортавальском) и Приозерском районе Ленинградской области. Животные были разделены на следующие половозрастные группы: сеголетки (6–8 мес., самцы $n = 5$), молодые (1–2 года, самцы $n = 8$, самки $n = 3$), взрослые (3–8 лет, самцы $n = 26$, самки небеременные $n = 14$, самки беременные $n = 5$). Возраст животных оценивали по внешнему виду, размеру, рогам, степени стертости жевательной поверхности коренных зубов нижней челюсти [22]. Кроме того, был исследован биологический материал от самок и самцов европейского благородного оленя (0,5–12 лет, $n = 6$) и марала (2–12 лет, $n = 5$), которые содержались в полувольных условиях в охотничьем хозяйстве (ООО «Охотничье хозяйство Черные камни», Сортавальский район, Республика Карелия), расположенном в подзоне средней тайги. Животные содержались в разных загонах площадью 750 га (благородный олень) и 3000 га (марал). Пастбища в хозяйстве представлены еловыми, сосновыми и лиственными лесами, заросшими полянами, водно-болотными и сельскохозяйственными угодьями. Разведение крупных копытных на данной территории осуществляется с 2010 г., на момент исследования средняя плотность копытных в охотхозяйстве составляла для благородного оленя 200 особей на 1000 га, для марала – 60 особей на 1000 га. Регулярная подкормка животных производилась летом (2 раза в неделю) и зимой (через день), использовались зерновые, комбикорм, силос, сено, соль-лизунец с минеральными добавками.

Отбор биологического материала (печень, почки, сердце, скелетная мышца, легкие и селезенка) проводили у животных, легально добытых в период охоты с октября по январь 2017–2024 гг. (лоси) и в ноябре 2019 г. (благородные олени, маралы). Образцы тканей для исследования отбирали в течение 2–4 ч после добычи животных, далее замораживали их и хранили до проведения анализа при температуре -80°C .

Методы. Для определения содержания витаминов навески тканей (100 мг) гомогенизировали в 0,9 мл 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4), содер-

жащей 0,001 М динатриевой соли этилендиаминететрауксусной кислоты. В конические полиэтиленовые пробирки вносили 0,25 мл гомогената и добавляли 0,25 мл 0,025%-ного раствора бутилгидрокситолуола в этаноле, после чего тщательно смешивали содержимое пробирки для осаждения белков. Затем добавляли 0,5 мл 0,0125%-ного раствора бутилгидрокситолуола в н-гексане, энергично встряхивали в течение 5 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 g и оставляли образцы на холоде (4°C) в течение 40 мин. В гексановом слое на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (Россия) с УФ-детектором определяли концентрации α -токоферола и ретинола при длине волны 292 и 324 нм соответственно. Использовали хроматографическую колонку с прямой фазой (КАХ-5-80-4, Россия), элюирование проводили в изократическом режиме, скорость потока элюента 200 мкл/мин. Элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98,5:1,5. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы ретинола и α -токоферола (Sigma, США), расчет содержания витаминов проводили методом внешнего стандарта.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводился с использованием программ MS Excel и Statgraphics Plus 5.0. Данные по благородному оленю и маралу обрабатывали без учета пола и возраста в связи с небольшой выборкой. Нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для оценки межвидовых различий, а также различий между группами лосей использовали U-критерий Манна-Уитни (для межвидовых сравнений данные по лосю объединили, исключили беременных самок). Для оценки влияния факторов «возраст», «пол» и «район добычи» на содержание витаминов у лосей применяли многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA). Влияние пола на исследуемые показатели изучали во всех возрастных группах, за исключением сеголетков, которые были представлены только самцами. Среди взрослых самок на момент добычи пять оказались беременными, данные по ним рассчитывали отдельно и сравнивали с небеременными взрослыми самками. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Результаты по лосю представлены на рисунках в виде бокс-плотов с обозначением средних, медиан, верхнего и нижнего квартилей, а также выпадающих значений. Данные по благородному оленю и маралу представлены в таблице в виде медиан, верхнего и нижнего квартилей.

Результаты и обсуждение

В литературе имеются данные об уровне витаминов у оленей, обитающих в различных регионах мира, однако сведения, касающиеся лосей, встречаются редко. При этом чаще всего речь идет о со-

держании этих нутриентов в мышечной ткани как продукте питания. Основным органом, осуществляющим регуляцию метаболизма витаминов А и Е в организме, является печень [8, 14], звездчатые клетки которой играют важную роль в депонировании витамина А у большинства млекопитающих

[23]. Именно в этом органе было обнаружено самое значительное содержание ретинола у исследованных нами представителей семейства Cervidae (рис. 1А, таблица). У лосей средний уровень ретинола в печени варьировал от $6,03 \pm 0,84$ мкг/г ткани у беременных самок до $37,79 \pm 10,07$ мкг/г ткани

Таблица

Содержание ретинола и α-токоферола в органах и тканях благородных оленей и маралов на северо-западе России, мкг/г ткани (Ме (Q1; Q3))

Орган	Благородный олень		Марал	
	Ретинол	α-Токоферол	Ретинол	α-Токоферол
Печень	7,47 (3,73; 8,66)	2,15* (1,98; 3,96)	7,81 (6,86; 9,27)	1,40* (1,01; 3,27)
Почки	0,56* (0,33; 0,65)	1,43* (0,79; 2,26)	0,66 (0,65; 0,86)	2,34 (2,07; 2,35)
Сердце	0,19* (0,16; 0,22)	1,57* (1,33; 2,07)	0,16* (0,15; 0,18)	1,76* (1,14; 2,00)
Скелетная мышца	0,13* (0,06; 0,19)	1,29* (1,13; 2,76)	0,14* (0,13; 0,16)	1,42* (1,14; 1,51)
Легкие	0,10* (0,08; 0,11)	1,52* (1,21; 2,40)	0,16* (0,09; 0,16)	1,20* (1,05; 1,46)
Селезенка	0,19 (0,13; 0,27)	1,83* (1,09; 1,92)	0,14 (0,10; 0,23)	1,62* (1,06; 2,30)

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с лосем, $p < 0,05$

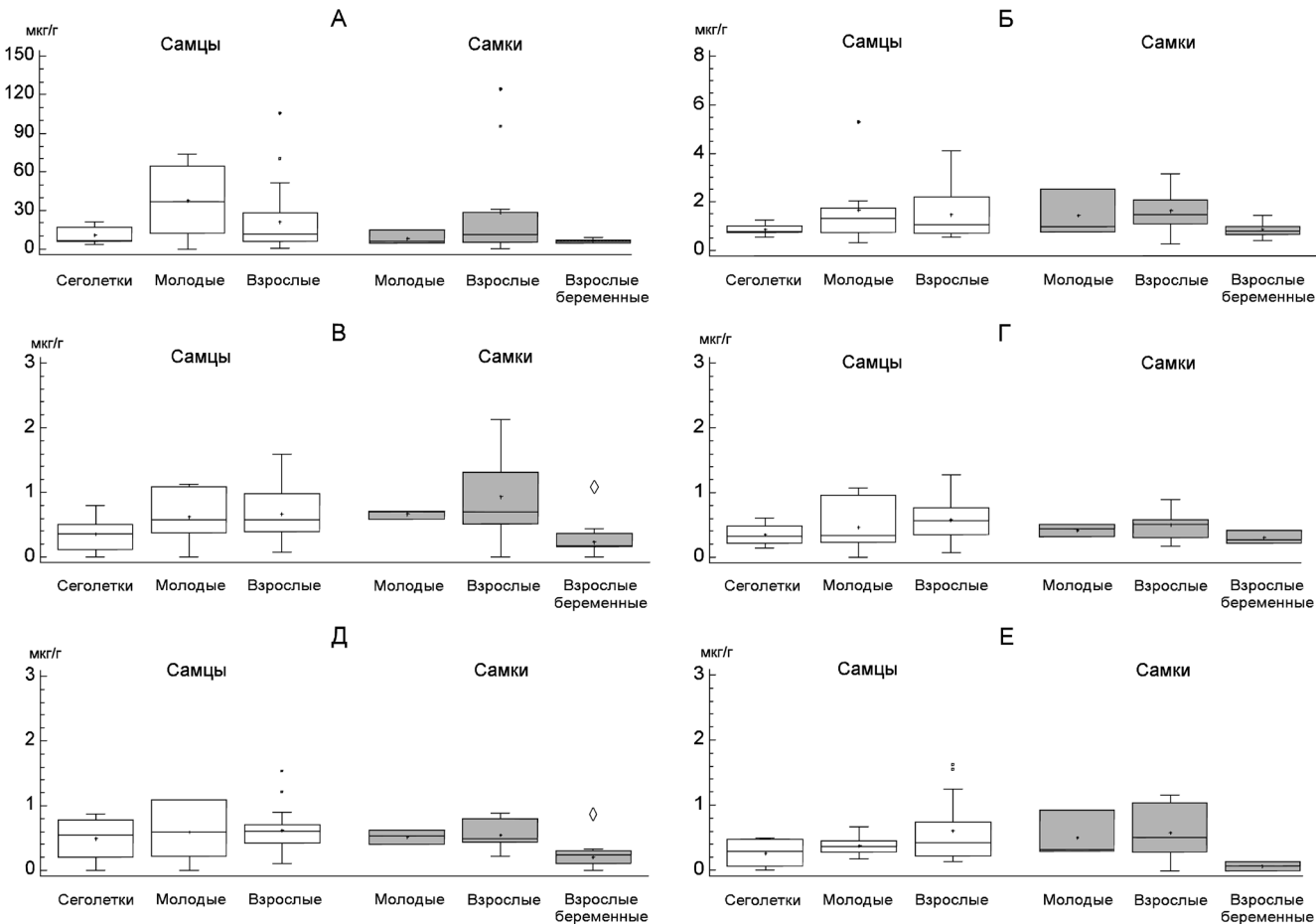


Рис. 1. Содержание ретинола в печени (А), почках (Б), сердце (В), скелетной мышце (Г), легких (Д) и селезенке (Е) лосей, обитающих на северо-западе России.
Обозначения. По оси абсцисс – возрастные группы; по оси ординат – содержание ретинола, мкг/г ткани; ♦ – достоверные различия по сравнению со взрослыми самками, $p < 0,05$.

у молодых самцов. Для сравнения, содержание ретинола в печени у лосей на севере Канады составляло 46,08 мкг/г ткани [24]. Средний уровень витамина у благородных оленей и маралов, добытых в Сортавальском районе Карелии, составил $6,84 \pm 1,46$ и $7,56 \pm 1,39$ мкг/г ткани соответственно, что практически не отличалось от этого показателя у благородных оленей в Испании – 7,61 мкг/г ткани [18]. Более высокое содержание витамина А было обнаружено в печени северных оленей в Канаде и Норвегии (62,67 и 209,16 мкг/г ткани соответственно) [24, 25]. В других органах и тканях у исследованных нами копытных уровень ретинола был значительно ниже, чем в печени (рис. 1Б–Е, таблица). Лоси превосходили благородных оленей и маралов по содержанию ретинола в сердце, скелетной мышце и легких, в почках обнаружено достоверное различие между лосями и благородными оленями ($p < 0,05$). Полученные в нашем исследовании данные по содержанию витамина у лосей были сопоставимы с таковыми для северных оленей в Канаде и Норвегии в почках (0,82 мкг/г ткани) [24] и мышечной ткани (0,94 и 0,20 мкг/г ткани) [24, 25]. Более низкие значения выявлены

в мышечной ткани северных оленей в Швеции (0,03 мкг/г ткани) [17] и косуль, обитающих в Германии ($< 0,01$ мкг/г ткани) [19].

У исследованных нами представителей семейства Cervidae содержание витамина Е также было более значительным в печени, однако у некоторых особей его уровень в других органах и тканях был сравнительно высоким (рис. 2А–Е, таблица). Лоси по данному показателю превосходили благородных оленей и маралов ($p < 0,05$). Содержание α -токоферола в печени исследованных нами лосей варьировало в среднем от $10,19 \pm 4,04$ мкг/г ткани у сеголетков до $17,41 \pm 10,46$ мкг/г ткани у беременных самок. Сопоставимые значения установлены у благородных оленей в Испании (14,21 мкг/г ткани) [18]. В печени благородных оленей и маралов, добытых в Сортавальском районе Карелии, уровень α -токоферола составлял $2,64 \pm 0,45$ и $2,07 \pm 0,58$ мкг/г ткани соответственно. Еще более низкие значения были обнаружены у лосей на севере Канады ($< 0,02$ мкг/г ткани) [24]. В то же время у северных оленей, обитающих там же, содержание витамина составило 126,40 мкг/г ткани [24], тогда как у животных этого же вида

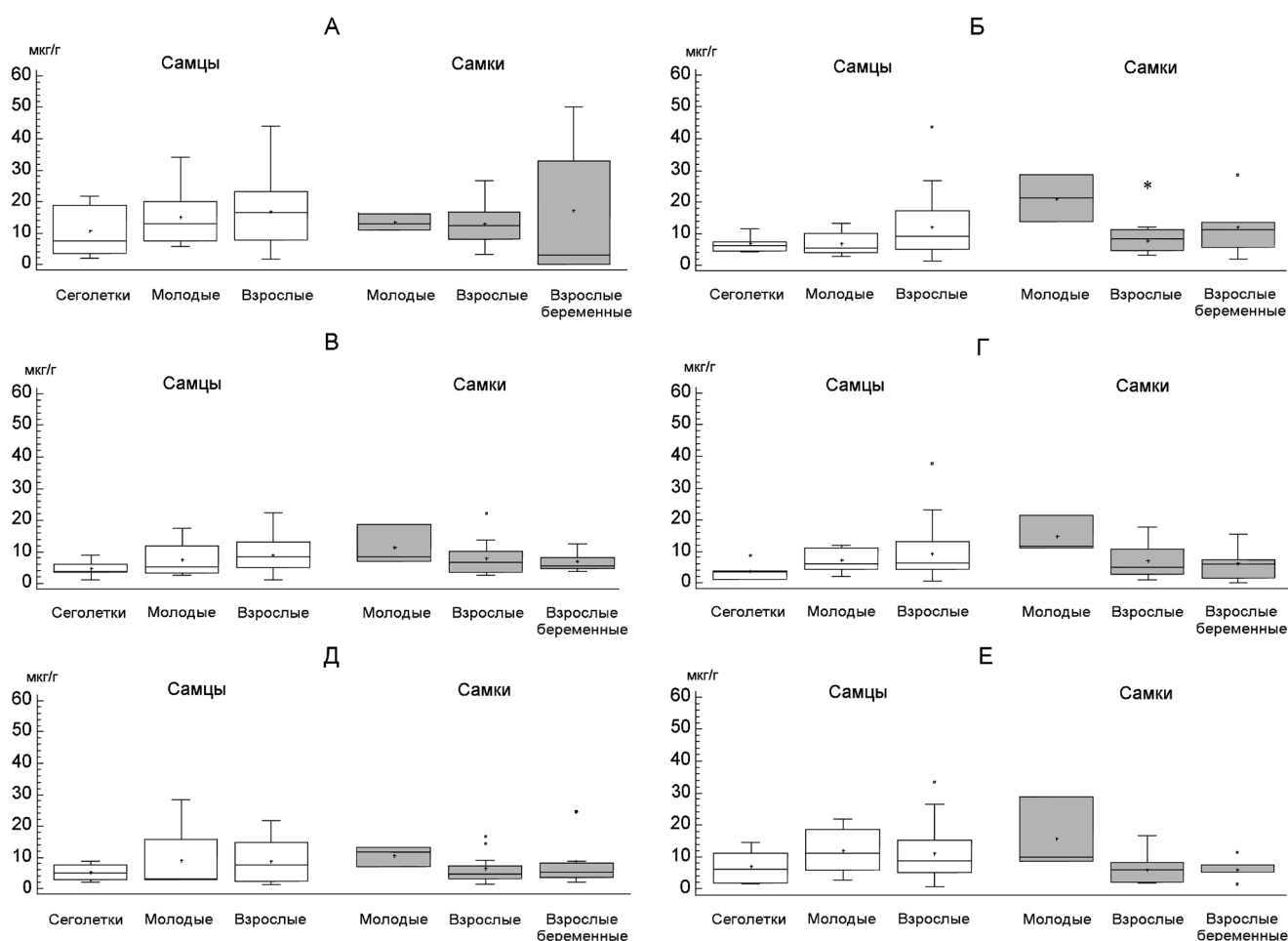


Рис. 2. Содержание α -токоферола в печени (А), почках (Б), сердце (В), скелетной мышце (Г), легких (Д) и селезенке (Е) лосей, обитающих на северо-западе России.

Обозначения. По оси абсцисс – возрастные группы; по оси ординат – содержание α -токоферола, мкг/г ткани; * – достоверные различия по сравнению с молодыми самками, $p < 0,05$.

в Норвегии — 4,80 мкг/г ткани [25]. Следует отметить, что предполагаемый нижний пороговый уровень витамина Е в печени для жвачных животных равен 10 мкг/г ткани [18]. Содержание α -токоферола в других органах лосей в нашем исследовании было сравнительно высоким. В литературе мы обнаружили лишь данные об уровне витамина в почках и сердце у северных оленей в Канаде (0,20 и 2,50 мкг/г ткани соответственно) [24].

В скелетной мышце исследованных нами лосей уровень α -токоферола варьировал в среднем от $3,72 \pm 1,38$ мкг/г ткани у сеголетков до $14,66 \pm 3,43$ мкг/г ткани у молодых самок. Кайзер с соавт. [26] установили, что содержание витамина Е в мышечной ткани лося Таймырской популяции составляет 4,53 мкг/г ткани. Сходные значения были получены для мышечной ткани благородных оленей, добытых в Европе (5,24–6,46 мкг/г ткани) [20], а также северных оленей в Швеции и Норвегии (4,47–5,67 мкг/г ткани) [17, 25]. В нашем исследовании у благородных оленей и маралов уровень витамина в среднем составлял $1,75 \pm 0,38$ и $1,34 \pm 0,13$ мкг/г ткани соответственно. Сопоставимое содержание обнаружено у северных оленей в Канаде — 1,50 мкг/г ткани [24].

Таким образом, полученные нами данные по уровню витаминов А и Е у лосей, благородных оленей и маралов на северо-западе России согласуются со значениями, установленными для оленьих, обитающих в других регионах мира, в том числе и с более мягким климатом. Сравнительно низкое содержание витаминов в нашем исследовании было обнаружено у представителей рода *Cervus*. Возможно, это связано с тем, что естественная среда обитания благородного оленя и марала находится несколько южнее и характеризуется более благоприятными климатическими условиями и более разнообразной структурой фитоценозов. Хотя эти животные обладают экологической пластичностью и способны адаптироваться к низким температурам и высоте снежного покрова, глубина выше 70 см считается ограничивающим фактором их распространения [27]. Для лося этот фактор также является первостепенным, однако предельная высота снежного покрова составляет 90 см [28, 29]. При изучении особенностей зимнего питания благородного оленя в охотхозяйстве, которое проводилось за два года до нашего исследования, было выявлено негативное влияние существующей на тот момент численности животных на древесно-веточные корма, а именно — почти полная деградация поросли рябины, которая изначально являлась основной кормовой породой. Кроме того, наблюдались локальные массовые погрызы коры на рябине и ели, которые не были отмечены на следующий год после сокращения численности в результате отстрела части оленей в сезон охоты. Для марала такого отрицательного воздействия на растительность

обнаружено не было [4]. Поскольку благородный олень содержался в загоне с меньшей площадью, возможно, в определенный момент для него был превышен предел оптимальной плотности, что могло негативно сказаться на доступности и качестве естественных кормов. В то же время исследованные нами олени регулярно имели доступ к подкормке, а внешних признаков недостаточного кормления зафиксировано не было. Можно предположить, что сочетание таких факторов, как характерные для южной Карелии климатические условия (температура окружающей среды, фенологические особенности, глубина снежного покрова) и доступная благородным оленям и маралам кормовая база не способствовали накоплению у этих животных более значительных количеств витаминов А и Е. Однако, учитывая небольшую величину выборки исследованных представителей рода *Cervus*, этот вопрос требует дополнительного изучения.

Рацион лося, особенно зимний, менее разнообразен, чем у других оленьих, и в меньшей степени состоит из травянистых растений [7, 29]. Однако, благодаря лучшей адаптации лосей к потреблению более грубых кормов, которые труднее поддаются обработке зубами и ферментации в рубце, представители этого вида по сравнению с благородным оленем более устойчивы к ухудшению кормовой базы в холодный период года [30]. Морфологические особенности пищеварительного тракта лосей позволяют регулировать процессы удержания частиц корма и выхода их из рубца, а также процессы как рубцовой, так и кишечной ферментации и абсорбции, которые связаны с годовыми изменениями разнообразия кормовых растений и их частей [31]. Благодаря наличию в рубце сосочков площадь его внутренней поверхности у лося увеличена в 20 раз. Для сравнения, у северного оленя это значение составляет 4,8 раза [32]. Для лосей показаны циклические сезонные изменения величины поверхности слизистой оболочки рубца: зимой по сравнению с летом наблюдается снижение как количества сосочков (на 31%), так и их длины (на 25%). Летом поглощающая поверхность рубца у лосей увеличивается в гораздо большей степени, чем у крупного рогатого скота. В рубце жвачных происходит высвобождение витаминов из растительной матрицы, с которой они поступают в организм [11], начинается процесс образования ретинола и его эфирных форм из каротиноидов под влиянием симбиотических микроорганизмов [13], а также осуществляется трансформация липидов пищи (липолиз и биогидрогенизация), в результате чего изменяется их количество и состав [33]. Было показано, что в результате биогидрогенизации α -токотриенола в рубце происходит образование α -токоферола [34], который имеет преимущества перед другими формами витамина Е при связывании с α -токоферол-переносящим белком

в цитозоле гепатоцитов для дальнейшей транспортировки к месту сборки липопротеинов [14]. Из преджелудков жирные кислоты вместе с другими липидными компонентами корма, в том числе и жирорастворимыми витаминами, попадают в кишечник для всасывания и использования тканями организма [33]. Для лосей характерна большая, чем у других оленьих, длина толстой кишки (37–41% от общей длины кишечника), что свидетельствует о том, что ферментация в этом отделе кишечника играет жизненно важную роль в пищеварении у этих животных [35]. Пищеварительная система представителей этого вида приспособлена к максимально эффективному использованию кормовых ресурсов в наиболее благоприятный в отношении их разнообразия период года для увеличения массы тела и успешной зимовки. Перечисленные особенности строения желудочно-кишечного тракта лосей могут положительно влиять также на эффективность трансформации и всасывания каротиноидов и токоферолов корма.

