

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Чечехин Вадим Игоревич

Регуляция мультипотентных мезенхимных стромальных клеток
катехоламинами: сенситизация $\alpha 1$ -адренорецепторов, управление
фенотипом, возможное участие в развитии артериальной гипертензии,
вызванной ожирением

1.5.5 — Физиология человека и животных

1.5.4 — Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент Тюрин-Кузьмин П.А.

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор, академик РАН Ткачук В.А.

Москва – 2023

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение	7
Актуальность проблемы	7
Цель исследования	8
Задачи исследования	8
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость.....	9
Положения, выносимые на защиту.....	10
Апробация работы	10
Связь работы с научными программами	11
Структура и объем диссертации	11
1. Обзор литературы.....	12
1.1. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.....	12
1.1.1. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.....	14
1.1.2. Секреторная активность МСК.....	18
1.2. Гетерогенность мультипотентных стромальных клеток	19
1.3. Нейрогуморальная регуляция функциональной активности МСК	22
1.4. Регуляция рецепторной чувствительности МСК	28
1.5. Регуляция артериального давления	33
1.6. Механизмы развития артериальной гипертензии при ожирении	40
1.7. МСК в регенеративной медицине	42

2. Материалы и методы	48
2.1. Иммуногистохимический анализ экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани	48
2.2. Выделение первичной культуры МСК.....	49
2.3. Культивирование первичной культуры МСК.....	50
2.4. Ca^{2+} -сигнализация.....	51
2.5. Подготовка библиотек для анализа транскриптома одиночных клеток	53
2.6. Биоинформатический анализ транскриптома одиночных клеток	54
2.7. Контракция МСК-коллагеновых дисков	55
2.8. Иммунофлуоресцентный анализ локализации ПКА в одиночных клетках	56
2.9. Вестерн-блоттинг.....	57
2.10. ПЦР в реальном времени	59
2.11. CRISPR/Cas-опосредованный нокаут <i>ADRB2</i> и <i>ADRB3</i> в клетках ASC52telo ...	60
2.12. Статистический анализ	62
3. Результаты.....	63
3.1. Регуляция чувствительности МСК к норадреналину	63
3.2. Активация $\beta 3$ -адренорецепторов приводила к сенситизации МСК за счет повышения уровня $\alpha 1A$ -адренорецептора	65
3.3. Анализ сигнальных каскадов $\beta 3$ -адренорецепторов, ответственных за повышение уровня $\alpha 1A$ -адренорецепторов.....	69
3.4. Анализ транскриптома одиночных клеток при воздействии норадреналина после индуцированной сенситизации МСК	73
3.5. Действие норадреналина на сенситизированные МСК приводило к усилению контракции МСК-коллагеновых дисков	85

3.6. Анализ распределения $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани	86
3.7. МСК пациентов с ожирением, не страдающих артериальной гипертензией, не способны к норадреналин-зависимой сенситизации	87
3.8. Анализ распределения $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих и не страдающих артериальной гипертензией	90
4. Обсуждение	92
5. Выводы	97
6. Список литературы	98
7. Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах SCOPUS, WOS, RSCI	117

Список сокращений

АД - артериальное давление

AT1P – рецепторы ангиотензина 1 типа

AT2P – рецепторы ангиотензина 2 типа

АЦ – аденилатциклаза

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВНС – вегетативная нервная система

ГМК – гладкомышечные клетки

ГС – гиперактивация симпатической нервной системы

ДАД – диастолическое артериальное давление

ЖТ-МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани

КМ-МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

НС – нервная система

ОПСС – общее периферическое сосудистое сопротивление

ПКА – протеинкиназа А

ПКЦ – протеинкиназа Ц

РАС – ренин-ангиотензиновая система

САД – систолическое артериальное давление

СНС – симпатическая нервная система

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ACTG2 – ген γ -гладкомышечного актина