В нашем исследовании не было обнаружено половых и возрастных различий в содержании витаминов А и Е у лосей. Исключение составил лишь уровень α -токоферола в почках у самок, который у молодых особей был значительно выше, чем у взрослых ($p < 0,05$). Сопоставимое с таким у молодых животных содержание витаминов у сеголетков связано, вероятно, с достаточно ранним становлением физиологической зрелости органов и систем лосей, что обеспечивается высокими темпами роста и активным метаболизмом [36]. В исследовании Сампелс с соавт. [17] также было обнаружено, что у северных оленей уровень ретинола не зависит ни от возраста, ни от пола, однако более высокое содержание α -токоферола в скелетной мышце было у телят по сравнению с взрослыми животными. Известно, что уровень витамина Е в тканях тесно связан с содержанием в них липидов [10], а с возрастом происходит их накопление [37]. Так, возрастное повышение содержания внутримышечного жира было обнаружено у благородного оленя [38] и лани [39]. В то же время авторы этих исследований установили, что у животных разного возраста несколько различался жирнокислотный профиль ткани: более высокое содержание ПНЖК было характерно для молодых особей. Поскольку витамин Е является ключевым незаменимым антиоксидантом, защищающим ПНЖК клеточной мембраны от повреждения [9], потребность в нем у молодых животных может быть увеличена.

Хотя значимые различия в содержании витамина Е между молодыми и взрослыми самками лосей были обнаружены только в почках, похожая картина наблюдалась также в легких, селезенке и скелетной мышце. Для самок лосей содержание жира в организме имеет большое значение в реализации репродуктивных функций и в то же время

тесно связано с физиологическим статусом животного. Возможность размножения в значительной степени зависит от содержания жира, при его уровне в организме ниже 6% наступление беременности маловероятно. На уровень жира сильное влияние оказывает лактация, жировые запасы у лактирующих самок могут быть на величину до 50% ниже, чем у нелактирующих [6]. Можно предположить, что более низкий уровень α -токоферола у взрослых самок связан с интенсивным расходом жира, а вместе с ним и витамина Е, в период лактации, которая ограничивает восстановление состояния тела в летний период.

В нашем исследовании обнаружено более низкое содержание ретинола у беременных самок лосей по сравнению со взрослыми небеременными, статистически значимыми различия были в сердце и легких ($p < 0,05$). Причиной, очевидно, является усиленное расходование витамина А, поскольку его биологически активная форма, ретиноевая кислота, играет важнейшую роль в процессе размножения, в том числе она необходима для эмбриогенеза и развития плода [40]. У крупного рогатого скота было установлено, что расщепление β -каротина до ретинола происходит в репродуктивных тканях [41], в желтом теле в середине овуляции активность трансформации этого каротиноида была в 2 раза выше, чем в кишечнике [42]. Процесс преобразования каротиноидов в витамин А строго регулируется и зависит от статуса витамина в организме [8]. В доступном зимой древесно-веточном корме содержание каротиноидов невелико [43]. В то же время самое высокое содержание каротина в хвое сосны и ели отмечается в холодный период года [44]. Следует отметить, что последствиями недостатка витамина А в организме в период беременности могут быть снижение упитанности и ослабление иммунитета, патологии родов и послеродового периода, рождение слабого нежизнеспособного потомства [46].

Дисперсионный анализ показал влияние района, в котором были добыты лоси, на содержание ретинола в печени ($F = 3,52$; $df = 6$; $\eta^2 = 34\%$; $p = 0,007$) и α -токоферола в сердце ($F = 3,75$; $df = 7$; $\eta^2 = 39\%$; $p = 0,004$). Наиболее высокий уровень витамина А в печени был характерен для животных из Беломорского района Карелии и Приозерского района Ленинградской области. В то же время у лосей из Беломорского района содержание витамина Е в сердце было наиболее низким, сравнительно высокие значения были установлены у животных, добытых в Лоухском, Кондопожском, Прионежском и Лахденпохском районах Карелии. Содержание ретинола в печени отражает запасы витамина А в организме, тогда как уровень α -токоферола в сердце связан прежде всего с его защитной функцией в кардиомиоцитах, клетках с высокой интенсивностью энергетических процессов и уязвимых к окислительным

повреждениям [46]. Географические различия в уровне витамина Е в мышечной ткани были обнаружены у северных оленей в Норвегии [47]. Поступление питательных веществ в организм прежде всего зависит от кормовой ценности растений, произрастающих в том или ином районе. Беломорский и Лоухский районы Карелии находятся в подзоне северной тайги, тогда как остальные вышеперечисленные районы — в подзоне средней тайги. Растительность северной тайги в основном представлена сосновыми лесами с меньшей долей еловых и березовых лесов, в средней тайге в структуре растительности сосновые и еловые леса представлены практически в равных пропорциях, доля березовых лесов, а также представленность трав и злаков выше, чем в северной тайге [48]. Основу зимнего рациона лося на северо-западе России составляют преимущественно осина, ива, сосна, рябина и береза, тогда как ель поедается редко [49]. В северных районах Карелии с невысокой долей лиственных насаждений, а также в зимний период предпочитаемыми биотопами для лося являются сосновые леса, преимущественно участки с обилием соснового подроста [49, 50]. Имеются особенности и в составе локальных фитоценозов. Так, значительные различия видовой структуры древесно-кустарниковой растительности в Лахденпохском и Сортавальском районах Карелии связаны с представленностью на этих территориях рябины, осины, сосны и ели [51]. Данных литературы о содержании каротиноидов и токоферолов в древесно-веточных кормах, которые произрастают в перечисленных выше районах, мы не обнаружили, это может быть перспективным направлением будущих исследований. Содержание витаминов в растениях зависит не только от генетических особенностей того или иного вида, но и от климатических и географических условий (температурный и световой режимы, количество осадков, тип почвы), в которых они произрастают [11]. Так, относительное содержание каротиноидов в растениях увеличивается с продвижением на север [52]. По содержанию каротина хвоя сосны несколько превосходит хвою ели, в отношении токоферола таких различий выявлено не было [44]. Витамин Е является важным антиоксидантом, обеспечивающим устойчивость растений к абиотическим стрессам, его уровень может изменяться при воздействии таких факторов, как экстремальные температуры и влажность, а также ультрафиолетовое излучение [53]. Еще одним фактором, влияющим на поступление питательных веществ в организм копытных, является плотность популяции. Высокая плотность может стать причиной конкуренции за биотопы с большим видовым разнообразием кормов [54]. Хотя лоси особенно хорошо приспособлены к зиме в северных широтах, сочетание высокой плотности и особенно суровых или

продолжительных зим может иметь драматические последствия для их выживаемости [55]. В исследуемом регионе наиболее высокие показатели учета лося регистрируются в северном и западном Приладожье, куда входят Сортавальский и Лахденпохский районы Карелии и Приозерский район Ленинградской области. Климатические условия на этой территории наиболее благоприятны, высокая степень антропогенной трансформации оказывает позитивное влияние на объем и разнообразие кормовой базы [1, 50]. Возможно поэтому лоси, добытые в Приозерском районе Ленинградской области, отличались высоким содержанием ретинола в печени, а животные из Лахденпохского района Карелии — сравнительно высоким уровнем α -токоферола в сердце.

Заключение

Таким образом, сравнивая полученные в нашем исследовании результаты по уровню ретинола и α -токоферола в органах и тканях у представителей семейства Cervidae с данными литературы, можно сделать вывод о достаточном поступлении этих витаминов с кормом в организм лося, что позволяет поддерживать сравнительно высокое содержание нутриентов даже в осенне-зимний период. Обнаруженные более низкие уровни витаминов у благородного оленя и марала могут быть связаны с сочетанием климатических и кормовых факторов и требуют дополнительного изучения с учетом условий содержания животных. Обнаружено, что на содержание ретинола и α -токоферола у лося оказывают влияние такие факторы, как физиологическое состояние (беременность) и район обитания. Результаты исследования могут быть применены при оценке состояния популяций крупных копытных на северо-западе России. Поскольку исследованные животные относятся к важнейшим ресурсным видам, сведения о содержании витаминов А и Е в их органах и тканях могут быть использованы при определении пищевой ценности получаемых от них продуктов питания.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Минприроды Республики Карелия М.Ю. Шиляеву и И.А. Бердникову за содействие в сборе биоматериала. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № FMEN-2022-0003). Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Для исследования не требовалось одобрение биоэтического комитета Института биологии Карельского научного центра РАН, поскольку биологический материал был получен от животных, добытых в результате легальной охоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панченко Д.В., Данилов П.И., Тирронен К.Ф. Состояние и использование популяций представителей семейства Оленьи (Cervidae) в Республике Карелия. *Труды КарНЦ РАН*. 2018;(4):105–114.
2. Jensen W.F., Rea R.V., Penner C.E., et al. A review of circumpolar moose populations with emphasis on Eurasian moose distributions and densities. *Alces*. 2020;56:63–78.
3. Панченко Д.В., Серова Л.М., Данилов П.И., Шакун В.В., Козорез А.И. О динамике численности лося на северной периферии ареала и в зоне экологического оптимума. *Принципы экологии*. 2020;(2(36)):60–70.
4. Белкин В.В., Панченко Д.В., Федоров Ф.В. Экологические последствия полувольного содержания копытных на Европейском Севере России. *Вестник Охотоведения*. 2018;15(4):251–255.
5. Parker K.L., Barboza P.S., Gillingham M.P. Nutrition integrates environmental responses of ungulates. *Funct. Ecol.* 2009;23(1):57–69.
6. Cook R.C., Cook J.G., Mech L.D. Nutritional condition of northern Yellowstone elk. *J. Mammal.* 2004;85(4):714–722.
7. Rodgers A.R., Baskin L., Herfindal I., Jensen W., Kuzyk G., Pekins P., Rolandsen C.M. Moose *Alces alces* (Linnaeus, 1758). *Deer of the World. Ecology, Conservation and Management*. Eds. M. Melletti and S. Focardi. Springer Cham; 2025: 753–788.
8. Green A.S., Fascetti A.J. Meeting the vitamin A requirement: the efficacy and importance of β -carotene in animal species. *Sci. World J.* 2016;2016(1):7393620.
9. Zingg J.M. Vitamin E: regulatory role on signal transduction. *IUBMB Life*. 2019;71(4):456–478.
10. Szewczyk K., Chojnacka A., Górnicka M. Tocopherols and tocotrienols – bioactive dietary compounds; what is certain, what is doubt? *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(12):6222.
11. Ballet N., Robert J.C., Williams P.E.V. *Vitamins in Forages. Forage evaluation in ruminant nutrition*. Eds. D.J. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford, and H.M. Omed. CAB International; 2000: 399–432.
12. Lashkari S., Panah F.M., Weisbjerg M.R., Jensen S.K. Formation of RRR- α -tocopherol in rumen and intestinal digestibility of tocopherols in dairy cows. *Anim. Nutr.* 2023;9(15):350–363.
13. Иванов А.А. Регуляция метаболизма ретиноидов у молочных коров за счет перорального назначения биоэлементов. *Известия ТСХА*. 2007;1:122–132.
14. Traber M.G. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J. Lipid Res.* 2013;54(9):2295–2306.
15. Meacci E., Chirco A., Garcia-Gil M. Potential vitamin E signaling mediators in skeletal muscle. *Antioxidants*. 2024;13(11):1383.
16. Stephenson T., Crouse J., Hundertmark K., Keech M. Vitamin E, selenium, and reproductive losses in Alaskan moose. *Alces*. 2001;37(1):201–206.
17. Sampels S., Wiklund E., Pickova J. Influence of diet on fatty acids and tocopherols in *M. Longissimus Dorsi* from reindeer. *Lipids*. 2006;41(5):463–472.
18. Rodríguez-Estival J., Taggart M.A., Mateo R. Alterations in vitamin A and E levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2011;60(2):361–371.
19. Dannenberger D., Nuernberg G., Nuernberg K., Hagemann E. The effects of gender, age and region on macro- and micronutrient contents and fatty acid profiles in the muscles of roe deer and wild boar in Mecklenburg-Western Pomerania (Germany). *Meat Sci.* 2013;94(1):39–46.
20. Soriano A., Sánchez-García C. Nutritional composition of game meat from wild species harvested in Europe. *Meat and Nutrition*. Ed. C.L. Ranabhat. Intech open; 2021:77–100.
21. Kalinina S.N., Ilyukha V.A., Komov V.T., Zaitseva I.A., Baishnikova I.V., Panchenko D.V., Antonova E.P. The mercury and low molecular-weight antioxidants levels in ungulates of the Republic of Karelia. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2024;60(2):515–525.
22. Клевезаль Г.А. *Принципы и методы определения возраста млекопитающих*. М.: Т-во науч. изд. КМК; 2007. 283 с.
23. Senoo H., Wake K., Wold H.L., Higashi N., Imai K., Moskaug J.O., Kojima N., Miura M., Sato T., Sato M., Roos N., Berg T., Norum K.R., Blomhoff R. Decreased capacity for vitamin A storage in hepatic stellate cells for arctic animals. *Comp. Hepatol.* 2004;3(Suppl. 1):S18.
24. Kuhnlein H.V., Barthet V., Farren A., Falahi E., Leggee D., Receveur O., Berti P. Vitamins A, D, and E in Canadian Arctic traditional food and adult diets. *J. Food Comp. Anal.* 2006;19(6–7):495–506.
25. Hassan A.A., Sandanger T.M., Brustad M. Level of selected nutrients in meat, liver, tallow and bone marrow from semi-domesticated reindeer (*Rangifer t. tarandus* L.). *Int. J. Circumpolar. Health*. 2012;19(71):17997.
26. Кайзер А.А., Беглецов О.А., Марцёха Е.В., Кайзер Г.А. Качественный состав мяса лося (*Alces a. pfizen-tayeri Zukowski*) Таймырской популяции. *Достижения науки и техники АПК*. 2013;12:72–73.
27. Верещагин Н.К., Русаков О.С. *Копытные Северо-Запада СССР*. Л.: Наука; 1979. 309 с.
28. Формозов А.Н. *Снежный покров в жизни млекопитающих и птиц*. М.: Изд-во МГУ; 1990. 286 с.
29. Данилкин А.А. *Оленьи = (Cervidae): (Cervidae)*. М.: ГЕОС; 1999. 552 с.
30. Наумова Е.И., Жарова Г.К., Чистова Т.Ю., Данилкин А.А. Редукция растительных волокон в пищеварительном тракте лося и благородного оленя. *Известия РАН. Сер. Биол.* 2012;(5):521–528.
31. Hofmann R.R., Nygren K. Morphophysiological specialization and adaptation of the moose digestive system. *Alces*. 1992;(Suppl. 1):91–100.
32. Анненкова О.М. *Особенности морфологии и васкуляризации многокамерного желудка оленя северного (Rangifer tarandus) и лося европейского (Alces alces)*. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. СПб.: ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»; 2007. 185 с.
33. Lock A.L., Harvatine K.J., Drackley J.K., Bauman D.E. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. *Proc. Intermountain Nutr. Conf.* 2006; 85–100.
34. Lashkari S., Panah F.M., Weisbjerg M.R., Jensen S.K. Formation of RRR- α -tocopherol in rumen and intestinal digestibility of tocopherols in dairy cows. *Anim. Nutr.* 2023;15:350–363.
35. Hofmann R. R., Nygren K. Ruminant mucosa as indicator of nutritional status in wild and captive moose. *Alces*. 1992;(Suppl.1):77–83.

36. Кошурникова М.А., Домский И.А., Березина Ю.А., Экономов А.В. Биохимические показатели крови лосей (*Alces alces* Linnaeus, 1758) из разных половозрастных групп. *Сельскохозяйственная биология*. 2023;58(2):288–301.
37. Zhao L., Zou X., Feng Z., Luo C., Liu J., Li H., Chang L., Wang H., Li Y., Long J., Gao F., Liu J. Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. *Exp. Gerontol.* 2014;56:3–12.
38. Lorenzo J.M., Maggiolino A., Gallego L., Pareiro M., Perez Serano M., Dominguez R., Diaz A., Landete-Castillejos T., De Palo P. Effect of age on nutritional properties of Iberian wild red deer meat. *J. Sci. Food Agric.* 2019;99(4):1561–1567.
39. Volpelli L.A., Valusso R., Morgante M., Pittia P., Piasentier E. Meat quality in male fallow deer (*Dama dama*): Effects of age and supplementary feeding. *Meat Sci.* 2003;65(1):555–562.
40. Carazo A., Macáková K., Matoušová K., Krčmová L.K., Protti M., Mladěnka P. Vitamin A update: forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. *Nutrients*. 2021;13(5):1703.
41. Schweigert F.J. Research note: changes in the concentration of β -carotene, α -tocopherol and retinol in the bovine corpus luteum during the ovarian cycle. *Arch. Anim. Nutr.* 2003;57(4):307–310.
42. Sklan D. Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1983;53(1):23–26.
43. Левин Э.Д., Репях С.М. *Переработка древесной зелени*. М.: Лесн. пром-сть; 1984. 120 с.
44. Посметьев В.И., Макаренко А.В. Оценка целесообразности использования древесной зелени в народном хозяйстве. *Воронежский научно-технический вестник*. 2015;4(14):52–65.
45. Дарменова А.Г., Юсупов С.Р., Зухрабов М.Г. Состояние А-витаминного обмена и его влияние на воспроизводительную функцию коров. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2017;5(67):247–248.
46. Wallert M., Ziegler M., Wang X., Maluenda A., Xu X., Yap M.L., Witt R., Giles C., Kluge S., Hortmann M., Zhang J., Meikle P., Lorkowski S., Peter K. α -Tocopherol preserves cardiac function by reducing oxidative stress and inflammation in ischemia/reperfusion injury. *Redox Biol.* 2019;26:101292.
47. Hassan A.A., Sandanger T.M., Brustad M. Selected Vitamins and essential elements in meat from semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) in mid- and northern Norway: geographical variations and effect of animal population density. *Nutrients*. 2012;4(7):724–739.
48. Лукина Н.В., Орлова М.А., Бахмет О.Н., Тихонова Е.В., Тебенькова Д.Н., Казакова А.И., Крышень А.М., Горнов А.В., Смирнов В.Э., Шашков М.П., Ершов В.В., Князева С.В. Влияние растительности на характеристики лесных почв Республики Карелия. *Почвоведение*. 2019;(7):827–842.
49. Данилов П.И. *Охотничьи звери Карелии: экология, ресурсы, управление, охрана*. М.: Наука; 2005. 340 с.
50. Курхинен Ю.П., Данилов П.И., Ивантер Э.В. *Млекопитающие Восточной Фенноскандии в условиях антропогенной трансформации таежных экосистем*. М.: Наука; 2006. 208 с.
51. Шакун В.В., Панченко Д.В., Соловей И.А., Кришук И.А., Велигуров П., Машков Е., Ларченко А. Роль Оленьих (*Cervidae*) в формировании сосновых насаждений Европейской части южной тайги. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020;42(2):13–19.
52. Дымова О.В., Головки Т.К. 2019. Фотосинтетические пигменты в растениях природной флоры таежной зоны европейского северо-востока России. *Физиология растений*. 2019;66(3):198–206.
53. Ghosh U.K., Hossain M.S., Islam M.N., Khan M.A.R. Role of tocopherol in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Antioxidant Defense in Plants*. Eds. T. Aftab and K.R. Hakeem. Singapore: Springer; 2022:215–233.
54. Vikøren T., Kristoffersen A.B., Lierhagen S., Handeland K.A. Comparative study of hepatic trace element levels in wild moose, roe deer, and reindeer from Norway. *J. Wildl. Dis.* 2011;47(3):661–672.
55. Stubbsjøen T., Sæther B.-E., Solberg E.J., Heim M., Rolandsen C.M. Moose (*Alces alces*) survival in three populations in northern Norway. *Can. J. Zool.* 2000;78(10):1822–1830.

Поступила в редакцию 17.07.2025

После доработки 01.12.2025

Принята в печать 08.12.2025

RESEARCH ARTICLE

The level of retinol and α -tocopherol in *Cervidae* species (Mammalia, Cetartiodactyla) in the Northwest of Russia

I.V. Baishnikova* , I.A. Zaitseva , S.N. Kalinina , D.V. Panchenko , T.N. Ilyina 

*Institute of biology of Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences,
Pushkinskaya str. 11, Petrozavodsk, 185910, Russia*

*e-mail: iravbai@mail.ru

The content of vitamins in the body is one of the most important indicators reflecting the level of nutrition of large ungulate mammals living on the northern periphery of their range in conditions of limited access to food resources in the cold period of the year. In this work, the content of retinol (vitamin A) and α -tocopherol (vitamin E) in the organs and tissues of wild

moose (*Alces alces*) of different ages and sexes, as well as European red deer (*Cervus elaphus*) and maral (*C. e. sibiricus*) kept in semi-free conditions in the Northwest of Russia (Republic of Karelia and Leningrad Region) was studied. Biological material was collected from animals harvested because of legal hunting during the hunting season from October to January. The level of vitamins in the studied animals was generally consistent with the values established for cervids living in other regions of the world, including those with a milder climate. Relatively low vitamin content identified in species of the genus *Cervus* warrants further investigation. In moose, no sex- or age-related differences were found in the content of vitamins A and E, except for a lower level of α -tocopherol in the kidneys of adult females compared to young ones. Pregnant females had a comparatively low retinol content in the examined organs and tissues. The effect of the region in which the moose were hunted on the content of retinol in the liver and α -tocopherol in the heart was found, which may be due to the natural and climatic features of the study areas, which determine the composition of phytocenoses and the forage nutritive value. The results obtained can be used to assess the status of large ungulates and their population level management plans.

Keywords: *retinol, α -tocopherol, cervids, moose, red deer, periphery of the range, adaptation*

Funding: This study was performed under the state assignment of Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (FMEN-2022-0003).

Сведения об авторах

Баишникова Ирина Валерьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск. Тел.: (8142)57-31-07; e-mail: iravbai@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5064-3731>

Зайцева Ирина Алексеевна — аспирант 2 курса, ведущий биолог лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск. Тел.: (8142)57-31-07; e-mail: ira.irmita@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6277-009X>

Калинина Светлана Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск. Тел.: (8142)573107; e-mail: cvetnick@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1906-092X>

Панченко Данила Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории зоологии Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск. Тел.: (8142)57-31-07; e-mail: danja@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1955-4196>

Ильина Татьяна Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск. Тел.: (8142)57-31-07; e-mail: ilyinatn59@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8708-7775>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 578.2+578.53

Обнаружение и молекулярный анализ вируса мягкой зеленой мозаики табака на пионе *Paeonia wittmanniana*

Е.В. Моцарь¹, А.А. Шевелева¹, Ф.С. Шарко² , А.П. Михайленко¹ , С.Н. Чирков¹, *

¹Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Вирус мягкой зеленой мозаики табака (tobacco mild green mosaic virus, TMGMV, род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*) обнаружен на новом растении-хозяине — пионе *Paeonia wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. Вирус выявлен в Ботаническом саду МГУ имени М.В. Ломоносова при анализе вирома пиона Виттмана с симптомами морщинистости на листьях. В результате метатранскриптомного секвенирования был собран вирусспецифический контиг длиной 6331 нуклеотид. Он представлял собой почти полную последовательность генома TMGMV, содержал четыре открытые рамки считывания, типичные для тобамовирусов, и оказался близкородственным (99,2% идентичности) изоляту TMGMV из табака *Nicotiana glauca* (MT675965). Присутствие вируса в растении пиона было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с вирусспецифическими праймерами, разработанными на основе полногеномной последовательности пионового изолята TMGMV. Биологическое тестирование также показало наличие вируса в анализируемом растении пиона. В результате механического заражения *N. benthamiana* экстрактом из зараженного пиона в инокулированных растениях развивалась бессимптомная системная инфекция TMGMV. При инокуляции листьев табака *N. glutinosa* экстрактом из зараженных растений *N. benthamiana* на них образовывались мелкие локальные некрозы, типичные для TMGMV. Это первое обнаружение TMGMV на пионе в России, что расширяет круг природных растений-хозяев этого вируса, список вирусов, заражающих пион, и информацию о географической распространенности TMGMV.

Ключевые слова: пион, *Paeonia wittmanniana*, виром, тобамовирус, tobacco mild green mosaic virus, высокoproизводительное секвенирование, растения-индикаторы вирусов

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-3

Пион (*Paeonia* spp.) — одно из самых распространенных декоративных растений. Благодаря крупным, ароматным и ярким цветкам, разнообразию видов, простоте культивирования и способности сохранять декоративность в течение длительного времени, пионы широко используются в ландшафтном дизайне, они также популярны как цветы на срезку. Кроме того, пион известен как лекарственное растение, поскольку цветки, листья и семена травянистых и древовидных пионов содержат большое количество различных биологически активных веществ с выраженным терапевтическим действием [1, 2].

Грибные, бактериальные и вирусные болезни снижают декоративную ценность пионов и ограничивают возможность комплексного использования их растительных ресурсов [3]. На сегодняш-

ний день на различных видах и сортах пиона во всем мире обнаружено 14 вирусов с положительным РНК-геномом из семейств *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Secoviridae* и *Virgaviridae*, а также вирус бронзовости томатов (tomato spotted wilt virus) из семейства *Tospoviridae*, геном которого представлен однополой РНК отрицательной полярности [4, 5]. Наиболее частыми проявлениями вирусных инфекций являются мозаика, линейные узоры и хлороз на листьях, а также скручивание и другие виды деформации листовой пластинки. Некоторые вирусы вызывают задержку роста и образование галлов на корнях. Вегетативное размножение позволяет сохранять сортовые качества пионов, но, в то же время, способствует эффективной передаче вирусов потомству и их накоплению в ряду поколений.

В июне 2023 г. при обследовании коллекции пионов в Ботаническом саду МГУ имени М.В. Ломоносова было обнаружено растение пиона *P. wittmanniana* с симптомами морщинистости на листьях. При высокопроизводительном секвенировании (high-throughput sequencing, HTS) тотальной РНК из этого растения были получены прочтения, родственные вирусу мягкой зеленой мозаики табака (tobacco mild green mosaic virus, TMGMV, род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*). Род *Tobamovirus*, самым известным представителем которого является вирус табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV), включает около сорока видов вирусов с вирионами палочковидной формы и однонитевой молекулой геномной РНК длиной 6,3–6,6 kb. 5'-конец РНК кэпирован, а 3'-конец организован в тРНК-подобную структуру. РНК содержит четыре открытых рамки считывания (open reading frame, ORF). ORF1 транслируется непосредственно с геномной РНК с образованием вирусной репликазы, включающей домены метилтрансферазы (methyltransferase, MTR) и хеликазы (helicase, HEL). При сквозном прочтывании («readthrough») рибосомой терминирующего кодона ORF1 возникает ORF2, которая, в дополнение к упомянутым доменам, кодирует вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу. ORF3 и ORF4 кодируют, соответственно, транспортный белок (movement protein, MP) и белок оболочки (coat protein, CP). MP и CP транслируются с субгеномной РНК. От растения к растению тобамовирусы распространяются главным образом при механическом контакте зараженного растения со здоровым,

однако для ряда вирусов важную роль играют передача через семена и насекомыми-опылителями [6].

Целью данной работы являлись сборка и анализ полного генома пионового изолята TMGMV.

Материалы и методы

Растение пиона *P. wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. с симптомами морщинистости на листьях (рис. 1А) было обнаружено в Ботаническом саду МГУ имени М.В. Ломоносова в июне 2023 г. Задержка образования бутонов на этом растении была еще одним из возможных симптомов вирусной болезни.

Тотальную РНК экстрагировали из свежих листьев, используя метод, основанный на применении детергента цетилтриметиламмония бромида (cetyltrimethylammonium bromide, СТАВ) [7]. Приблизительно 150 мг листовой ткани растирали в ступке в 1 мл предварительно нагретого (65°C) СТАВ-буфера, содержащего 20 мкл 2-меркаптоэтанола, и обрабатывали хлороформом/изоамиловым спиртом для получения осветленного водного экстракта нуклеиновых кислот, как описано ранее [7]. К супернатанту добавляли сухой LiCl до конечной концентрации 3 М [8] и оставляли на ночь при температуре -10...-15°C. На следующее утро нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 18200×g при 4°C в течение 30 мин. Осадок растворяли в 100 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Качество и концентрацию полученной РНК определяли на спектрофотометре Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Препараты РНК хранили при температуре -70°C до использования.

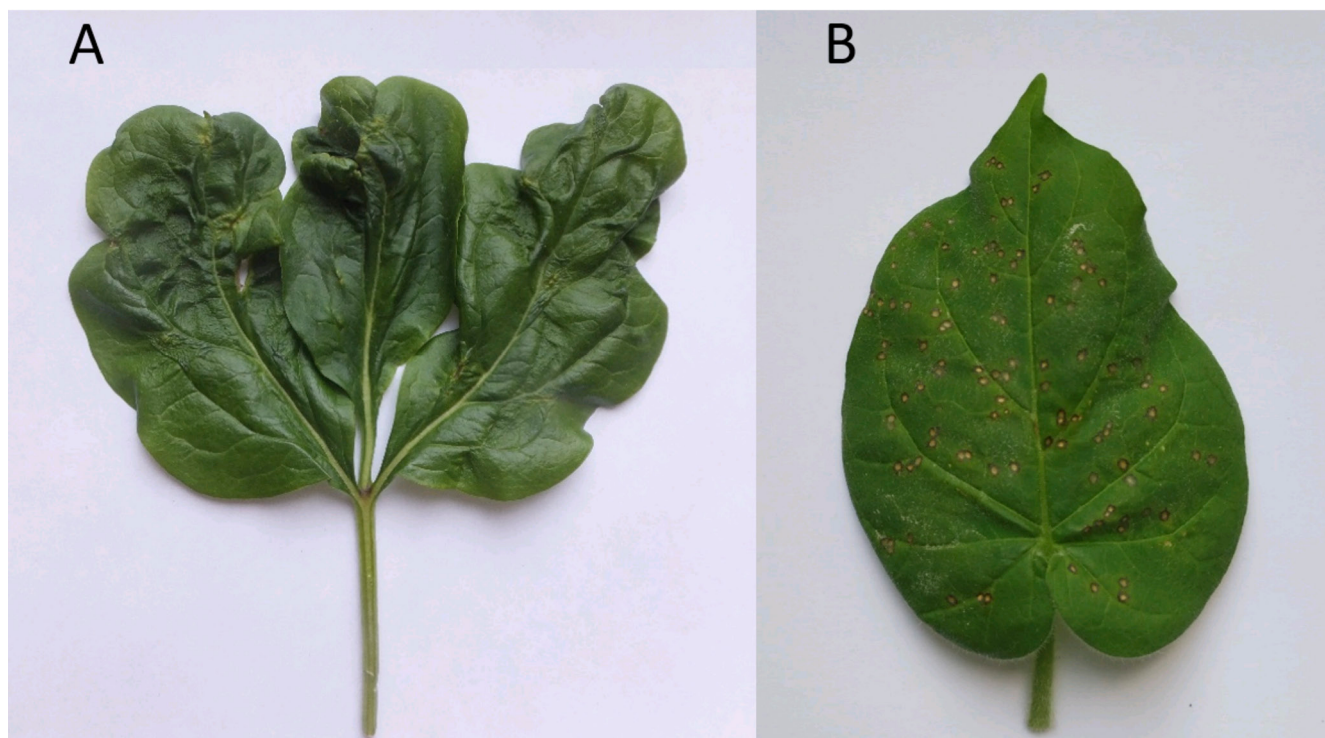


Рисунок. Морщинистость на листьях *Paeonia wittmanniana* (А) и местные некрозы на листе *Nicotiana glutinosa* (В), зараженных вирусом мягкой зеленой мозаики табака (tobacco mild green mosaic virus).

Библиотеки кДНК синтезировали на матрице тотальной РНК с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant kit (Illumina, США) и секвенировали на платформе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США) в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт». Полученные парноконцевые прочтения размером 150 нуклеотидов (нт) обрезали и фильтровали по качеству с помощью FastQC v.0.12 и fastp v.0.23.4 [9], используя настройки по умолчанию. Контиги собирали *de novo* с помощью программы metaSPAdes v.3.15 [10]. Вируспецифические контиги идентифицировали с помощью NCBI BLASTn v.2.15.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, дата обращения 12 февраля 2025 г.) и базы данных NCBI core nt (core_nt) с пороговым значением $E=1e-05$. Отфильтрованные прочтения картировали на контиг TMGMV с помощью программы Bowtie2 v.2.4.4 [11].

Тотальную РНК использовали также для выявления TMGMV в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Первую нить кДНК синтезировали с помощью случайных гексамерных праймеров и обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (Moloney murine leukemia virus, MMLV, Evrogen, Россия). В ПЦР использовали ДНК-полимеразу Encyclo (Evrogen, Россия) и вируспецифические праймеры PnW-GM-F/R (5'-GACGAGTCTATCGCGTCATCGA-3'/5'-AAGTGGACGAACAACCACTGCTGAT-3'), разработанные на основе полноразмерной последовательности генома TMGMV, определенной в этой работе. Условия проведения ПЦР включали начальную денатурацию при 94°C в течение 3 мин, за которой следовали 35 циклов амплификации (денатурация 94°C – 30 с, отжиг 56°C – 30 с, элонгация 72°C – 50 с) и окончательную достройку продуктов ПЦР при 72°C в течение 7 мин. РНК из бессимптомных растений пиона служила отрицательным контролем. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий, и фотографировали с помощью прибора MultiDoc-It (Analytik Jena US LLC, США). Ампликон ожидаемого размера выделяли из агарозного геля с помощью набора BC022 (Evrogen, Россия) и секвенировали методом Сэнгера в обоих направлениях на фирме Evrogen.

ORF в вируспецифическом контиге идентифицировали с помощью программы NCBI ORFfinder (<https://ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>, дата обращения 3 марта 2025 г.). Консервативные домены в вирусных белках картировали с использованием базы данных NCBI Conserved Domain Database (CDD, <https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, дата обращения 3 марта 2025 г.). Для анализа вновь собранного генома TMGMV использовали доступные в GenBank полные геномы изолятов

этого вируса из других растений-хозяев. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма ClustalW, встроенного в программу MegAlign программного пакета DNASTar Lasergene (версия 15) [12]. Полученные выравнивания использовали для определения нуклеотидной идентичности вирусных изолятов.

Для биологического тестирования использовали два вида растений-индикаторов – табаки *Nicotiana benthamiana* и *N. glutinosa*, первое из которых заражается TMGMV системно, а второе реагирует образованием местных некрозов на листьях [13]. Навеску листа пиона с симптомами болезни растирали в ступке с водой в соотношении 1:15 (вес/объем). Неосветленный экстракт использовали для механической инокуляции листьев среднего яруса растений *N. benthamiana* в возрасте 8–10 листьев с целитом в качестве абразива. Через 10–14 сут после инокуляции тестировали TMGMV в верхних неинокулированных листьях с помощью ОТ-ПЦР, как описано выше. Растения *N. glutinosa* заражали аналогичным образом, используя в качестве инокулята водный экстракт листьев *N. benthamiana*, инфицированных TMGMV.

Результаты

В результате HTS было получено 51144034 парноконцевых прочтения длиной 150 пар нуклеотидов (п.н.), которые были использованы для сборки контигов *de novo* с помощью программы metaSPAdes. С помощью BLASTn был обнаружен единственный вируспецифический контиг длиной 6331 нт, близкородственный (идентичность 99,2%) изоляту TMGMV из растений табака *N. glauca* (MT675965). На собранный контиг картировалось 6137 прочтений, которые покрывали 97,9% вирусного генома. Средняя глубина покрытия генома составила 11,9×.

С помощью программы NCBI ORFfinder в контиге были выявлены четыре ORF. ORF1 (нуклеотидные позиции 47–3382) кодирует вирусный белок массой 125,8 кДа, содержащий домены MTR и HEL. ORF2 (47–4876) кодирует, кроме того, РНК-зависимую РНК-полимеразу семейства Virgaviridae. ORF3 (4866–5636) частично перекрывается с 3'-концом ORF2 и кодирует МР массой 28,4 кДа, принадлежащий к 30К-суперсемейству МР. ORF4 (5642–6121) отделена от ORF3 интервалом в 5 нт и кодирует СР массой 17,6 кДа, относящийся к суперсемейству белков оболочки TMV. Нетранслируемые 5'- и 3'-участки генома состоят из 46 нт и 210 нт соответственно. Полученные данные показывают, что контиг длиной 6331 нт является, по-видимому, почти полной последовательностью генома пионового изолята TMGMV, названного PnW. Эта последовательность была депонирована в GenBank под номером PX242201.

Зараженность пиона TMGMV была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР. Вирусспецифические праймеры PnW-GM-F/R амплифицировали полностью ген СР вместе с фланкирующими последовательностями и генерировали ампликон ожидаемого размера 610 п.н. Его нуклеотидная последовательность была идентична соответствующей области генома, определенной с помощью HTS. Другим подтверждением присутствия TMGMV в растении пиона явились результаты биологического тестирования на лабораторных растениях-индикаторах. TMGMV из пиона механически передавался на *N. benthamiana*, что приводило к системному заражению инокулированных растений этим вирусом. Инфекция была бессимптомной, но TMGMV выявлялся с помощью ОТ-ПЦР как в инокулированных, так и в неинокулированных листьях верхних ярусов. На листьях табака *N. glutinosa* после их инокуляции водным экстрактом из растения *N. benthamiana*, зараженного TMGMV, через 3–4 сут образовывались мелкие местные некрозы (рис. 1Б), типичные для этого вируса [13]. Перенести вирус непосредственно с пиона на *N. glutinosa* не удалось — возможно, из-за низкого содержания TMGMV в пионе.

В виrome анализируемого пиона не было обнаружено значимых последовательностей других вирусов. Это позволяет предположить, что морщинистость и задержка цветения могут быть связаны с заражением TMGMV. В пользу этой версии говорит и тот факт, что у восьми других пионов Виттмана, произрастающих в Ботаническом саду МГУ, морщинистость на листьях не обнаружена и результаты их тестирования на TMGMV с помощью ОТ-ПЦР оказались отрицательными.

Обсуждение

Экспозиции Ботанического сада МГУ представлены тысячами дикорастущих видов и культурных сортов травянистых, кустарниковых и древесных растений умеренного пояса со всех континентов. При визуальном осмотре на многих растениях регулярно выявляются характерные признаки вирусных болезней, такие как мозаика, хлоротическая и кольцевая пятнистость, деформация листовой пластинки, морщинистость, карликовость и другие симптомы. Можно предположить, что насаждения Ботанического сада являются не только источником биоразнообразия живых растений, но и резерватом заражающих их вирусов из различных регионов мира.

В данной работе на пионе *P. wittmanniana* выявлен TMGMV, секвенирован и охарактеризован почти полный геном этого вируса. Вирус был обнаружен при метатранскриптомном анализе симпоматичного растения пиона и подтвержден с помощью ОТ-ПЦР и биологическими тестами на растениях-индикаторах. Это первое обнаруже-

ние TMGMV на пионе в России, что расширяет круг природных хозяев этого вируса, список вирусов, заражающих пион, и информацию о географической распространенности TMGMV.

TMGMV был впервые найден в растениях табака *N. glauca* на Канарских островах почти столет назад [14]. В настоящее время TMGMV выявлен в Северной и Южной Америке, Индии, Китае, Юго-Восточной Азии, Австралии, на Ближнем и Среднем Востоке, в Средиземноморском бассейне, Африке, Западной и Центральной Европе [15]. В данной работе этот вирус впервые обнаружен в России.

TMGMV обладает самым широким спектром хозяев среди тобамовирусов, заражая 73 вида однодольных и двудольных растений из 23 семейств [16]. На пионе вирус обнаружен впервые.

Известно, что изоляты TMGMV из разных видов растений и разных местообитаний генетически очень близки. Предполагается, что вирус не нуждается в адаптации к новому хозяину для его заражения [15, 16]. Геном пионового изолята PnW практически идентичен геному TMGMV из табака *N. glauca*, что, по-видимому, свидетельствует в пользу высказанной гипотезы. Вместе с тем накопление вируса в разных видах растений варьирует в широких пределах, достигая максимальных значений у представителей семейства Solanaceae. В растениях других видов TMGMV может накапливаться в значительно меньших количествах [16].

Обнаружение пионового изолята TMGMV расширяет список известных вирусов пиона. Раньше на этой культуре был описан другой представитель семейства Virgaviridae — вирус погremoковости табака (tobacco rattle virus, TRV) [17]. TRV и TMGMV принадлежат к роду *Tobravirus* и к роду *Tobamovirus* соответственно, и отличаются структурой генома.

TMGMV, как и другие тобамовирусы, легко передается механически, например, при соприкосновении с зараженным растением, садовым инвентарем или при контакте вирусных частиц, находящихся в почве, с корнями растений [13]. Частицы тобамовирусов отличаются очень высокой стабильностью и могут годами сохранять инфекционность во внешней среде [16]. По этой причине вирус может представлять потенциальную опасность для окружающих растений разных видов и в первую очередь, очевидно, для других пионов. Коллекция пионов в Ботаническом саду МГУ насчитывает свыше 300 сортов, а также 18 видов и подвидов, многие из которых включены в Красную книгу Российской Федерации [18]. Возможность их заражения TMGMV еще предстоит определить, хотя визуальный осмотр коллекции не выявил симптомов морщинистости листьев на других видах и сортах пиона.