ACTA2 – ген α -гладкомышечного актина

ADRB2 – ген β 2-адренорецептора

ADRB3 – ген β 3-адренорецептора

CNN1 – ген кальпонина 1 типа

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

ERK – регулируемая внеклеточным сигналом протеинкиназа

FFAR2 – рецептор жирных кислот 2 типа

GPCR – G-белок ассоциированные рецепторы

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

IL – интерлейкин

MMP – матриксные металлопротеиназы

MRTFs – миокардин-зависимые транскрипционные факторы

MYL9 – легкая цепь миозина 9 типа

MYLK – ген киназы легких цепей миозина

MYOCD – ген миокардина

PBS – фосфатный буфер

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PDGFR β – β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста

PPAR γ – γ -рецептор-активатор пролиферации пероксисом

SRF – фактор реагирования на сыворотку

TAGLN – ген трансгеллина

TGF- β – Трансформирующий фактор роста- β

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

α -SMA – α -гладкомышечный актин

Введение

Актуальность проблемы

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в строме большинства тканей организма человека и участвуют в процессах поддержания гомеостаза, репарации и регенерации тканей. Данные функции МСК осуществляют в основном за счет секреции множества факторов роста и цитокинов, а также путем дифференцировки в другие типы клеток. МСК могут *in vivo* дифференцироваться в адипоциты, остеобласты и хондробласты. Следовательно МСК являются ключевыми участниками обновления жировой, костной и хрящевой ткани. Если нарушение обновления костной и хрящевой ткани в основном являются следствием возрастных изменений, то для жировой основной причиной является ожирение. Ожирение характеризуется избыточным ростом жировой ткани вследствие повышенного потребления калорий. При этом возникает нарушение функциональной активности МСК, что в итоге приводит к нарушению обновления адипоцитов.

Ожирение в свою очередь является причиной развития ряда сопутствующих заболеваний и патологических состояний. Ожирение приводит к нарушению функциональной активности не только МСК, но и самих адипоцитов и клеток иммунной системы. Активация иммунных клеток вызывает развитие местного хронического воспаления жировой ткани. Хроническое воспаление наряду с повышением уровня циркулирующих свободных жирных кислот приводит к развитию инсулинорезистентности и сахарного диабета 2 типа [4, 73, 204]. А нарушение функциональной активности адипоцитов приводит к повышению секреции лептина, ангиотензиногена и падению выработки адипонектина. Снижение уровня адипонектина ускоряет развитие атеросклероза и, как следствие, ишемических поражений различных органов и тканей, например, инсульт и инфаркт миокарда. Повышение уровня лептина ассоциировано с развитием гиперактивации симпатической нервной системы за счет стимуляции рецепторов нейронов гипоталамуса [78]. Гиперактивация симпатической нервной системы является одним из ведущих механизмов развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. При этом артериальная гипертензия является одним из наиболее распространенных осложнений развития ожирения [38]. Механизм развития артериальной гипертензии при ожирении в современной литературе представляется следствием повышения выделения катехоламинов и других вазоконстрикторов при постоянной гиперактивации симпатической нервной системы. Увеличение уровня вазоконстрикторов, в особенности катехоламинов, сопровождается повышением тонуса мелких артерий и артериол, вследствие вазоконстрикции и ремоделирования стенок сосудов. Повышение тонуса сосудов приводит к закономерному увеличению общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС). Повышение ОПСС приводит к развитию артериальной

гипертензии. Однако имеется ряд нестыковок в простом механизме развития артериальной гипертензии при ожирении. У части пациентов, длительно страдающих от ожирения, не развивается артериальная гипертензия [136]. При этом гиперактивация симпатической нервной системы развивается почти у всех пациентов с ожирением [49]. Мишенями симпатической нервной системы в сосудах, согласно литературным данным, являются гладкомышечные клетки и перicytes, которые входят в популяцию МСК. В данной работе было выдвинуто предположение, что различия в реакции пациентов на повышение активности симпатической нервной системы лежат на клеточном уровне, а именно в популяции МСК. Для выяснения различия в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением необходимо более детально изучить сигнальные механизмы регуляции функциональной активности МСК катехоламинами, а именно норадреналина как основного нейромедиатора симпатической нервной системы.