Результаты работы могут способствовать оздоровлению коллекций Ботанического сада от ви-

русных болезней путем искоренения зараженных растений и/или оздоровления наиболее ценных экземпляров биотехнологическими методами, основанными на вычленении апикальной меристемы, термотерапии и применении ингибиторов вирусов *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li P., Shen J., Wang Z., Liu S., Liu Q., Li Y., He C., Xiao P. Genus *Paeonia*: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, clinical application, and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* 2021;269(4):113708.
2. Rodgers A. *Peonies*. Portland, OR: Timber Press, Inc.; 2000. 384 pp.
3. Garfinkel A.R., Chastagner G.A. Disease of peonies. *Handbook of Florists' Crop Diseases*. Eds. R.J. McGovern, W.H. Elmer. Springer International Publishing AG; 2018: 663–691.
4. Lu W., Hong C., Huang Z., Zhao G., Liang Y., Gao H. Virus diseases of peonies. *Horticulturae*. 2025;11(5):517.
5. Shaffer C. *The Virome of Peony and the Population Structure of Its Most Prominent Viruses*. Fayetteville: University of Arkansas; 2020. 74 pp.
6. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. URL: <https://ictv.global/report/chapter/virgaviridae/virgaviridae/tobamovirus> (дата обращения 29.08.2025).
7. Bonilla F.R., Cieniewicz E. Distribution and diversity of prunus necrotic ringspot virus, prune dwarf virus, and peach latent mosaic viroid in wild *Prunus* spp. in South Carolina and Georgia. *PhytoFrontiers*. 2022;2(4):363–370.
8. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 2008;19(6):520–525.
9. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884–i890.
10. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017;27(5):824–834.
11. Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012;9(4):357–359.
12. Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 132. Eds. S. Misener and S.A. Krawetz. N.J.: Humana; 2020:71–91.
13. Wetter C. Tobacco mild green mosaic virus. *The Plant viruses*. Eds. M.H.V. Van Regenmortel, H. Fraenkel-Conrat. N.Y.: Plenum Press; 1986: 205–219.
14. McKinney H.H. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 1929;39:577–578.
15. de Andrés-Torán R., Guidoum L., Zamfir A.D., Mora M.A., Moreno-Vázquez S., García-Arenal F. Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV) isolates from different plant families show no evidence of differential adaptation to their host of origin. *Viruses*. 2023;15(12):2384.
16. Zamfir A.D., Babalola B.M., Fraile A., McLeish M.J., García-Arenal F. Tobamoviruses show broad host ranges and little genetic diversity among four habitat types of a heterogeneous ecosystem. *Phytopathology*. 2023;113(9):1697–1707.
17. Garfinkel A.R., Steinlage T., Chumley J., Chastagner G.A. *Tobacco Rattle Virus in Peonies: A Reference Guide for Cut Flower and Rootstock Producers*; Washington: Washington State University; 2017. 10 pp.
18. Ефимов С.В., Дегтярева Г.В. Коллекция пионов в Ботаническом саду МГУ: пример взаимодействия между фундаментальными и прикладными направлениями исследований. *Лесной вестник / Forestry Bulletin*. 2018;22(2):47–54.

Поступила в редакцию 05.09.2025

После доработки 30.11.2025

Принята в печать 01.12.2025

RESEARCH ARTICLE

Detection and molecular characterization of tobacco mild green mosaic virus on the peony *Paeonia wittmanniana*

E.V. Motsar¹, A.A. Sheveleva¹, F.S. Sharko² , A.P. Mikhailenko¹ , S.N. Chirkov^{1,*} 

¹Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²National Research Center “Kurchatov Institute,” Academician Kurchatov Square 1, Moscow, 123182, Russia

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*) was detected for the first time on a new host plant, the peony *Paeonia wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. The virus was found in the Botanical Garden of Lomonosov Moscow State University when studying the virome of a peony plant with wrinkling symptoms on the leaves using high-

throughput sequencing. A virus-specific contig with a length of 6331 nucleotides was assembled. It represented a nearly complete sequence of the TMGMV genome, contained four open reading frames typical of tobamoviruses, and was most closely related (99.2% identity) to the TMGMV isolated from tobacco *Nicotiana glauca* (MT675965). The presence of the virus in the peony was confirmed by RT-PCR using virus-specific primers designed based on the whole genome sequence of the TMGMV peony isolate. Biological testing also revealed the presence of the virus in the analyzed plant. Mechanical inoculation of *N. benthamiana* by water extract from infected peony resulted in asymptomatic systemic TMGMV infection in inoculated plants. When *N. glutinosa* leaves were inoculated with an extract from infected *N. benthamiana* plants, small necrotic local lesions typical of TMGMV formed on them. This is the first report of TMGMV from peony in Russia, expanding the natural host range of this virus, adding the list of viruses infecting peonies and information on the geographical TMGMV distribution.

Keywords: *peony, Paeonia wittmanniana, virome, tobamovirus, tobacco mild green mosaic virus, high-throughput sequencing, virus indicator plants*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project No. 23-16-00032.

Сведения об авторах

Моцарь Елена Валериевна — аспирант кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: elena.motsar31@gmail.com

Шевелева Анна Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: anncsh@yandex.ru

Шарко Федор Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории палеогеномики НИЦ «Курчатовский институт». Тел: 8-499-196-71-00 доб. 7937; e-mail: fedosic@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1189-5597>

Михайленко Андрей Петрович — вед. инженер ботанического сада биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-9395503; e-mail: caelifera@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2328-0538>

Чирков Сергей Николаевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: s-chirkov1@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1353-4373>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.085.23

**Структура коллагенового матрикса
мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика:
влияние условий культивирования**

**Э.С. Кочетова^{1, 2} , Д.К. Матвеева¹ , А.Э. Мелик-Пашаев¹ ,
Ю.А. Романов^{3, 4} , С.В. Буравков^{1, 5} , Е.Р. Андреева^{1, *}**

¹*Институт медико-биологических проблем, Российская академия наук,
Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское ш., д. 76А;*

²*Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

³*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России,
Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а;*

⁴*ООО «Криоцентр», Россия, 117198, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4;*

⁵*Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1*

**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Внеклеточный матрикс (ВКМ), синтезируемый мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (МСК), играет ключевую роль в регуляции клеточного микроокружения и используется в разработке биоматериалов для регенеративной медицины. В настоящей работе проведена оценка влияния факторов, определяющих продукцию ВКМ, на геометрические параметры, структуру и продукцию коллагеновых волокон МСК из ткани пупочного канатика человека (МСК-ТПК). Исследовано влияние покрытия культуральных поверхностей желатином, продолжительности культивирования, концентрации фетальной бычьей сыворотки, а также добавок, стимулирующих продукцию ВКМ, — 2-фосфо-L-аскорбата натрия и каррагинана — на структуру коллагенового каркаса ВКМ и относительное содержание коллагеновых белков. Оптимальные условия включали культивирование МСК-ТПК на желатиновом покрытии в течение 11 сут в среде α -МЕМ с 10% фетальной бычьей сывороткой и добавлением аскорбата (50 мкМ). Эти параметры обеспечивали высокую адгезию, сохранность и отсутствие отслоений клеточного пласта, а также формирование коллагеновой сети ВКМ. Морфометрический анализ показал, что коллагеновый каркас ВКМ, полученный в таких условиях, характеризуется равномерным распределением, увеличением сонаправленности и числа пересечений волокон, сниженной лакуарностью и выраженной анизотропностью структуры. Относительное содержание коллагеновых белков было значимо выше, чем при других вариантах культивирования. Полученные данные позволяют рекомендовать разработанный протокол как эффективную и воспроизводимую платформу для получения биомиметических ВКМ, пригодных для задач клеточной инженерии и тканевой терапии.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, пупочный канатик человека, децеллюляризованный внеклеточный матрикс, коллагеновые волокна, гистохимия, световая микроскопия, анализ изображений, колориметрия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-8

Динамическая трехмерная сеть макромолекул — внеклеточный матрикс (ВКМ) — является важнейшим компонентом микроокружения клеток, обеспечивая структурную поддержку и играя ключевую регуляторную функцию в тканевом гомеостазе [1]. ВКМ модулирует механическую сигнализацию через интегриновые рецепторы, что определяет процессы пролиферации, миграции и, что особенно важно, дифференцировки клеток, поддерживая их мультипотентность [2, 3]. Мульт-

типотентные мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) и их дифференцированные потомки обеспечивают продукцию основного количества ВКМ в организме. Исследования показывают, что децеллюляризованный ВКМ (дцВКМ), полученный от МСК, значительно эффективнее для стимуляции пролиферации вновь заселенных МСК, формирования колоний и трехлинейной дифференцировки (адипо-, остео-, хондрогенной), чем стандартный пластик, а также от-

дельные компоненты матрикса [4]. В связи с этим ВКМ, продуцируемый МСК, рассматривается как перспективный природный биоматериал для тканевой инженерии и регенеративной медицины, в том числе — для восстановления кожи, костной и хрящевой тканей, где коллагеновый каркас определяет ключевые механические и биохимические свойства конструкта [1, 5, 6]. Оптимизация протоколов получения функционального дцВКМ, имитирующего физиологическое микроокружение, является необходимым этапом в контексте использования ВКМ для клеточной и тканевой инженерии [6].

Среди клеточных источников ВКМ особый интерес представляют МСК из ткани пупочного канатика (МСК-ТПК), характеризующиеся высокой пролиферативной активностью и минимальной иммуногенностью [7]. Эффективность синтеза и свойства ВКМ зависят от условий культивирования: покрытия культуральной поверхности, состава среды, присутствия индукторов синтеза компонентов матрикса, плотности посева и времени культивирования [8].

В настоящей работе охарактеризовано влияние ряда параметров культивирования на геометрию и сложность структуры коллагенового каркаса, а также предложено оптимальное сочетание условий для стимуляции продукции коллагеновых белков ВКМ, продуцируемого МСК-ТПК.

Материалы и методы

Культивирование клеток. В работе использовали МСК, выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека. Клеточный материал был предоставлен ООО «КриоЦентр» в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве от 18 января 2024 г. Протоколы экспериментов одобрены Комиссией Института медико-биологических проблем РАН по медицинской биоэтике (550/МСК от 22 июля 2020 г.). В работе использовали МСК-ТПК, полученные из трех образцов ткани пупочного канатика. МСК валидировали в соответствии с минимальными критериями Международного общества клеточной терапии (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT) [9]. Фенотип клеток подтвержден методом проточной цитометрии: экспрессия CD90 (99,95%), CD105 (99,87%) и CD73 (99,94%). Потенциал дифференцировки был подтвержден по уровню активности щелочной фосфатазы при остеогенной дифференцировке и накоплению липидных капель при адипогенной дифференцировке. Клетки культивировали в среде α -MEM (Corning, Мексика), дополненной фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (Corning, Мексика), L-глутамином (292 мкг/мл; ПанЭко, Россия) и антибиотиками (пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл; ПанЭко, Россия). При рутинном пассировании начальная плот-

ность составляла 3–3,5 тыс. клеток/см², с заменой среды каждые 72–96 ч. В работе использовали клетки 2–5 пассажей.

Для экспериментов с ВКМ МСК-ТПК высевали с плотностью 7,5 тыс. клеток/см² и культивировали в стандартной среде роста (α -MEM + 10% ФБС) в течение 7, 11 и 14 сут. Параллельно оценивали влияние покрытия чашек Петри 0,1%-ным раствором желатина (Sigma, США) на качество адгезии клеточного пласта и сохранность ВКМ.

Модификация состава среды. В рамках оптимизации протокола использовали концентрацию ФБС 1%, 5% и 10%. К части МСК-ТПК в предконфлюэнтной фазе добавляли 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka, Германия) для стимуляции продукции коллагена и/или 10 мкг/мл каррагина (Fluka, США) для загущения среды; МСК-ТПК группы контроля культивировали в стандартной среде роста.

Децеллюляризация. Для удаления МСК-ТПК добавляли 0,25%-ный раствор Triton X-100 (Sigma, США) в изотоническом фосфатном буфере (ФБ) (pH 7,2), содержащий 20 мМ гидроксида аммония (NH₄OH; Реахим, Россия), и инкубировали 5 мин при 37°C, как описано ранее [10]. После промывки в ФБ (три раза по 5 мин) ВКМ инкубировали с ДНКазой I (50 Ед/мл; SciStore, Россия) 2 ч при 37°C.

Микроскопия и колориметрический анализ. Визуальную оценку целостности пластов и распределения коллагеновых волокон проводили после окраски 0,1%-ным раствором Sirius Red F3BA (Sigma, США) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты. Клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре, отмывали от красителя дистиллированной водой и изучали в светлом режиме на микроскопе Nikon Eclipse TiU (Япония) или в стереомикроскопе ZEISS Stemi 2000-C (Германия; объектив 0,6×). Репрезентативные изображения окрашенных Sirius Red F3BA коллагеновых волокон представлены на рис. 1А.

Для полуколичественной оценки коллагеновых белков связанный Sirius Red элюировали раствором 0,1%-ного NaOH и 96%-ного C₂H₅OH (1:1, 200 мкл/лунка). Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре BioRad (США) при $\lambda = 550$ нм.

Нормализация данных колориметрии. Подсчет клеток проводили до децеллюляризации после окраски Crystal Violet в семи случайно выбранных полях зрения площадью 0,0177 см². Полученные значения использовали для расчета общего количества клеток на площадь чашки (8,7 см²). Далее данные колориметрического определения коллагеновых белков (Sirius Red) нормализовали на 10³ клеток и представляли в относительных единицах.

Обработка изображений. Для морфометрического анализа случайным образом выбирали три поля зрения в образце дцВКМ, окрашенном Sirius

Red F3BA (рис. 1А). В каждом случае использовано две биологические повторности. Затем в программах анализа изображения Matlab RunTime V9.5 (плагин CT-Fire V3.0 Beta [11]) и ImageJ 1.54f (плагины OrientationJ [12] и TWOMBLI_v1 [13]) получали маски (рис. 1Б), которые использовали для оценки геометрических параметров и сложности структуры коллагеновых волокон.

Статистический анализ. Использовали программу MS Excel 2013 (Microsoft Corp.) и GraphPad Prism 9.5.1. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). При множественных сравнениях применяли однофакторный дисперсионный анализ

(ANOVA) с последующим пост-хок-тестом Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Временная динамика продукции ВКМ на стандартном культуральном пластике и желатиновом покрытии. Целью этапа был выбор подходящих условий, позволяющих получить сохранные дцВКМ с максимальным содержанием и равномерным распределением фибрилл коллагеновых белков. На первом этапе исследования была проведена оптимизация сроков культивирования МСК-ТПК и покрытия дна чашек (рис. 2).

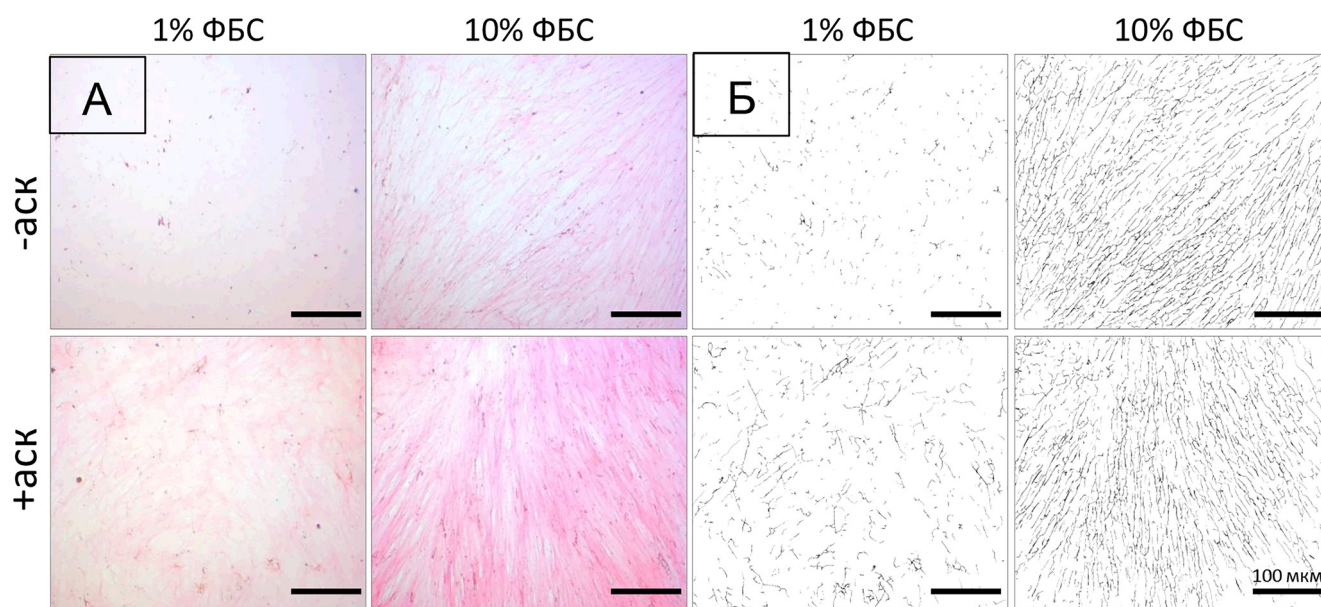


Рис. 1. Коллагеновые структуры в дцВКМ от МСК-ТПК. А – Репрезентативные изображения коллагеновых волокон, окрашенных Sirius Red, в децеллюляризованных клеточных пластах МСК-ТПК. Б – Репрезентативные маски, сформированные в плагине TWOMBLI программы ImageJ. Показаны коллагеновые структуры после культивирования в присутствии различных комбинаций ФБС (1% и 10%) и аскорбата натрия 50 мкМ (аск-/+). Масштабный отрезок – 100 мкм. Съемка выполнена с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse TiU (Япония).

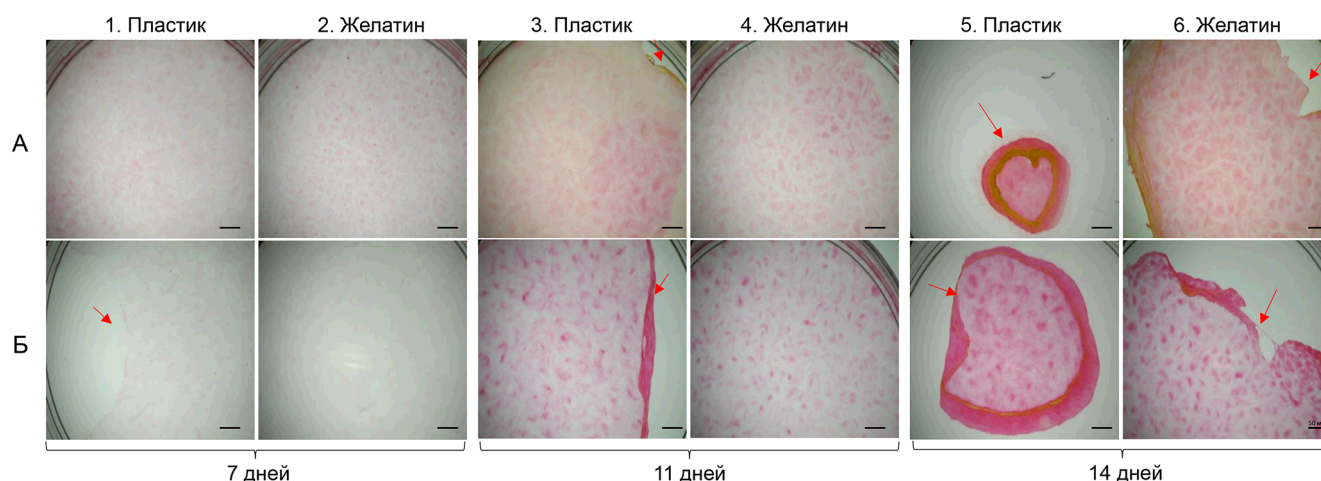


Рис. 2. Влияние срока культивирования МСК-ТПК в стандартной среде роста на различных покрытиях (культуральный пластик и желатин) на структуру коллагеновых волокон в составе продуцируемого ВКМ. А – клеточный пласт в стандартной среде роста; Б – слой ВКМ, полученный после децеллюляризации. Репрезентативные изображения после окраски Sirius Red. Масштабный отрезок – 50 мкм. Стереомикроскоп Stemi 2000-C (ZEISS, Германия).

Примечание: Красными стрелками отмечены места отслоения клеточного пласта и внеклеточного матрикса от поверхности субстрата.

После 7 сут культивирования на стандартном культуральном пластике (рис. 2, А1, Б1) отмечены очаговые нарушения целостности слоя дцВКМ ($\leq 20\%$ площади), тогда как на желатиновом покрытии (рис. 2, А2, Б2) адгезия как клеточного пласта, так и дцВКМ, была эффективнее. Умеренная интенсивность окрашивания красителем Sirius Red свидетельствовала о начальной стадии депонирования коллагена, но плотность формируемого ВКМ была недостаточной для последующего морфометрического анализа. Данные согласуются с работами, демонстрирующими минимальный порог в 7 сут для формирования функционального ВКМ *in vitro* [14].

Через 11 сут культивирования на пластике (рис. 2, А3, Б3) имело место частичное отслоение клеточного пласта (10–20%), что ограничивает его использование для генерации целостных пластов МСК-ТПК. Использование желатинового покрытия обеспечило формирование прочного адгезионного контакта клеточного пласта и дцВКМ с поверхностью (рис. 2, А4, Б4). На микроскопических изображениях можно видеть более равномерное распределение интенсивно окрашенных коллагеновых волокон без признаков нарушения адгезии (отслоение $< 5\%$). Этот режим обеспечивал оптимальное соотношение между продукцией матрикса и устойчивостью клеточно-матриксных комплексов. Эффективность использования желатина для улучшения адгезии и морфологии МСК ранее также была описана в работах [5, 15].

К 14-м сут отмечалась максимальная интенсивность окрашивания (рис. 2, А5, А6, Б5, Б6), указывающая на активный синтез коллагена, но на обоих типах покрытий выявлялись обширные зоны отслоения матрикса (25–80% площади), что, вероятно, связано с активацией контрактильной активности клеточного монослоя при значительном накоплении ВКМ [16, 17]. Кроме того, необходимо учитывать, что при дальнейшем увеличении продукции ключевых компонентов (гликозаминогликаны (ГАГ), коллаген типа II) [18] при культивировании в течение 14 сут, избыточное накопление ВКМ может активировать матриксные металлопротеиназы, запуская деградацию коллагена [5, 19].

На основании проведенных экспериментов было сделано заключение, что культивирование МСК-ТПК в течение 11 сут в стандартной среде роста с использованием покрытия желатином является более оптимальным.

Оптимизация состава среды культивирования для улучшения продукции ВКМ. Продукция внеклеточного матрикса *in vitro* регулируется целым рядом факторов, включая состав среды, наличие биологически активных молекул и физико-химические параметры культуры. Среди основных направлений для модуляции продукции ВКМ можно отметить:

– биохимическую стимуляцию с использованием факторов роста (например, TGF- β , PDGF), а также кофакторов ферментов сборки матрикса, таких как аскорбиновая кислота, необходимая для гидроксирования пролина и лизина в коллагене I, III и IV типов [20];

– изменение вязкости и «макромолекулярного окружения» с использованием полимеров (каррагинан, фикоилл, декстран), создающих эффект макромолекулярного уплотнения или макромолекулярного краудинга («*macromolecular crowding*»), усиливающий отложение белков ВКМ [21, 22];

– модификацию концентрации сыворотки – поскольку ФБС содержит как трофические факторы, так и экзогенные протеазы, способные деградировать ВКМ [19, 23].

На основе этих данных, в нашей работе были протестированы разные комбинации подходов, направленных на улучшение продукции и организации коллагенового ВКМ МСК-ТПК. Мы варьировали:

– концентрацию ФБС (1%, 5% и 10%) – для оценки как трофических, так и потенциально протеолитических эффектов сыворотки;

– добавление аскорбата натрия (50 мкМ) – как классического стимулятора коллагеногенеза;

– включение каррагинана – как модельного агента для создания эффекта макромолекулярного уплотнения;

– комбинированное применение аскорбата и каррагинана для оценки возможного синергического влияния на структуру и продукцию коллагеновых волокон. Мы исходили из предположения, что аскорбат усилит синтез и сборку коллагеновых волокон, тогда как каррагинан за счет изменения физико-химических условий среды может способствовать уплотнению и ориентации волокон, имитируя естественное околосклеточное пространство. Совместное применение этих факторов, по нашим ожиданиям, должно было привести к формированию более плотного, непрерывного и организованного коллагенового каркаса.

Эффект оценивали по состоянию коллагеновых волокон в ВКМ, сформированном МСК-ТПК, учитывая геометрические показатели и относительное содержание коллагеновых волокон, а также параметры сложности структуры коллагенового каркаса (табл. 1, табл. 2).

В первой серии экспериментов были протестированы эффекты снижения концентрации ФБС до 5% и 1%. Как известно, высокая концентрация ФБС может влиять на синтез ГАГ и коллагена II типа [18, 24], одновременно поддерживать клеточную пролиферацию и усиливать коллагеногенез, особенно при наличии стимулирующих добавок. При использовании концентрации ФБС менее $< 1\%$ можно снизить уровень экзогенных протеаз – таких как MMP-2, MMP-9 и MT1-MMP, присутствующих в сыворотке и разрушаю-

щих компоненты ВКМ, но при этом не обеспечиваются эффективный синтез и организация матрикса [25]. При недостаточной трофической поддержке клетки демонстрируют снижение продукции ВКМ, что отражается в уменьшении плотности, длины и упорядоченности коллагеновых волокон [26].

На микрофотографиях, подготовленных для анализа изображений (рис. 1Б), оценивали геоме-

трические показатели: средние длину и ширину, их общую длину и площадь коллагеновых волокон, а также параметры, характеризующие сложность структуры коллагенового каркаса: количество волокон, число точек пересечения, сонаправленность волокон, неравномерность заполнения пространства (лакунарность), а также неоднородность структуры каркаса (анизотропность) (табл. 1, 2).

Таблица 1

Влияние стимулирующих продукцию ВКМ добавок и их комбинаций на геометрические показатели и содержание коллагеновых белков в ВКМ от МСК-ТПК

Группа	ФБС, %	Средняя ширина, мкм	Средняя длина, мкм	Отн.площадь, мм²/мм² поля зрения	Общая длина/1000, мм/мм²	Sirius Red, отн.ед./1000 кл.
Контроль (стандартная среда роста)	1	39 ± 1	332 ± 7	0,007 ± 0,001	7 ± 0,9	25 ± 2
	5	42 ± 1	420 ± 20	0,041 ± 0,003	38,3 ± 2,6	27 ± 2
	10	44 ± 1	450 ± 20	0,055 ± 0,011	47,5 ± 7,2	45 ± 8
+аскорбат	1	43 ± 1 [#]	380 ± 10 [#]	0,026 ± 0,006 [#]	25 ± 5,7 [#]	25 ± 2
	5	45 ± 1	430 ± 30	0,055 ± 0,01	49 ± 8	27 ± 2
	10	44 ± 1	430 ± 20	0,057 ± 0,01	49,4 ± 7,3	59 ± 10
+каррагинан	1	43 ± 1 [#]	400 ± 20 [#]	0,032 ± 0,006 [#]	28,9 ± 4,9	33 ± 5
	5	43 ± 2	430 ± 20	0,068 ± 0,008 [#]	57,6 ± 6,7 [#]	39 ± 4 [#]
	10	43 ± 1	450 ± 30	0,085 ± 0,01 [#]	71,1 ± 7,4 [#]	59 ± 11
+аскорбат +каррагинан	1	46 ± 1 ^{###}	390 ± 20 [#]	0,052 ± 0,005 ^{###}	38 ± 18,9 [#]	33 ± 5
	5	46 ± 1 [#]	390 ± 10	0,052 ± 0,009	46,9 ± 7,4	35 ± 6
	10	47 ± 1 [#]	390 ± 10 [#]	0,057 ± 0,012	51,1 ± 8,5	80 ± 15 [#]

Примечание: Использованы программы Matlab (плагин CT-Fire) и ImageJ (плагины OrientationJ и TWOMBLI). Данные представлены как М ± SD. Статистический анализ выполнен с использованием one-way ANOVA (для каждой концентрации ФБС отдельно) с последующим пост-хок-тестом Тьюки. # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Таблица 2

Влияние стимулирующих продукцию ВКМ добавок и их комбинаций на показатели сложности структуры ВКМ от МСК-ТПК

Группа	ФБС, %	Неравномерность, усл.ед.	Лакунарность, усл.ед.	Сонаправленность, усл.ед. (0-1)	Число волокон, ед./мм²	Число пересечений, ед./мм²
Контроль (стандартная среда роста)	1	2,9 ± 0,3	141,5 ± 14,6	0,05 ± 0,04	39 ± 7	21 ± 1
	5	8,8 ± 1	22,2 ± 1,8	0,18 ± 0,08	89 ± 6	135 ± 18
	10	10,2 ± 2,2	16,8 ± 4,4	0,19 ± 0,05	91 ± 12	186 ± 48
+аскорбат	1	7,2 ± 2 [#]	37,8 ± 9,1 ^{###}	0,07 ± 0,03	59 ± 14	77 ± 20
	5	12,9 ± 1,5	16,6 ± 3,6	0,23 ± 0,1	75 ± 12	162 ± 51
	10	15,9 ± 3,9	16 ± 3,6	0,25 ± 0,05	90 ± 10	192 ± 45
+каррагинан	1	7,5 ± 1 [#]	30,3 ± 5,8 ^{###}	0,11 ± 0,06	53 ± 8	155 ± 9 [#]
	5	14,1 ± 4,8	13 ± 1,8 [#]	0,18 ± 0,04	131 ± 27	221 ± 35
	10	17,7 ± 1,3	9,8 ± 1,3	0,27 ± 0,08	179 ± 30 [#]	243 ± 6
+аскорбат +каррагинан	1	10,8 ± 1,3 ^{###}	17,4 ± 1,9 ^{###}	0,1 ± 0,06	87 ± 45	143 ± 71 [#]
	5	12 ± 3,3	17,7 ± 4,6	0,12 ± 0,02	96 ± 21	176 ± 30
	10	15,3 ± 6,3	16,1 ± 3,2	0,12 ± 0,05	108 ± 34	196 ± 35

Примечание: Использованы программы Matlab (плагин CT-Fire) и ImageJ (плагины OrientationJ и TWOMBLI). Данные представлены как М ± SD. Статистический анализ выполнен с использованием one-way ANOVA (для каждой концентрации ФБС отдельно) с последующим пост-хок-тестом Тьюки. # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Фетальная бычья сыворотка. По сравнению с 1% ФБС в среде культивирования МСК-ТПК при 5% или 10% ФБС значимо больше были средняя длина и ширина (табл. 1), а также средняя длина и площадь волокон. При этом геометрические параметры коллагеновых структур при 5% и 10% ФБС не отличались. Исключение составила площадь волокон, которая при 10% ФБС была достоверно больше. Аналогично, параметры, определяющие сложность организации фибриллярных компонентов, были сходными при 5% и 10% ФБС, но значимо отличались от значений при 1% ФБС. Так, при более высоком содержании ФБС коллагеновых фибрилл было больше, они пересекались чаще, имели более высокий индекс сонаправленности (табл. 2). Волокна коллагена при этом располагались более равномерно, демонстрируя меньшую лакуарность (табл. 2), но более высокую степень неоднородности структуры каркаса (анизотропность).

Концентрация 10% ФБС использовалась как стандартное референсное условие, тогда как 5% ФБС рассматривалась как потенциально более экономически рациональный вариант. Морфометрические параметры ВКМ были близкими при использовании 5% и 10% ФБС, однако количество коллагена было значимо больше в случае 10% ФБС. Это определило выбор 10% ФБС, как оптимального условия культивирования для наработки ВКМ.

Аскорбат натрия. Известно, что аскорбиновая кислота играет ключевую роль в синтезе коллагена — в частности, участвуя в стабилизации тройной спирали коллагена через активацию пролил- и лизилгидроксилаз [20, 27]. Показано, что аскорбат (50–100 мкМ) способен усиливать синтез коллагенов I, III и IV типов, а также фибронектина, при этом практически не влияя на пролиферацию клеток и минимизируя окислительный стресс [15, 28]. Добавление стабильной формы аскорбата в среду культивирования является стандартным приемом для стимуляции продукции ВКМ [29, 30]. В нашем же эксперименте при 5% и 10% ФБС добавление аскорбата натрия не вызывало значимых изменений морфометрических параметров ВКМ, однако сопровождалось увеличением интенсивности окрашивания Sirius Red, отражающим повышение плотности коллагеновых волокон (табл. 1).

Значимые изменения были выявлены в тех случаях, когда аскорбат натрия добавляли к среде роста с 1% ФБС. В этих условиях увеличилась общая длина волокон, число их пересечений и площадь, уменьшилась лакуарность и возросла неоднородность структуры (табл. 1, 2).

Таким образом, геометрические параметры и сложность организации коллагеновых волокон ВКМ зависят от концентрации ФБС. При существенной депривации ФБС введение аскорбата натрия позволяет модулировать структуру коллагенового каркаса.

В большинстве протоколов культивирования МСК используется среда с 10% ФБС. Поскольку мы не обнаружили существенных различий в структуре ВКМ при 5% и 10% ФБС в среде культивирования, то можно было предположить возможность уменьшения содержания ФБС до 5%. Однако по данным колориметрии по сравнению с 10% ФБС относительное количество коллагеновых белков при 5% ФБС было вдвое меньше и сопоставимо с количеством при 1% ФБС (табл. 1). Это подтвердило необходимость достаточной концентрации сывороточных факторов роста для реализации матрикс-стимулирующего потенциала добавок.

Макромолекулы. Установлено, что введение в среду культивирования синтетических или природных макромолекул вызывает так называемый макромолекулярный краудинг [21, 22]. Высокая концентрация макромолекул приводит к уменьшению объема культуральной жидкости, доступной для других молекул в растворе, что увеличивает их эффективную концентрацию. Считается, что такой эффект исключения объема хорошо имитирует физиологическую околочлеточную среду при секреции матрикса. Было продемонстрировано, что в присутствии фикола, каррагинана, поливинилпирролидона или декстрана усиливается продукция молекул ВКМ, включая ламинин, фибронектин, коллаген типа I и гликозаминогликаны. Кроме того, в таких условиях ламинин в дцВКМ был представлен фибриллами [31].

В выбранных ранее условиях мы оценивали влияние не только аскорбата, но и каррагинана и их сочетания на морфометрические параметры коллагенового каркаса. Комбинации данных добавок ранее были описаны как эффективные стимуляторы синтеза фибриллярных белков ВКМ, включая коллагены и фибронектин [21, 32, 33].

В присутствии каррагинана наблюдалось увеличение общей длины и площади волокон. При этом этот эффект был более выражен при 1% ФБС в среде роста (табл. 1). В сформированном коллагеновом каркасе была выше сонаправленность структур, увеличилось число волокон, они располагались более равномерно, чаще пересекались. Структура ВКМ стала более неоднородной (анизотропной). Показано статистически значимое увеличение содержания коллагеновых белков. Эффекты добавления каррагинана (10–50 мкг/мл) [5, 22] могут быть обусловлены активацией сигнальных путей, регулирующих фиброгенез, включая NF- κ B и MAPK/ERK [32, 33].

Мы ожидали, что совместное применение каррагинана и аскорбата натрия позволит получить кумулятивные эффекты. Однако изменение морфометрических параметров находилось в пределах, которые были описаны в тех случаях, когда каррагинан и аскорбат натрия использовались по отдельности (табл. 1, 2). В ряде случаев выражен-

ность эффекта была сопоставимой или даже несколько ниже по сравнению с индивидуальным применением добавок. С чем связано обнаруженное отсутствие аддитивности эффектов, пока не установлено. Важно отметить, что при совместном применении наблюдалось статистически значимое увеличение относительного содержания коллагеновых белков.

Отсутствие аддитивного эффекта при совместном применении аскорбата натрия и каррагинана может быть обусловлено совокупностью факторов. В частности, это может отражать достижение «эффекта насыщения» синтеза и сборки коллагенового матрикса, при котором добавление второго стимулирующего фактора не приводит к дальнейшему увеличению выявляемых коллагеновых белков. Кроме того, каррагинан как агент макромолекулярного краудинга способен изменять физико-химические свойства среды и микродиффузию, включая доступность аскорбата, а также вовлекать перекрывающиеся регуляторные механизмы формирования и депонирования коллагена, что в совокупности может ограничивать возникновение ожидаемого кумулятивного эффекта [19, 21, 23].

Результаты морфометрического анализа показали, что в присутствии различных концентраций ФБС в комбинации с добавками, стимулирующими продукцию ВКМ, геометрия и сложность структуры ВКМ существенно модулируются. В условиях депривации факторов роста сыворотки в ВКМ было меньше волокон, снижена их сонаправленность, выше степень изотропности. При использовании для культивирования клеток ФБС в концентрации 5% и 10% были получены ВКМ с высокой степенью анизотропии, меньшей лакунарностью, увеличенной сонаправленностью коллагеновых волокон. Применение специфических для стимуляции роста ВКМ добавок изменяло параметры ВКМ, причем эти эффекты были наиболее выражены при 1% ФБС. Надо отметить, что обнаруженные изменения могли различаться в зависимости от использованной добавки. Так, в присутствии каррагинана выявлено преимущественное увеличение числа волокон и точек их пересечения. Полуколичественное определение со-

держания коллагеновых белков показало, что, несмотря на схожесть морфометрических параметров коллагеновых структур при использовании 5% или 10% ФБС, относительное количество коллагена существенно выше в условиях 10% ФБС, что определило наш выбор в пользу 10% ФБС.

Заключение

Таким образом, проведенная работа позволила комплексно оптимизировать условия культивирования МСК-ТПК для получения функционально зрелого дцВКМ. Путем оценки влияния состава среды, сывороточной концентрации, срока культивирования и наличия биологически активных добавок было показано, что наилучшие результаты достигаются при выращивании клеток в течение 11 сут на желатиновом покрытии в среде роста, дополненной 50 мкМ 2-фосфо-L-аскорбата и 10% ФБС. Подобные условия обеспечивают лучшее сочетание адгезии клеток, равномерности распределения коллагеновой сети и сохранности структуры получаемого ВКМ по сравнению с базовыми протоколами.

Микроскопия и морфометрия подтверждают равномерное распределение и высокую сонаправленность волокон, снижение фрагментации и лакунарности за счет оптимального соотношения продукции и организации коллагенового матрикса, увеличение числа пересечений и высокую степень адгезии без признаков отслоения, что критически важно для их дальнейшего применения в задачах тканевой инженерии и клеточной терапии. Оптимизированный протокол может служить надежной платформой для создания матриксов с предсказуемыми свойствами, приближенными к естественным тканевым условиям.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00062 (<https://rscf.ru/project/23-15-00062/>). Все процедуры с биологическим материалом человека были выполнены в соответствии с этическими стандартами и одобрены Комиссией по медицинской биоэтике ИМБП РАН (протокол № 550/МСК от 22.07.2020). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.Р., Матвеева Д.К., Жидкова О.В., Буравкова Л.Б. Внеклеточный матрикс как фактор регуляции физиологического микроокружения клетки. *Успехи физиол. наук.* 2024;55(1):16–30.
2. Ratcliffe C.D.H., Sahgal P., Parachoniak C.A., Ivaszka J., Park M. Regulation of cell migration and $\beta 1$ integrin trafficking by the endosomal adaptor GGA3. *Traffic.* 2016;17(6):670–688.
3. McCarty J.H. $\alpha v \beta 8$ integrin adhesion and signaling pathways in development, physiology and disease. *J. Cell Sci.* 2020;133(12):jcs239434.
4. Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. *Цитология,* 2020;62(10):699–715.
5. Assunção M., Dehghan-Baniani D., Yiu C.H.K., Später T., Beyer S., Blocki A. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:602009.
6. Hussey G.S., Dziki J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater.* 2018;3(7):159–173.

7. Романов Ю.А., Романов А.Ю. Ткани перинатального происхождения: уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Часть II. Пупочный канатик. *Неонатология*. 2018;6(3):54–73.
8. Hoshiba T., Chen G., Endo C., Maruyama H., Wakui M., Nemoto E., Kawazoe N., Tanaka M. Decellularized extracellular matrix as an *in vitro* model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6397820.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the ISCT position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.
10. Kochetova E.S., Matveeva D.K., Melik-Pashayev A.E., Andreeva E.R., Romanov Yu.A., Buravkova L.B. Selection of optimal protocol for decellularization of extracellular matrix of mesenchymal stromal cells of human umbilical cord tissue. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2025;178(4):535–540.
11. Bredfeldt J.S., Liu Y., Pehlke C.A., Conklin M.W., Szulczewski J.M., Inman D.R., Keely P.J., Nowak R.D., Mackie T.R., Eliceiri K.W. Computational segmentation of collagen fibers from SHG images of breast cancer. *J. Biomed. Opt.* 2014;19(1):16007.
12. Rezakhaniha R., Agianniotis A., Schrauwen J.T.C., Griffa A., Sage D., Bouten C. V. C., van de Vosse F.N., Unser M., Stergiopoulos N. Experimental investigation of collagen waviness and production in arterial adventitia using confocal microscopy. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2012;11:461–473.
13. Wershof E., Park D., Barry D.J., Jenkins R.P., Rullan A., Wilkins A., Schlegelmilch K., Roxanis I., Anderson K.I., Bates P.A., Sahai E. A FIJI macro for quantifying pattern in extracellular matrix. *Life Sci. Alliance*. 2021;4(3):e202000880.
14. Ushakov R., Ratushnyy A., Buravkova L., Tolkunova E., Burova E. The decellularized cell-derived ECM enhances the paracrine function of human MSCs. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(4):2419.
15. Laperle A., Masters K.S., Palecek S.P. Influence of substrate composition on human embryonic stem cell differentiation and ECM production in embryoid bodies. *Biotechnol. Prog.* 2014;31(1):212–219.
16. Balasubramaniam L., Doostmohammadi A., Saw T.B., Narayana G.H.N.S., Mueller R., Dang T., Thomas M., Gupta S., Sonam S., Yap A.S., Toyama Y., Mège R.M., Yeomans J.M., Ladoux B. Investigating the nature of active forces in tissues reveals how contractile cells can form extensile monolayers. *Nat. Mater.* 2021;20(8):1156–1166.
17. Szász C., Pap D., Szebeni B., Bokrossy P., Órfi L., Szabó A.J., Vannay Á., Veres-Székely A. Optimization of Sirius Red-based microplate assay to investigate collagen production *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(24):17435.
18. Bilgen B., Orsini E., Aaron R.K., Ciombor D.M. FBS suppresses TGF- β 1-induced chondrogenesis in synovio-cyte pellet cultures while dexamethasone and dynamic stimuli are beneficial. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007;1(6):436–442.
19. Kumar P., Satyam A., Fan X., Collin E., Rochev Y., Rodriguez B.J., Gorelov A., Dillon S., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I. Macromolecularly crowded *in vitro* microenvironments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. *Sci. Rep.* 2015;5:8729.
20. Yamauchi M., Terajima M., Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Post-translational Modifications of Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol. 1934. Ed. C. Kannicht. Humana Press; 2019: 309–324.
21. Du S., Elliman S.J., Zeugolis D.I., O'Brien T. Carrageenan as a macromolecular crowding agent in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell culture. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;251:126353.
22. Fok S.W., Gresham R.C.H., Ryan W., Osipov B., Bahney C., Leach J.K. Macromolecular crowding and decellularization method increase the growth factor binding potential of cell-secreted extracellular matrices. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023;11:1091157.
23. Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D. Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: a paradigm shift in regenerative medicine. *Adv. Mater.* 2014;26(19):3024–3034.
24. Arslan E., Guler M.O., Tekinay A.B. Glycosaminoglycan-mimetic signals direct the osteo/chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a 3D peptide nanofiber ECM mimetic environment. *Biomacromolecules*. 2016;17(4):1280–1291.
25. Frankowski H., Gu Y.-H., Heo J.H., Milner R., Del Zoppo G.J. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Astrocytes. Methods in Molecular Biology*, vol. 814. Ed. R. Milner. Humana Press; 2012: 221–233.
26. Hackett T.L., Vriesde N.R.T.F., Al-Fouadi M., Mostaco-Guidolin L., Maftoun D., Hsieh A., Coxson N., Usman K., Sin D.D., Booth S., Osei E.T. The role of the dynamic lung extracellular matrix environment on fibroblast morphology and inflammation. *Cells*. 2022;11(2):185.
27. Piersma B., Wouters O.Y., de Rond S., Boersema M., Gjaltema R.A.F., Bank R.A. Ascorbic acid promotes a TGF- β 1-induced myofibroblast phenotype switch. *Physiol. Rep.* 2017;5(17):e13324.
28. Xing H., Lee H., Luo L., Kyriakides T.R. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol. Adv.* 2019;42:107421.
29. Mangir N., Bullock A.J., Roman S., Osman N., Chapple C., MacNeil S. Production of ascorbic acid-releasing biomaterials for pelvic floor repair. *Acta Biomater.* 2015;29:188–197.
30. Bhoot H.R., Zamwar U.M., Chakole S., Anjankar A. Dietary sources, bioavailability and functions of ascorbic acid and its role in cold, healing and iron metabolism. *Cureus*. 2023;15(11):e49308.
31. Chiang C.-E., Fang Y.-Q., Ho C.-T., Assunção M., Lin S.-J., Wang Y.-C., Blocki A., Huang C.-C. Bioactive decellularized ECM from 3D stem cell spheroids under macromolecular crowding. *Adv. Healthc. Mater.* 2021;10(11):e2100064.
32. Park S.-J., Lee K.W., Lim D.-S., Lee S. The sulfated polysaccharide fucoidan stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(12):2204–2211.
33. Wang L., Lee W., Oh J.Y., Cui Y.R., Ryu B., Jeon Y.J. Protective effect of sulfated polysaccharides from *Hizikia fusiforme* against UVB-induced skin damage by regulating NF-KB, AP-1, and MAPKs signaling pathways *in vitro* in human dermal fibroblasts. *Mar. Drugs*. 2018;16(7):239.

Поступила в редакцию 14.08.2025

После доработки 01.12.2025

Принята в печать 08.12.2025

RESEARCH ARTICLE

The structure of the collagenous matrix produced by human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells: The impact of cultivation conditions

E.S. Kochetova^{1, 2} , D.K. Matveeva¹ , A.E. Melik-Pashaev¹ ,
Yu.A. Romanov^{3, 4} , S.V. Buravkov^{1, 5} , E.R. Andreeva^{1, *} 

¹*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoye Shosse 76A, Moscow, 123007, Russia;*

²*Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, 119234, Moscow, Russia;*

³*Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Academician Chazov str., 15a, Moscow, 121552, Russia;*

⁴*CryoCenter LLC, Academician Oparina str., 4, Moscow, 117198, Russia;*

⁵*Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy Prospekt, 27–1, Moscow, 119991, Russia*

*e-mail: andreeva1564@gmail.com

The extracellular matrix (ECM) synthesized by multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) plays a critical role in regulating the cellular microenvironment and is widely used in the development of biomaterials for regenerative medicine. The present study demonstrates the influence of cell culture conditions on ECM collagenous compartments secreted by umbilical cord derived MSCs (MSCs-UC) including the geometric parameters, structure complexity, and production of collagenous proteins. The impacts of gelatin coating, cell culture duration, fetal bovine serum concentration, and ECM-stimulating supplements (sodium 2-phospho-L-ascorbate and carrageenan) were examined. The optimal protocol included cultivation of MSCs-UC on gelatin-coated plates for 11 days in α -MEM supplemented with 10% FBS and 50 μ M sodium ascorbate. These conditions supported high cell adhesion, structural integrity of the cell layer, and formation of a collagen-rich ECM network. Image analysis revealed that the collagenous fibers under these conditions exhibited a uniform distribution, enhanced fiber alignment and number of branching points, reduced lacunarity, and pronounced anisotropy. The relative collagen content under these conditions was significantly higher than in other culture setups. The results support the proposed protocol as an effective and reproducible platform for generating biomimetic ECM scaffolds suitable for applications in cell engineering and tissue therapy.

Keywords: *multipotent mesenchymal stromal cells, human umbilical cord, decellularized extracellular matrix, collagen fibers, histochemistry, light microscopy, image analysis, colorimetry*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-15-00062.

Сведения об авторах

Кочетова Эвелина Сергеевна — лаборант лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: evelina_kochetova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2065-9457>

Матвеева Диана Константиновна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1386-2836>

Мелик-Пашаев Алексей Эрнестович — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: amelikpashaev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1253-8177>

Романов Юрий Аскольдович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории ангиогенеза НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова», директор по научным исследованиям Банка пуповинной крови «КриоЦентр». Тел.: 8-495-730-16-58; e-mail: romanov@cryocenter.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3748-6860>

Буравков Сергей Валентинович — докт. мед. наук, вед. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-499-195-63-29; e-mail: sergey@wolf.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-63-01; e-mail: andreeva1564@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-5804>



Транскриптомика на уровне одиночных клеток в изучении функциональной гетерогенности жировой ткани: Насколько сопоставимы животные модели и человек?

А.Д. Бондарев* , П.А. Тюрин-Кузьмин 

*Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины,
Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1*

**e-mail: bondarevad@my.msu.ru*

Рассматриваются функциональная гетерогенность клеточного состава жировой ткани (ЖТ) и возможности межвидового сопоставления результатов транскриптомного анализа на уровне одиночных клеток на примере грызунов. Метаболический синдром и ожирение неразрывно связаны друг с другом. В свою очередь, дисфункция ЖТ, связанная с ожирением, сопровождается изменениями в ее клеточном составе. Развитие методов транскриптомного анализа на уровне одиночных клеток в последние годы, особенно snRNA-seq, и их популяризация дали особенно мощный инструмент для изучения гетерогенности клеточного состава ЖТ. Животные модели, такие как мыши, активно используются для изучения различных аспектов биологии ЖТ; однако трансляция таких результатов на человека может быть осложнена межвидовыми отличиями в анатомии и клеточном составе ткани. В статье обобщены некоторые важнейшие результаты изучения гетерогенности ЖТ у человека и мыши такими методами. На сегодняшний день известно о ряде функциональных субпопуляций как зрелых адипоцитов, так и клеток стромально-васкулярной фракции, участвующих в их обновлении. В литературе есть ограниченные данные по подтипам адипоцитов и клеток стромально-васкулярной фракции, характеризующихся определенной сопоставимостью между человеком и мышью по экспрессии маркеров и изменениям в ответ на ожирение. Тем не менее, малое количество опубликованных на сегодняшний день данных по гетерогенности ЖТ не дает возможности в полной мере судить о межвидовой сопоставимости субпопуляционного состава клеток ЖТ. Это подчеркивает важность более подробного изучения разных аспектов гетерогенности клеточного состава ЖТ.

Ключевые слова: жировая ткань, стромально-васкулярная фракция, животные модели, ожирение, метаболический синдром, транскриптомика одиночных клеток

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-2

Введение

Метаболический синдром представляет собой одну из важнейших медико-социальных проблем в мире, которая часто сопровождается ожирением и тесно связана с дисфункцией жировой ткани [1]. Жировая ткань (ЖТ) — гетерогенный орган мезодермального происхождения, состоящий из зрелых адипоцитов и поддерживающих их клеток стромально-васкулярной фракции [2]. В литературе описаны различия в функциональных особенностях и клеточном составе отдельных депо жировой ткани [3], а дисфункция ЖТ, связанная с ожирением, приводит к перераспределению депо ЖТ и индуцирует изменения в ее клеточном составе [4, 5]. Ожирение сопровождается экспансией ЖТ вследствие гиперплазии адипоцитов

(формирования новых клеток) или их гипертрофии (увеличения уже существующих клеток в размерах) [6]. Особую роль в процессе формировании новых адипоцитов играет пул тканеспецифичных стволовых клеток ЖТ, мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) [7], обеспечивающих ее обновление на протяжении всей жизни человека. При этом баланс между механизмами гипертрофии и гиперплазии считается ключевым для поддержания метаболического здоровья ЖТ. Таким образом, глубокое понимание функциональной гетерогенности клеточного состава ЖТ является важным условием для разработки эффективных терапевтических подходов в лечении метаболического синдрома и сопутствующих патологий.

Исторически изучение гетерогенности клеточного состава ЖТ преимущественно проводилось методом клонального анализа [8]; однако такой подход не позволял в полной мере оценить различия внутри ткани из-за того, что он выявлял наиболее пролиферирующие клеточные популяции. Распространение методов транскриптомики на уровне одиночных клеток, таких как РНК-секвенирование на уровне одиночных клеток (scRNA-seq) и ядер (snRNA-seq), расширило возможности более глубокого исследования гетерогенности ЖТ, предоставив мощный инструмент для выявления субпопуляций клеток в составе тканей [8, 9].

Животные модели — в частности, генетически модифицированные мышинные модели — широко используются для характеристики физиологии и патофизиологии ЖТ [9]. Тем не менее, между ЖТ грызунов и ЖТ человека существует ряд существенных различий как в анатомическом строении, так и в клеточном составе [10], что может осложнить транслируемость результатов. С помощью исследований методами scRNA-seq и snRNA-seq на сегодняшний день описан ряд уникальных субпопуляций адипоцитов и клеток стромально-васкулярной фракции у человека и мыши, в том числе МСК. Целью настоящей статьи-мнения является обобщение основных известных на сегодняшний день данных по транскриптомному анализу белой ЖТ мыши и сравнение этих данных с результатами исследований ЖТ человека.

1. Гетерогенность адипоцитов

В атласе белой ЖТ человека и мыши описано семь подтипов адипоцитов жировой ткани человека, hAd1-7, и шесть подтипов адипоцитов жировой ткани мыши, mAd1-6 [11]. В этом исследовании проанализированы образцы ЖТ мужчин и женщин, изолированные из подкожного и висцерального депо. Образцы ЖТ мыши изолированы у самцов и самок из пахового (соответствует подкожному депо человека) и перигонадального (соответствует висцеральному депо человека) депо. Подтипы адипоцитов человека hAd1, hAd3, hAd4 и hAd7 локализованы преимущественно в подкожной ЖТ, подтипы hAd2 и hAd6 характерны для висцерального жира, а подтип hAd5 представлен в обоих депо. Подтипы hAd1 и hAd2 составляют 40% и 60%, соответственно, от всех адипоцитов; они обозначены как «базальные», не обладающие каким-либо выраженным функциональным фенотипом. Подтип hAd3 связан с биосинтезом триглицеридов, экспрессируя РНК таких генов, как *DGAT2* (кодирует диацилглицерол-О-ацилтрансферазу 2), а также с адипокинами *ADIPOQ* (адипонектин) и *CFD* (адипсин). Подтип hAd4 обозначен по высокой экспрессии РНК генов десатураз жирных кислот — например, *FADS3*, кодирующий десатуразу жирных кислот 3. Подтип hAd5 главным образом экспрессирует транскрипты генов-маркеров инсу-

линовой сигнализации (например, гены инсулинового рецептора *INSR* и субстратов инсулинового рецептора *IRS1/2*), а также генов, кодирующих участников сфинголипидной сигнализации (например, *ACER2*, кодирующий щелочную церамидазу), и гена адипонектина. Подтип hAd6 связан с генами-маркерами термогенеза, таких как *EBF2*, кодирующий транскрипционный фактор EBF2. Подтип hAd7 не был явно охарактеризован авторами; однако в подтипе селективно представлены маркеры сигнального каскада MAPK (например, *MAP2K1*, кодирующий протеинкиназу MEK1), а также гена *ESRRG*, кодирующий гамма-изоформу эстроген-подобного рецептора, связанного с термогенезом. Субпопуляционный состав ЖТ изменяется при ожирении. Так, например, подтипы hAd4 и hAd7 более выражено представлены при индексе массы тела >40 кг/м², а подтипы hAd5 и hAd6 более характерны для индекса массы тела <30 кг/м².

У адипоцитов мыши в этом же исследовании не обнаружено выраженных различий в локализации подтипов между депо. У подтипов mAd1, mAd3, mAd4 и mAd5 выявлена зависимость от типа питания: относительные пропорции mAd1 и mAd3 понижены у особей, питавшихся кормом с высоким содержанием жира, а пропорции подтипов mAd4 и mAd5 у особей с таким кормом повышаются, что может свидетельствовать о преобладании этих подтипов при ожирении. Подтипы mAd1-3 характеризуются апрегуляцией генов-маркеров метаболизма жиров, а также инсулиновой сигнализации (например, гены-гомологи мыши *Dgat2*, *Insr* и *Irs1/2*). Кроме того, mAd3 также отличается высокой экспрессией РНК генов адипонектина (*Adipoq*) и адипсина (*Cfd*). Данный «кластер» авторами охарактеризован как связанный со сбалансированным питанием, так как пропорция таких адипоцитов была выше у особей, питавшихся кормом, богатым клетчаткой (англ., chow diet). Подтипы mAd4-6 отличаются высокой экспрессией РНК генов-маркеров актинового цитоскелета (например, *Actn1*, кодирующий альфа-актинин 1) и сигнальных путей HIF-1 (*Hif1a*, кодирующий альфа-субъединицу транскрипционного фактора HIF-1) и NF-κB (*Bcl2*, кодирующий регулятор апоптоза Bcl-2). Подтип mAd5 также связан с высокой экспрессией *Lep* (лептин) и генов-маркеров липогенеза (например, *Acaca*, кодирующий ацетил-КоА-карбоксилазу 1).

Другое исследование методом snRNA-seq на мышцах-самцах [12] выявило популяцию липогенных адипоцитов, а также две популяции адипоцитов-«собирателей липидов» (lipid-scavenging adipocytes, LSA) в эпидидимальном депо перигонадальной ЖТ. Липогенные адипоциты (lipogenic adipocytes, LGA) характеризуются высокой экспрессией РНК генов биосинтеза липидов (например, *Acaca*), маркеров чувствительности к инсулину и адипоцитарных транскрипционных факторов, та-

ких как *Pparg* (кодирует гамма-изоформу рецептора, активируемого пролифератором пероксисом). Популяции «собираателей липидов» характеризуются высокой экспрессией РНК генов, связанных с захватом и транспортом липидов, таких как *Abcg1* (кодирует АТФ-связывающий кассетный транспортер ABCG1); одна из них, SLSA (stressed lipid-scavenging adipocytes), также насыщена генами ответа на стресс (*Gadd45g*; гамма-изоформа белка клеточного стресса GADD45), гипоксию (*Hif1a*) и аутофагию (*Rab7*; малая ГТФаза Rab7). При индукции ожирения диетой, богатой жирами, относительное число LGA понижается при увеличении пропорций LSA и SLSA. Кроме того, индукция ожирения привела к даун-регуляции генов биосинтеза липидов, инсулиновой сигнализации и адипогенной дифференцировки в подтипах LSA и SLSA. При этом экспрессия РНК генов иммунного ответа и генов белков внеклеточного матрикса — в частности, коллагена — повышаются в этих подтипах.

На примере мышей-самцов также рассмотрен усовершенствованный протокол выделения ядер [13], основанный на применении ванадил-рибонуклеозидного комплекса в комбинации с рекомбинантным ингибитором РНКазы. Это способствует повышению общего качества получаемых данных, в том числе — за счет снижения контаминации амбиентной РНК, что является одним из существеннейших недостатков snRNA-seq. В исследовании выявлено шесть подтипов адипоцитов, Ad1-6, сгруппированных по размеру клеток. Образцы ткани были выделены из пахового и перигонадального депо. Подтипы Ad1-3 описаны как функционально зрелые, «классические», адипоциты, характеризующиеся экспрессией транскриптов генов инсулиновой сигнализации (например, *Pik3r1*, кодирующий регуляторную субъединицу р85-альфа фосфатидилинозитол-3-киназы) и метаболизма жиров (например, *Pparg*). Подтипы Ad3 и Ad4 характеризуются повышенной экспрессией генов, кодирующих белки-регуляторы гомеостаза кальция (например, *Cacna1e*, кодирующий субъединицу альфа-1Е кальциевого канала R-типа), а также генов, кодирующих белки-компоненты внеклеточного матрикса (например, *Adamts5*, кодирующий протеиназу ADAMTS5) и межклеточных контактов (например, *Magi1*, кодирующий скаффолд-белок MAGI-1). В подтипе Ad5 не выявлено предпочтительной экспрессии транскриптов какого-либо функционального типа генов; однако в наибольшей степени экспрессированы РНК некоторых антиген-презентирующих генов (*H2-K1*, кодирующий антиген гистосовместимости H-2K(D)) и генов адипокина *Retn* (резистин). Подтип Ad6 также характеризуется экспрессией РНК других антиген-презентирующих генов (например, *B2m*, кодирующий бета-2-микроглобулин), а также генов, кодирующих белки теплового шока (например, *Hspa8*, кодирующий белок 8 семейства Hsp70),

маркеров окислительного стресса (например, *Fth1*, кодирующий тяжелую цепь ферритина), компонентов цитоскелета (например, *Actb*, кодирующий бета-изоформу актина) и адипокинов, таких как лептин, *Rbp4* (ретинол-связывающий белок-4), резистин и *Hb* (гаптоглобин). У особей, получавших корм, богатый жирами, адипоциты описаны как гипертрофированные, особенно в перигонадальном депо; пропорции подтипов Ad1 и Ad2 наиболее выражены понижены у таких особей, а пропорция подтипа Ad6, наоборот, наиболее выражено повышена. Стоит дополнительно отметить, что применение такого протокола также способствует сохранению популяции сосудистых клеток. В одном из недавних исследований белой ЖТ человека из подкожного и висцерального депо [14] выявлены неклассические подтипы адипоцитов SA2 и VA2, характеризующиеся экспрессией ангиогенных факторов (*PTPRB*⁺; кодирует бета-изоформу рецепторной тирозиновой протеинфосфатазы). Хотя Со и коллеги [13] не выявили подобных подтипов в своей работе, использование такого протокола в будущих исследованиях могло бы облегчить выявление похожих подтипов.

В snRNA-seq-исследовании подкожной ЖТ человека в состояниях гипертрофии и гиперплазии [15] выявлено три подтипа: инсулинорезистентные адипоциты (insulin resistant adipocytes, IRA), чувствительные к инсулину адипоциты (insulin sensitive adipocytes, ISA) и транскрипционно активные развивающиеся адипоциты (transcriptionally active developing adipocytes, TADA). Подтип IRA представлен только в гипертрофированной ЖТ, составляя около 80% от всех адипоцитов. Он характеризуется высокой экспрессией транскриптов маркеров метаболизма жиров (например, *DGAT*), а также маркеров воспаления и маркеров инсулинорезистентности, таких как *FABP4* (кодирует белок, связывающий жирные кислоты 4). Этот подтип также отмечен даун-регуляцией адипогенных факторов. Подтип ISA составляет около 60% адипоцитов в гиперпластической ЖТ, он характеризуется маркерами инсулиновой сигнализации (например, *IRS1*), адипогенеза (например, *PPARG*) и β-окисления жирных кислот (например, *ACSL1*, кодирующий ацил-КоА-синтазу 1). Подтип TADA также характеризуется экспрессией РНК генов инсулиновой сигнализации (например, *INSR*) и некоторых маркеров адипогенеза, таких как *ZNF638* (кодирует транскрипционный фактор с «цинковым пальцем» ZNF638) или *GSK3B* (кодирует серин/треониновую протеинкиназу GSK 3-бета).

В литературе есть попытки сопоставить подтипы адипоцитов у человека и модельных животных по профилям экспрессии транскрипционных маркеров [16]. Например, подтипы адипоцитов мыши mAd1 и LGA приблизительно сопоставимы с подтипами адипоцитов человека hAd3-4, а также

Adipo^{PLIN}, выявленного методом пространственной транскриптомики [17]. Данный подтип характеризуется повышенной экспрессией РНК генов, кодирующих белки метаболизма глюкозы и липидов, а также гена, кодирующего адипонектин. Подтип выявлялся в 14% случаев у пациентов с нормальным весом, а при ожирении наблюдалось уменьшение пропорции таких адипоцитов. Примечательно, что подтип mAd3 также обладает некоторым сходством с Adipo^{PLIN} как по набору генов, включающего адипонектин и маркеры метаболизма глюкозы и липидов, так и по изменениям в ответ на ожирение. Подтипы адипоцитов мыши Ad1 и Ad2 [13] и ISA человека [15] приблизительно сопоставимы чувствительностью к инсулину и оба преимущественно представлены в гиперпластической ЖТ. Отсутствие каких-либо функциональных сходств между другими подтипами может быть связано с межвидовыми различиями в ответах на ожирение, а также в вариабельности между исследуемыми популяциями.

2. Гетерогенность клеток стромально-васкулярной фракции

В атласе ЖТ человека и мыши [11] описаны шесть подтипов МСК и прогениторных клеток ЖТ (англ., adipose stem and progenitor cells, ASPC), характеризующиеся экспрессией РНК гена рецептора альфа-изоформы тромбоцитарного фактора роста *PDGFRA/Pdgfra*. ASPC человека и мыши были названы hASPC1-6 и mASPC1-6 соответственно. Эти клетки не являются адипоцитами, но характеризуются потенцией к дифференцировке в адипоцитарном направлении. Ряд подтипов мыши, описанных в этом исследовании, оказались сопоставимы по транскриптному профилю с подтипами у человека. Например, и mASPC2, и hASPC2 характеризуются экспрессией РНК *Aldh1a3/ALDH1A3* (кодирует ретинальдегиддегидрогеназу 3). Соответственно, клетки этой субпопуляции по свойствам схожи с ранними мультипотентными клетками-предшественниками, локализованными в ретикулярном интерстиции жировой подушки. mASPC4 и hASPC4 экспрессируют РНК *Epha3/EPHA3* (кодирует эфринный рецептор A3), представляя собой регуляторные клетки CD142⁺, подавляющие адипогенез. У некоторых подтипов наблюдались связь с ожирением, а также вариабельность их пропорций между депо. hASPC1, hASPC4 и hASPC5 более выражено представлены в подкожной ЖТ; при ожирении наблюдается повышение пропорции hASPC4 и hASPC5. hASPC3 and hASPC6 наиболее хорошо представлены в висцеральном депо. Среди подтипов мыши mASPC2 более выражено представлен в паховом депо подкожной ЖТ, а подтипы mASPC5 и mASPC6 преимущественно представлены в перигонадальном депо висцерального жира. Пропорция подтипов mASPC5 и mASPC6 значи-

тельно увеличивалась у животных, особенно у самцов, питавшихся кормом с высоким содержанием жира, в то время как пропорция mASPC2 у особей с таким кормом понижалась.

В snRNA-seq исследованиях ЖТ в состояниях гипертрофии и гиперплазии [13, 15] выявлено некоторое сходство транскриптного профиля популяций прогениторных клеток ЖТ (англ., adipose progenitor cells, APC) и фиброадипогенных клеток (англ., fibroadipogenic cells, FAC). В обоих исследованиях обнаружены клетки, экспрессирующие РНК гена *Dpp4/DPP4*, кодирующий дипептидилпептидазу 4 (APC1 и APC2 у мышей и FAC3 у человека). Примечательно, что подтипы APC2 и FAC3 также характеризовались экспрессией РНК маркеров фиброза и воспаления, в том числе фибронектина-1 (*Fn1/FNI*). Однако эти подтипы по-разному отвечали на ожирение: в то время как пропорция подтипа FAC3 выше в гипертрофированной ЖТ, чем в гиперпластической, пропорция APC2, наоборот, понижается у особей, питавшихся кормом с высоким содержанием жира. Также, подтипы APC3 и FAC1 характеризуются сходствами в экспрессии РНК генов-маркеров метаболизма жиров, таких как *Fabp4/FABP4*.

Сходства на уровне транскрипционных факторов у МСК и прогениторных клеток ЖТ не так однозначны. Например, hASPC4, экспрессирующие схожий маркер с CD142⁺-mASPC4, могут на самом деле иметь разные функциональные состояния, так как антиадипогенные регуляторные клетки у человека достаточно выражено отличаются на транскриптном уровне от мышинных [18]. Не менее интересно выглядит и различие в ответе на ожирение между APC2 мыши и FAC3 человека, что может свидетельствовать о различиях в физиологическом ответе ЖТ на ожирение между видами.

Заключение

Проблема сопоставления животных моделей и человека появилась в первую очередь в связи с тем, что многие эксперименты, необходимые для понимания детальных механизмов функционирования физиологических систем организма, а также молекулярных механизмов действия потенциальных терапевтических агентов невозможно произвести на человеке в связи с этическими аспектами. Эксперименты со значительным вмешательством в генетические, биохимические и физиологические пути регуляции функций организма проводятся на животных моделях, а далее предпринимаются попытки транслировать эти результаты на человеческий организм. Наибольшее количество исследований производится на грызунах и рыбке *Danio rerio*, для которых существует огромное количество трансгенных моделей. Эти виды легко и относительно дешево содержать в лабораторных условиях, а ряд аспектов их физиологии схож с таковыми для человека. Однако последние десятиле-

тия развития биологических наук показали крайнюю ограниченность такого подхода, особенно в свете выявления механизмов ключевых заболеваний человека и поиска подходов для их лечения. Так, целый ряд новых терапевтических препаратов, показывающих выдающиеся результаты на животных моделях, оказываются лишь ограниченно эффективными на человеке при переходе к клиническим исследованиям. Например, известны повторяющиеся неудачи при переходе от животных моделей к человеку для попыток лечения инсульта головного мозга, рака, бокового амиотрофического склероза, черепно-мозговых травм, болезни Альцгеймера и ряда воспалительных заболеваний [19]. В качестве частичного компромисса исследователи получают так называемые гуманизированные модели животных, в которых искусственно пытаются воссоздать механизмы развития болезней, характерных для человека. Другим подходом является использование в экспериментах приматов, физиологически наиболее близких человеку. Тем не менее, все это не решает проблемы транслируемости результатов исследований, полученных с использованием экспериментальных животных моделей, на человеческий организм. В связи с вышесказанным поиск общих механизмов функционирования систем организма животных и человека является важной задачей для понимания границ, в которых исследования животных могут быть транслированы на человека. Так, например, в отношении ЖТ терапевтические воздействия на общие с животными субпопуляции могут быть потенциально применимы в лечении человека, а воздействия на субпопуляции, уникальные для животных, с большей долей вероятности не будут иметь значимого эффекта на человека.

Следует отметить достаточно малый объем данных по гетерогенности ЖТ на сегодняшний день, что не позволяет в полной мере провести оценку межвидовой сопоставимости. Тем не менее, в пяти разных по методологии и объему исследованиях выделяются подтипы адипоцитов с похожими профилями экспрессии генов-маркеров и характером их изменений при ожирении. Для других типов клеток, в частности, ASPC, сходства на уровне транскриптома менее однозначны, если учитывать

существенные различия в изменениях при ожирении у таких клеток. Мы предполагаем, что использование мышинных моделей как вспомогательного инструмента для оценки влияния ожирения на функциональные состояния ЖТ имеет наибольший потенциал на сегодняшний день. В качестве гипотетического примера такого применения можно привести моделирование нарушений в метаболизме жиров и/или инсулиновой сигнализации при ожирении. В исследовании Райниш и соавторов [20] было установлено, что в обоих депо ЖТ человека выделяется подтип Adipo2, сопоставимый по транскрипционному профилю с подтипом Adipo^{PLIN}; его пропорция у доноров с метаболической дисфункцией, ассоциированной с ожирением, понижена по сравнению с метаболически здоровыми донорами. По аналогии с подтипом Adipo^{PLIN}, сопоставимым по профилю с подтипами адипоцитов мыши LGA и mAd1/3, Adipo2 также характеризуется рядом сходств с ними (данные транскрипционных профилей схожих подтипов адипоцитов приведены в таблице). Это могло бы лечь в основу применения мышинных моделей ожирения в таких ситуациях, когда проведение исследования на человеке не представляется возможным по этическим или другим причинам.

В будущих исследованиях важно учитывать различия между депо, в том числе и уникальные особенности внутри депо, влияющие на метаболическую функцию и иные функциональные состояния [21]. Не меньшее значение играют различия транскриптома, получаемого методами snRNA-seq и scRNA-seq [21]; это важно при изучении ASPC, у которых snRNA-seq выявляет менее разнообразный транскриптом.

Работа проведена при поддержке Российского научного фонда, проект № 25-75-30005 «Регуляция процессов обновления клеток в организме, фундаментальной основы длительного сохранения функциональной активности органов и тканей, здоровья и активного долголетия человека» (<https://rscf.ru/project/25-75-30005/>), и выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица

Транскрипционный профиль адипоцитов человека и мыши, вовлеченных в метаболизм жиров и ответ на инсулин

Подтип	Депо	Вид	Гены-маркеры метаболизма жиров	Гены-маркеры инсулинового ответа
Adipo ^{PLIN}	Подкожное	Человек	<i>ADIPOQ, PLIN1/4, LIPE, DGAT2, G0S2, PNPLA2, GPD1</i>	<i>ADIPOQ, TRARG1</i>
Adipo2	Подкожное и висцеральное	Человек	<i>LIPE, PLIN4, DGAT2, MEST, CIDEA</i>	<i>CIDEA</i>
LGA	Подкожное	Мышь	<i>Adipor2, Dgat1/2, Plin1, Elovl6, Acaca, Lipe</i>	<i>Adipor2, Igf2r</i>
mAd1	Подкожное и висцеральное	Мышь	<i>Lipe, Plin1, Dgat1, Mgl</i>	<i>Insr, Irs1, Pde3b</i>
mAd3	Подкожное и висцеральное	Мышь	<i>Adipoq, Lipe, Plin1, Pnpla2, Abhd5, G0s2, Dgat1/2</i>	<i>Adipoq, Insr, Irs1/2, Pde3b</i>

Примечание: Жирным шрифтом выделены гены-маркеры, схожие между видами. Гены-маркеры, не упомянутые в тексте: *LIPE/Lipe* – ген, кодирующий гормон-чувствительную липазу, *G0S2/G0s2* – ген, кодирующий белок-переключатель G0/G1, *PNPLA2/Pnpla2* – ген, кодирующий адипоцитарную триглицеридлипазу

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saklayen M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018;20(2):12.
2. Eto H., Suga H., Matsumoto D., Inoue K., Aoi N., Kato H., Araki J., Yoshimura K. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009;124(4):1087–1097.
3. Lynes M. D., Tseng Y. H. Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2018;1411(1):5–20.
4. Lee M. J., Wu Y., Fried S. K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 2013;34(1):1–11.
5. Reyes-Farias M., Fos-Domench J., Serra D., Hererro L., Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem. Pharmacol.* 2021;192:114723.
6. Harvey I., Boudreau A., Stephens J. M. Adipose tissue in health and disease. *Open Biol.* 2020;10(12):200291.
7. Si Z., Wang X., Sun C., Kang Y., Xu J., Wang X., Hui Y. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed. Pharmacother.* 2019;114:108765.
8. Deutsch A., Feng D., Pessin J. E., Shinoda K. The impact of single-cell genomics on adipose tissue research. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(13):4773.
9. Hagberg C. E., Spalding K. L. White adipocyte dysfunction and obesity-associated pathologies in humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2024;25(4):270–289.
10. Börgeson E., Boucher J., Hagberg C.E. Of mice and men: Pinpointing species differences in adipose tissue biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;10:1003118.
11. Emont M. P., Jacobs C., Essene A.L., et al. A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature.* 2022;603(7903):926–933.
12. Sárvari A.K., Van Hauwaert E.L., Markussen L.K., Gammelmark E., Marcher A.B., Ebbesen M.F., Nielsen R., Brewer J.R., Madsen J.G.S., Mandrup S. Plasticity of Epididymal adipose tissue in response to diet-induced obesity at single-nucleus resolution. *Cell Metab.* 2021;33(2):437–453.e5.
13. So J., Strobel O., Wann J., et al. Robust single-nucleus RNA sequencing reveals depot-specific cell population dynamics in adipose tissue remodeling during obesity. *Elife.* 2025;13:RP97981.
14. Lazarescu O., Ziv-Agam M., Haim Y., et al. Human subcutaneous and visceral adipocyte atlases uncover classical and nonclassical adipocytes and depot-specific patterns. *Nat. Genet.* 2025;57(2):413–426.
15. Ye R.Z., Montastier E., Frisch F., Noll C., Allard-Chamard H., Gévry N., Tchernof A., Carpentier A.C. Adipocyte hypertrophy associates with *in vivo* postprandial fatty acid metabolism and adipose single-cell transcriptional dynamics. *iScience.* 2023;27(1):108692.
16. Maniyadath B., Zhang Q., Gupta R.K., Mandrup S. Adipose tissue at single-cell resolution. *Cell Metab.* 2023;35(3):386–413.
17. Bäckdahl J., Franzén L., Massier L., Li Q., Jalkanen J., Gao H., Andersson A., Bhalla N., Thorell A., Rydén M., Ståhl P.L., Mejhert N. Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin. *Cell Metab.* 2021;33(9):1869–1882.e6.
18. Ferrero R., Rainer P., Deplancke B. Toward a Consensus view of mammalian adipocyte stem and progenitor cell heterogeneity. *Trends Cell Biol.* 2020;30(12):937–950.
19. Akhtar A. The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb. Q. Healthc. Ethics.* 2015;24(4):407–419.
20. Reinisch I., Ghosh A., Noé F., Sun W., Dong H., Leary P., Dietrich A., Hoffmann A., Blüher M., Wolfrum C. Unveiling adipose populations linked to metabolic health in obesity. *Cell Metab.* 2025;37(3):640–655.e4.
21. Loft A., Emont M. P., Weinstock A., et al. Towards a consensus atlas of human and mouse adipose tissue at single-cell resolution. *Nat. Metab.* 2025;7(5):875–894.

Поступила в редакцию 24.06.2025

После доработки 17.11.2025

Принята в печать 02.12.2025

OPINION ARTICLE

Single-cell transcriptomics in elucidating the functional heterogeneity of adipose tissue: How comparable are animal models to humans?

A.D. Bondarev* , P.A. Tyurin-Kuzmin 

Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy prospekt 27–1, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: bondarevad@my.msu.ru

In this opinion article we discuss the functional heterogeneity of cells composing adipose tissue (AT), as well as opportunities for the cross-species comparability of murine animal models with respect to single cell transcriptomic studies. Metabolic syndrome and obesity are closely interconnected, and obesity-related AT dysfunction results in changes in the cellular composition of AT. Animal models, particularly rodents, have been commonly used as a model organism to study various aspects of AT biology; however, results of such studies are often poorly translatable in humans due to cross-species differences in AT anatomy and cell composition. Rapid development and spread of single cell transcriptomic approaches in the recent years, particularly snRNA-seq, provided a powerful instrument to interrogate the cellular heterogeneity of AT. Herein, some of the most notable results from the AT heterogeneity studies, based on these methods, are

summarized. To date, several functional subtypes of adipocytes have been described, as well as the stromal-vascular fraction cells involved in adipocyte turnover. Limited literature data suggests a potential cross-species comparability between adipocytes and the stromal-vascular cells in marker genes expression patterns and obesity-induced changes. However, it is currently difficult to draw any definitive conclusions on the cross-species comparability of cells composing AT due to insufficient body of evidence in relation to the AT heterogeneity at large. This highlights the importance of continuous efforts to decipher functional heterogeneity of AT.

Keywords: *adipose tissue, stromal-vascular fraction, animal models, obesity, metabolic syndrome, single-cell transcriptomics*

Funding: The research was supported by Russian Science Foundation, project number 25-75-30005 (<https://rscf.ru/project/25-75-30005/>).

Сведения об авторах

Бондарев Андрей Дмитриевич — аспирант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МНОИ МГУ. Тел.: 8-495-932-98-32; e-mail: bondarevad@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5287-5624>

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич — докт. биол. наук, доц. кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МНОИ МГУ. Тел.: 8-495-932-98-32; e-mail: tyurinkuzminpa@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1901-1637>



Статистический анализ в биомедицинских исследованиях: от достоверности к «тенденциям»?

А.Н. Хохлов 

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

На основании своего многолетнего редакторского опыта работы в биомедицинских научных журналах, а также опыта чтения лекций по оформлению научных статей для аспирантов Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова автор анализирует сложившуюся ситуацию со статистическим анализом результатов биологических, биомедицинских и медицинских исследований — в частности, данных, полученных в работах, направленных на поиск лекарственных препаратов, предположительно замедляющих старение и подавляющих развитие возрастных болезней. Подчеркивается, что во многих случаях такой анализ либо вообще не проводится, либо проводится некорректно. Довольно часто авторы анализируют данные, не подчиняющиеся нормальному распределению, с помощью параметрического теста Стьюдента. При этом все чаще многие исследователи, не получив достоверных результатов ($p > 0,05$), заменяют в своих статьях понятие «достоверность» на понятие «тенденция», что представляется абсолютно недопустимым. Эта проблема затрагивает не только биомедицинские, но и другие естественнонаучные исследования, однако именно для биомедицины она представляется наиболее важной, ибо в данном случае речь идет о жизни и здоровье людей. Предлагается больше внимания уделять этому вопросу как рецензентам соответствующих статей, так и редакторам журналов, в которых они публикуются. Кроме того, подчеркивается важность преподавания основ статистической обработки результатов исследований студентам и аспирантам биологических, биомедицинских и медицинских институтов, а также соответствующих факультетов университетов.

Ключевые слова: биомедицинские исследования, статистический анализ, параметрические и непараметрические критерии, размеры выборок, кривые выживания, уровень значимости, геронпротекторы, экспериментальная геронтология

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-7

Если ввести в поисковую строку базы данных Google Scholar слова «statistics biomedical research», можно получить огромное количество (более 8 миллионов!) ссылок, ведущих на статьи и книги, посвященные вопросам корректного использования статистических методов для анализа данных биомедицинских исследований. Это с очевидностью указывает на огромную важность данного вопроса для специалистов соответствующего профиля во всем мире. Очень много лет назад, еще когда я был молодым аспирантом, один из моих коллег рассказал мне о том, что в Великобритании проверили значительное количество научных публикаций, содержащих данные, требующие статистического анализа. В результате обнаружили, что приблизительно в 2/3 этих работ такой анализ был выполнен с грубыми нарушениями, т.е. сделанные авторами выводы были совершенно не обос-

нованными. Ясно, что формирование адекватной и репрезентативной выборки проанализированных в данном исследовании публикаций в свою очередь подразумевало корректный с позиций статистического анализа подход, в чем, конечно, нельзя было быть уверенным на 100%, однако сделанные выводы все же наводили на серьезные сомнения в «правильности» результатов, опубликованных в подвергнутых анализу работах.

Боюсь, что на сегодняшний день ситуация не только не улучшилась, но даже стала гораздо более настораживающей, о чем свидетельствует большое количество появляющихся вновь и вновь публикаций на эту тему ([1, 2] и др.). Как отметил С. Гланц в своей монографии 1992 г., «Как мы видим, статистические ошибки встречаются примерно в половине статей. Однако дальнейшие исследования показали, что журналам, в которых

взяли за правило обращать внимание не только на медицинскую, но и на статистическую сторону дела, удалось существенно снизить долю ошибочных статей. И эта доля нисколько не изменилась в тех журналах, которые так и не ввели статистического рецензирования» [1].

Мы обычно оцениваем важность рассматриваемых в научных публикациях проблем и полученных результатов по количеству скачиваний и цитирований этих работ, хотя, надо заметить, во многих случаях это не вполне корректно [3]. Я нашел в Google Scholar ссылку на профиль (https://scholar.google.com/citations?user=_QnLm3kAAAAJ&hl=en&oi=ao) коллеги из Оксфордского университета по имени Дуглас Альтман (Douglas G. Altman), статьи которого как раз в основном посвящены рассматриваемой проблеме статистического анализа в биомедицине. При этом всего у Альтмана в его профиле в настоящее время более 1 070 000 ссылок (!) на его работы (индекс Хирша – более 290!), а количество цитирований некоторых его отдельных статей по статистическому анализу в биомедицине достигает нескольких десятков тысяч [4–6]. Хотя, объективности ради, надо заметить, что на некоторые его не менее интересные работы в этой области ссылок на порядок меньше [7, 8]. Надо полагать, мои цитирования его публикаций в настоящей работе добавят еще кое-что в его копилку. Впрочем, если я правильно понял, он и так является самым цитируемым ученым Оксфордского университета (между прочим, одного из лучших в мире!) по данным Google Scholar Citations, обходя даже обычно лидирующих по количеству ссылок специалистов по искусственному интеллекту и визуализации головного мозга (brain imaging). Так что «классическим» исследователям, работающим в области биомедицинских исследований и не занимающимся профессионально методами статистического анализа данных, остается только завидовать Альтману и его коллегам.

Конечно, можно возразить, что работы Альтмана были опубликованы довольно много лет назад и именно поэтому набрали такое количество цитирований. Однако и в последнее десятилетие появилось большое количество публикаций по статистическому анализу в биомедицинских исследованиях [10–13], что явно свидетельствует о неослабевающем интересе к данной проблеме у специалистов соответствующих областей исследования.

Во всех упомянутых выше работах речь, как правило, идет о корректных подходах к обработке результатов самых разных биологических, биомедицинских и медицинских исследований. Совсем недавно я проанализировал [14] ситуацию со статистическим анализом данных в экспериментально-геронтологических статьях, поступающих в журналы, редактором которых я являюсь – «Ad-

vances in Gerontology» [15, 16] и «Moscow University Biological Sciences Bulletin» [17, 18]. В оба этих издания поступает много работ от ученых из разных стран. И, к сожалению, в большинстве этих рукописей мы обнаруживаем серьезные проблемы, касающиеся статистического анализа полученных результатов. Частично они были перечислены в одной нашей недавней публикации [19], инициированной курсом лекций «Основы наукометрии и подготовки научных публикаций» для аспирантов биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

В этих лекциях мы довольно большое внимание уделяли и уделяем необходимости корректной статистической обработки экспериментальных данных, публикуемых в научных статьях. Собственно, в биомедицинских экспериментах – например, на крысах – одно животное всегда тяжелее другого, даже если мы берем вполне однородную группу особей. Вообще-то это касается и любых других физиологических, биохимических и молекулярно-биологических показателей. Однако эти различия показателей должны быть случайными, а распределение животных по изучаемому показателю – нормальным (гауссовским). И если мы сравниваем контрольную и опытную группы (например, изучая влияние на людей, животных или клеточные культуры какого-то потенциального геропротектора) с помощью параметрического критерия Стьюдента, то такой подход подразумевает нормальность распределения животных по изучаемому параметру в обеих группах. В «правильных» компьютерных программах, предназначенных для статистического анализа данных – например, SigmaPlot (Grafiti LLC, US) – при попытке запустить тест Стьюдента система анализирует эти данные на нормальность и после этого оценивает достоверность различий между опытной и контрольной группами только в том случае, если распределение изучаемых показателей достоверно не отличается от нормального. Если отличается, то программа просто предложит вам использовать непараметрический тест, отказавшись использовать параметрический. Но, судя по всему, большинство исследователей ограничивается тестом Стьюдента, встроенным в MS Excel, который никакой проверки на нормальность не подразумевает. А о существовании непараметрических критериев статистического анализа они, как ни печально, часто просто не имеют представления. При этом объективности ради надо, конечно, заметить, что нормальность распределения данных – хоть и необходимое, но не единственное требование к возможности использования параметрического критерия сравнения [20].

К сожалению, как правило, и рецензенты, и редакторы биомедицинских научных журналов не очень много внимания уделяют статистической обработке данных, полученных авторами статей.

И это понятно: довольно трудно корректно проанализировать громоздкие математические выкладки, которые обосновывают достоверность полученных результатов. Кроме того, во многих случаях подробности статистического анализа данных авторы оставляют «за кадром».

Конечно, общепринятый уровень достоверности $p = 0,05$ (для наиболее придирчивых — $p = 0,01$) является во многом «искусственным» и отражает лишь некоторые условные договоренности, достигнутые исследователями на протяжении многих десятилетий. Однако договоренности нужно соблюдать, и это касается также упомянутого «барьера достоверности». Впрочем, не будучи «крутым» специалистом в статистике, я не могу правильно объяснить своим студентам и аспирантам, почему $p = 0,049$ — это хорошо, а $p = 0,051$ — плохо. Хотя я слышал от одного из коллег, что поговорка «семь раз отмерь, один раз отрежь» возникла не на пустом месте: в случае использования критерия знаков для анализа парных сравнений объектов двух выборок 2^6 (имеется в виду 6 одинаковых знаков — например, 6 раз подряд показатель в контроле превышает таковой в опыте) — это 64%-ная вероятность неслучайности обнаруженных различий, а 2^7 — уже 128%-ная (т.е. эта вероятность уже достигла и даже, условно, «превысила» 100%). Нельзя также не заметить, что делаются неоднократные попытки обосновать увеличение строгости требований к значимому уровню различий, например — уменьшение его до $p < 0,005$ [21].

Однако давайте представим себе, что мы сделали все совершенно правильно и корректно использовали одну из многочисленных существующих программ анализа полученных данных. И... оказалось, что достоверных различий, свидетельствующих, например, об эффективности исследуемого нами биомедицинского препарата, в нашей работе обнаружено не было. И вот тут мы подходим к той самой теме, которая вынесена в заголовок настоящей статьи.

Можно просто построить гистограммы со столбиками разной высоты для контрольной и опытной группы, но без «усов», показывающих ошибку описываемых данных. А потом в обсуждении заметить: вот, мол, в контроле столбики ниже, а в опыте выше, так что препарат со всей очевидностью действует. То есть, как обычно пишут наши авторы, «обнаружена очевидная тенденция». И, как ни печально, многих рецензентов, редакторов, а также читателей уже опубликованной работы это вполне может устроить. Автор микробиологической работы, поступившей в один из моих журналов, написал мне в ответ на замечания: «У нас в микробиологии не принято статистически анализировать полученные данные». И это при том, что в статье были приведены результаты сравнения влияния различных культуральных

сред на рост бактерий! Как можно в такой работе сделать какие-либо выводы без использования статистических методов, мне совсем не понятно. При этом, и это особенно огорчает, в ответ на мои возражения автор прислал несколько своих ранее опубликованных статей во вполне приличных журналах (и даже в изданиях, входящих в Q1), где статистическая обработка результатов действительно отсутствовала!

Известно, что для получения достоверных результатов количество животных, используемых в геронтологических исследованиях, должно быть достаточно большим. В случае построения кривых выживания — не менее 50 в каждой группе. В противном случае на «хвостах» таких кривых нам просто не с чем будет работать. При тестировании геропротекторов с использованием показателей биологического возраста количество объектов как в контрольной, так и в опытной группе может быть меньшим, но все равно достаточным для корректных выводов о влиянии исследуемого препарата на старение и продолжительность жизни. Это же касается количества клеток или культуральных флаконов и гемоцитометров (камер Горяева) в цитогеронтологических экспериментах [22, 23]. И мне не кажутся оправданными объяснения некоторых коллег, которые говорят мне что-нибудь вроде: «Эти животные очень дорогие и редкие, так что в каждой группе у нас было не более 2–3 особей». Или: «Где же мы возьмем больше одной королевы голых землекопов?». Впрочем, полученные результаты они, тем не менее, легко публикуют в высокорейтинговых журналах, особенно если эти журналы получают с авторов большую плату за публикацию (APC — article processing charge) и, как ни печально, заинтересованы в том, чтобы закрывать глаза на проблемы со статистической обработкой результатов [3, 24]. Однако даже если животные не «очень дорогие», авторы иногда могут вообще не указать их количество в своих экспериментах, но, тем не менее, без проблем опубликоваться в одном из самых престижных научных журналов [3]. И это при том, что существуют проверенные способы оценки минимального объема выборки для получения значимых результатов — например, с помощью программы «G*Power»: (<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower>) [25].

И самое главное: просто ужасает огромное количество научных статей, авторы которых, не получив значимых результатов ($p > 0,05$), спокойно отмечают выявленную ими «очевидную тенденцию» — например, влияния изучаемого препарата на те или иные живые организмы или культивируемые клетки. Особенно мне нравится утверждение: «Да, у нас $p > 0,05$, но совсем ненамного, так что мы думаем, что эффект точно обнаружен». Я всегда считал, что отсутствие достоверных отли-

чий между опытом и контролем свидетельствует (не забываем об упомянутой выше «договоренности») лишь о том, что таких различий просто нет. Если же авторы действительно имеют основания полагать, что различия все-таки должны быть, то им нужно значительно увеличить размеры контрольной и опытной группы объектов и провести эксперименты заново. При этом, как уже отмечалось выше, удивляет реакция коллег на такие замечания: «А мы уже публиковали такие результаты в очень солидных журналах, и у нас все принимали без проблем». Проверяем — действительно публиковали, причем в очень «крутых» журналах из Q1. Непонятно, куда в таких случаях смотрели рецензенты и редакторы.

И еще несколько «геронтологических» замечаний (по своей основной специальности я являюсь геронтологом). Как известно, на основании очень дорогих и длительных лонгитудинальных исследований могут быть получены гораздо более интересные и важные результаты, чем в поперечных исследованиях. Именно таким образом выявляются корреляции между различными физиологическими показателями либо привычками людей и их заболеваемостью, смертностью и продолжительностью жизни (долголетием). Однако факторный анализ и статистический анализ получаемых в таких исследованиях результатов должны проводиться очень хорошими специалистами в области математической обработки биомедицинских данных. Себя я точно к ним не отношу, так что мне так и не понятно до конца, почему достаточно небольшие коэффициенты корреляции, получаемые в таких работах, ученые-геронтологи считают заслуживающими внимания. Скажем, мне кажется странным, что по данным «The Duke First Longitudinal Study» удовлетворение работой и карьерой является «строгим предиктором» долголетия для мужчин ($r = 0,28$, что, на мой взгляд, маловато) [26]. Считается, что чем больше объем выборок, тем меньше может быть коэффициент корреляции для выявления представляющих интерес факторов. Однако, к сожалению, в различных работах приводятся совсем разные «барьеры» для размеров выборок, хотя специалисты уже давно достаточно точно определяют их «по Чеддоку» [27].

Впрочем, мне также не очень понятны подходы, которые позволяют многим геронтологам счи-

тать представляющими интерес минимальные достоверные различия кривых выживания контрольной и опытной группы животных в экспериментально-геронтологических исследованиях: «Да, как средняя, так и максимальная продолжительность жизни выросли только на 0,8%, но это увеличение, по данным статистического анализа, достоверно и свидетельствует об эффективности изученного нами геропротектора». Не исключаю, что мне просто не хватает квалификации для понимания такого рода результатов.

Заключение

Итак, ситуация со статистическим анализом данных в биомедицинских (и в частности, в экспериментально-геронтологических) работах, к сожалению, представляется мне неудовлетворительной. В большом количестве исследований полученные результаты либо вообще не подвергаются статистическому анализу, либо анализируются некорректно, а во многих случаях авторы легко заменяют понятие «достоверность» на понятие «тенденция». И это делается, в том числе, в работах, посвященных поиску критически важных препаратов против болезней, уносящих ежегодно миллионы жизней! Ошибочные выводы в таких исследованиях могут нам очень дорого обойтись. И примеров этому можно в Интернете легко найти огромное количество. Чего стоят бесконечные накладные с поисками препаратов против болезни Альцгеймера [28]!

Мне кажется, что нужно больше уделять внимания этому вопросу как рецензентам соответствующих статей, так и редакторам журналов, в которых они публикуются. Кроме того, хотелось бы подчеркнуть необходимость преподавания основ статистической обработки результатов исследований студентам и аспирантам биомедицинских институтов и соответствующих факультетов университетов.

Выражаю свою искреннюю благодарность Г.В. Моргуновой и Н.А. Хохлову за их неоценимую помощь в работе над рукописью статьи. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glantz S.A. *Primer of biostatistics*. 3rd ed. N.Y.: McGraw-Hill; 1992. xvi, 440 pp.
2. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452–454. <https://doi.org/10.1038/533452a>
3. Khokhlov A.N. How scientometrics became the most important science for researchers of all specialties.

Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020;75(4):159–163. <https://doi.org/10.3103/S0096392520040057>

4. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986;1(8476):307–310.

5. Altman D.G. *Practical statistics for medical research*. NY: Chapman and Hall/CRC, 1990. 624 pp. <https://doi.org/10.1201/9780429258589>

6. Bland J.M., Altman D.G. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 1999;8(2):135–160. <https://doi.org/10.1177/096228029900800204>.
7. Altman D.G. Statistics and ethics in medical research: III How large a sample? *Br. Med. J.* 1980;281(6251):1336–1338. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6251.1336>.
8. Altman D.G. Statistics in medical journals: some recent trends. *Statist. Med.* 2000; 19(23):3275–3289. [https://doi.org/10.1002/1097-0258\(20001215\)19:23<3275::aid-sim626>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-0258(20001215)19:23<3275::aid-sim626>3.0.co;2-m).
9. Yan F., Robert M., Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2017;9(5):157–163.
10. Marino M.J. Statistical analysis in preclinical biomedical research. In: *Research in the biomedical sciences*. Academic Press, 2018, pp. 107–144. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804725-5.00003-3>
11. Fang J.-Q. (Ed.) *Statistical methods for biomedical research*. Singapore: World Scientific Publishing, 2021. 1160 pp.
12. Padhee S., Ahmed S. Application of statistics in biomedical research. *J. Integr. Med. Res.* 2024;2(2):66–71. https://doi.org/10.4103/jimr.jimr_1_24
13. Ordak M., Paoletti G., Di Bona D., Sousa-Pinto B., Martini M., Bognanni A., Bousquet J., Canonica G.W. Statistical analysis in allergy and immunology: A review with practical examples. *Allergy.* 2025;80(10):2755–2766. <https://doi.org/10.1111/all.70013>
14. Khokhlov A.N. Some brief remarks on statistical significance and “trends” in gerontological research. *Adv. Gerontol.* 2025;15(4):298–301. <https://doi.org/10.1134/S2079057025600788>
15. Khokhlov A.N. Gerontology in the 21st century: From failures to advances. Hopefully. *Adv. Gerontol.* 2023;13(1):1–3. <https://doi.org/10.1134/S2079057024600289>
16. Khokhlov A.N. The renewed ‘Advances in gerontology’ 2025: Results, prospects, changing strategy. *Adv. Gerontol.* 2025;15(2):43–45. <https://doi.org/10.1134/S2079057025600429>
17. Kirpichnikov M.P., Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Our journal—2020: what and how we publish. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(1):1–6. <https://doi.org/10.3103/S0096392520010034>
18. Morgunova G.V., Khokhlov A.N. 75 years of the journal *Vestnik moskovskogo universiteta* and 45 years of its biological series. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(1):1–5. <https://doi.org/10.3103/S0096392522010023>
19. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Is it worth teaching biology students the basics of scientometrics and the instructions for the design of scientific articles, and if so, why? *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(3):77–82. <https://doi.org/10.3103/S0096392521030081>
20. Ермолаев-Томин О.Ю. *Математические методы в психологии: учебник для бакалавров*. 4-е изд., пер. и доп., М.: Издательство Юрайт, 2012. 511 с.
21. Benjamin D.J., Berger J.O., Johannesson M. et al. Redefine statistical significance, *Nat. Hum. Behav.* 2018;2(1):6–10. <https://doi.org/10.1038/s41562-017-0189-z>
22. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(4):185–190. <https://doi.org/10.3103/S0096392518040041>
23. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov, A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019;74(4):262–267. <https://doi.org/10.3103/S0096392519040060>
24. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Scientific publications – the bad, the good, for a fistful of dollars. *Sci. Ed. Publ.* 2021;6(1):59–67. <https://doi.org/10.24069/2542-0267-2021-1-59-67>
25. Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods.* 2009;41(4):1149–1160. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>
26. Palmore E.B. Predictors of the longevity difference: A 25-year follow-up, *The Gerontologist.* 1982;22(6):513–518. <https://doi.org/10.1093/geront/22.6.513>
27. Chaddock R.E. *Principles and methods of statistics*. Houghton Mifflin; 1925. xvi, 471 pp.
28. Khokhlov A.N. Why freshwater hydra does not get Alzheimer’s disease. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023; 78(3):198–204. <https://doi.org/10.3103/S0096392523700104>

Поступила в редакцию 02.09.2025

После доработки 20.11.2025

Принята в печать 05.12.2025

OPINION ARTICLE

Statistical analysis in biomedical research: From significance to “trends”?

A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Drawing on his many years of experience editing for biomedical journals and lecturing on scientific article formatting for PhD students at Lomonosov Moscow State University, the author analyzes the current state of statistical analysis of biological, biomedical, and medical research results — in particular, data obtained in studies aimed at discovering drugs that supposedly slow aging and suppress the development of age-related diseases. He emphasizes that in many cases, such analysis is either not performed at all or is performed incorrectly. Authors often analyze

data that does not follow a normal distribution using the parametric Student's t-test. Moreover, many researchers, having failed to obtain reliable results ($p > 0.05$), are increasingly replacing the term "significance" in their articles with "trend," which seems completely unacceptable. This problem affects not only biomedical but also other natural science research, but it is especially important for biomedicine, as it is at stake in human life and health. It is proposed that greater attention should be paid to this issue by both reviewers of relevant articles and editors of the journals in which they are published. Furthermore, the importance of teaching the basics of statistical processing of research results to undergraduate and graduate students in biological, biomedical, and medical institutes, as well as relevant university schools, is emphasized.

Keywords: *biomedical research, statistical analysis, parametric and nonparametric tests, sample sizes, survival curves, significance level, geroprotectors, experimental gerontology*

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторе

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ» В 2025 ГОДУ**

№ Стр.

Обзоры

<i>Абрамочкин Д.В., Джуманиязова И.Х., Пустовит О.Б., Филатова Т.С.</i> Адаптивные изменения электрической активности сердца эктотермных позвоночных при смене времен	2	53
<i>Звягина В.И., Шитикова А.М., Атрощенко М.М., Марсянова Ю.А., Бельских Э.С., Мельников Д.О.</i> Сигнальная роль отдельных митохондриальных метаболитов в регулировании митохондриального гомеостаза.....	3	137
<i>Малахов В.В., Ежова О.В., Ганцевич М.М.</i> Ectopharyngeata и Endopharyngeata вместо Protostomia и Deuterostomia?	4	219
<i>Силина М.В., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В.</i> Роль гипоксии и транскрипционных факторов HIF в развитии язвенного колита и ассоциированного с ним колоректального рака	2	65

Оригинальные исследования

<i>Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Шестакова Е.А.</i> Зависимость адаптации штамма <i>Glutamicibacter</i> sp. SMB32 к высокой солености среды от стадии роста и температуры.....	1	18
<i>Антонова Е.П., Илюха В.А., Якимова А.Е., Баишникова И.В., Ильина Т.Н.</i> Возрастные изменения тканевой антиоксидантной защиты у лесной мышовки (<i>Sicista betulina</i> , Rodentia) на северной периферии ареала обитания	2	80
<i>Баишникова И.В., Зайцева И.А., Калинина С.Н., Панченко Д.В., Ильина Т.Н.</i> Содержание ретинола и α -токоферола у представителей семейства Cervidae (Mammalia, Cetartiodactyla) на северо-западе России	4	251
<i>Булавин И.В., Калмыкова Д.И., Конобеев В.Д., Логвиненко Л.А., Шевчук О.М.</i> Особенности структуры стебля <i>Myrtus communis</i> и его гистохимический анализ.....	4	242
<i>Васюченко Е.П., Холина Е.Г., Федоров В.А., Страховская М.Г., Коваленко И.Б., Рубин А.Б.</i> Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виropином коронавируса SARS-CoV-2.....	2	96
<i>Горшкова О.П., Шуваева В.Н.</i> Изменения регуляции церебральных вазоактивных реакций при старении: вклад H ₂ S в cGMP-индуцированную дилатацию.....	2	89
<i>Граф А.В., Маслова М.В., Маклакова А.С.</i> Сравнительный анализ динамики моторного и пространственного обучения у животных, переживших пренатальную гипоксию	3	197
<i>Ершова Е.Г., Пименов В.Е., Гамова Н.С., Ершова М.А., Ашуркова Т.П.</i> История леса и современная флора Салтыковского лесопарка (ближайшее Подмосковье)	3	173
<i>Золотова Н.А., Кириллова М.В., Цветков И.С., Джалилова Д.Ш., Озерецкая Л.В., Добрынина М.Т., Макарова О.В.</i> Морфофункциональная характеристика модели острого умеренного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей	3	156
<i>Кабиольский И.А., Панасенков П.Д., Лобода А.В., Потапов С.В., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А.</i> Влияние ингаляций аргоном на поведение крыс в модели пренатальной алкогольной интоксикации	1	3
<i>Кочетова Э.С., Матвеева Д.К., Мелик-Пашаев А.Э., Романов Ю.А., Буравков С.В., Андреева Е.Р.</i> Структура коллагенового матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика: влияние условий культивирования	4	268

<i>Кривина Е.С.</i> Представители клалды <i>Chlorella</i> в техногенном озере Отстойник (Самарская область, Россия) в период самовосстановления.....	3	147
<i>Ловягина Е.Р., Локтюшкин А.В., Васильев Н.С., Семин Б.К.</i> Темновое химическое блокирование высокоаффинного Мп-связывающего участка фотосистемы 2 катионами Fe(II)	1	11
<i>Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А.</i> Корректирующее действие хитозана на параметры гемостаза в условиях гипокоагуляции, вызванной антиагрегантом клопидогрелем.....	1	36
<i>Малыгин М.В., Васенькова Л.А., Показаньева М.П., Киселева И.С.</i> Участие активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в формировании аэренхимы корня ячменя в условиях гипоксии.....	2	105
<i>Моцарь Е.В., Шевелева А.А., Шарко Ф.С., Михайленко А.П., Чирков С.Н.</i> Обнаружение и молекулярный анализ вируса мягкой зеленой мозаики табака на пионе <i>Raemonia wittmanniana</i>	4	262
<i>Пустовит О.Б., Кархов А.М., Кузьмин В.С.</i> Ключевые транскриптомные характеристики нативного ритмоводителя сердца крысы, их изменение при культивировании неонатальных кардиомиоцитов и использование для оценки пейсмекерной компетентности	4	229
<i>Силкин Ю.А., Силкин М.Ю., Силкина Е.Н., Омельченко С.О.</i> Экто-АТФазы, морфометрия и теплопродукционная активность эритроцитов хрящевых и костистых черноморских рыб.....	2	119
<i>Соловченко А.Е., Шурыгин Б.М., Селях И.О., Семенова Л.Р., Щербаков П.Н., Чивкунова О.Б., Лукьянов А.А., Михайлова Е.С., Крюк В.А., Лобакова Е.С.</i> Гиперспектральный мониторинг влияния средств защиты растений на состояние семян сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i> L.) при моделировании их ирригации карьерными сточными водами.....	1	26
<i>Тарасова Е.К., Лепеха Л.Н., Масютин А.Г., Щербакова Е.А., Ерохина М.В.</i> Активность белка-транспортера Р-гр в макрофагах человека усиливает эффект легочного сурфактанта как активатора фагоцитоза	3	182
<i>Хорунжий Г.Д., Егорова М.А., Фесенко З.С., Ефимова Е.В.</i> Сравнительное исследование слуховой чувствительности крыс линии Wistar и крыс-гетерозигот со сниженной экспрессией гена транспортера дофамина DAT-1	3	165
<i>Червицов Р.Н., Хрущев С.С., Фурсова П.В., Плюснина Т.Ю.</i> Оценка гетерогенности комплексов фотосистемы II клеток водорослей <i>Chlorella vulgaris</i> в условиях азотного голодания с использованием математической модели	3	190
<i>Черткова Н.Г., Костылев П.И., Усатов А.В., Калинина Н.В.</i> Идентификация генов энергии прорастания AG у дигиплоидных андрогенных растений риса	2	112

Статьи-мнения

<i>Бондарев А.Д., Тюрин-Кузьмин П.А.</i> Транскриптомика на уровне одиночных клеток в изучении функциональной гетерогенности жировой ткани: насколько сопоставимы животные модели и человек?	4	277
<i>Хохлов А.Н.</i> Определение старения: прошлое, настоящее и возможное будущее	3	206
<i>Хохлов А.Н.</i> Статистический анализ в биомедицинских исследованиях: от достоверности к «тенденциям»?	4	284

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская — в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии в 2023 г. составляет 0,892, показатель CiteScore 2023 (Scopus) англоязычной версии — 1,0.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полуторный, отступ — 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается шаблон статьи). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объемы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера**Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}**¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

*Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:***Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis****N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}**¹ Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;² Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: kolosova@mail.ru

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (без кавычек); год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название сборника*. Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Название издательства (без кавычек); год:страницы.

4) **Электронный ресурс.** *Название сайта* [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). [Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана].

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс]. *Название источника*. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

*Примеры оформления источников в списке литературы:***Статья в журнале:**

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*. 2021;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PloS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир.* 2020;12(6):1383–1395.

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 pp.

Рязанова Г.И. *Поведение насекомых*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of Arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile. *Plant Stem Cells: Methods and Protocols*, vol. 2094. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв. *Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.)*. Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии; 2013:174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс]. *IUCN Red List of Threatened Species*. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3*, его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно

пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвиговые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (<https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/>).

Полезные ссылки

Список сокращенных названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)