Цель исследования:

Установить молекулярные механизмы регуляции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток катехоламинами.

Задачи исследования:

1. Установить сигнальные каскады, активация которых приводит к адренергической сенситизации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы.
2. Проанализировать влияние норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на транскриптом мультипотентных стромальных клеток на уровне одиночных клеток.
3. Исследовать контрактильность мультипотентных стромальных клеток после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы.
4. Исследовать адренергическую сигнализацию в ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы в одиночных мультипотентных мезенхимных стромальных клетках пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, и пациентов с ожирением, но без артериальной гипертензии.
5. Сравнить экспрессию $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудистых клетках жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, и пациентов с ожирением, но без артериальной гипертензии.

Научная новизна

В рамках данной работы впервые проведено исследование участия МСК жировой ткани в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Установлено, что МСК в сосудах

жировой ткани непосредственно иннервированы окончаниями симпатической нервной системы. Изучен механизм норадреналин-зависимого повышения чувствительности клеток к катехоламинам и временные характеристики данного феномена. Обнаружено, что норадреналин-зависимое повышение чувствительности МСК к катехоламинам вызвано увеличением экспрессии функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Также установлено, что механизм норадреналин-зависимого повышения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов зависит от активации $\beta 3$ -адренорецепторов и сигнального каскада Gs/аденилатциклаза/цАМФ/протеинкиназа А. При этом повышение экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецептора сопряжено с трансляцией белка рецептора, и не связано с изменением транскрипции и уровня мРНК рецептора. Кроме того, было показано, что $\beta 3$ -адренорецепторы в сосудах жировой ткани локализуются на МСК, а не на других сосудистых клетках. В результате анализа транскриптома одиночных клеток впервые показано, что при воздействии норадреналина после повышения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов МСК переходят в ГМК-подобный фенотип. Изменения транскриптома были подтверждены функциональным тестом на способность МСК к контракции на модели МСК-коллагеновых дисков.

Было продемонстрировано наличие связи между способностью МСК к норадреналин-зависимому повышению экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов и наличием артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. При этом МСК пациентов с ожирением и артериальной гипертензией обладают норадреналин-зависимым механизмом повышения чувствительности к катехоламинам, а МСК пациентов с ожирением без артериальной гипертензии - нет. Кроме того, обнаружены различия в локализации $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани пациентов с ожирением. Было показано, что у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы локализуются только на МСК, тогда как у пациентов с ожирением и артериальной гипертензией $\alpha 1A$ -адренорецепторы также обнаруживаются на α -SMA экспрессирующих клетках. Результаты данной работы указывают на новый механизм развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением.

Теоретическая и практическая значимость

Данная работа расширяет понимание патологических механизмов развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Материалы диссертации показывают участие стволовых клеток и изменение их фенотипа под действием норадреналина при артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. МСК и уникальный феномен повышения чувствительности к норадреналину могут стать одной из терапевтических мишеней для разработки новых методов лечения пациентов с ожирением и артериальной гипертензией. Применение ингибиторов $\beta 3$ -

адренорецепторов может быть перспективным для блокирования развития патологического механизма повышения чувствительности сосудов к норадреналину при ожирении.

Положения, выносимые на защиту

1. При моделировании гиперактивации симпатической нервной системы в культуре МСК повышается чувствительность клеток к норадреналину за счет повышения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов.
2. Повышение чувствительности МСК к норадреналину осуществляется за счет активации сигнального каскада $\beta 3$ -АР/АЦ/цАМФ/ПКА и повышения трансляции молекул рецептора, но не транскрипции его мРНК.
3. Воздействие норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на МСК приводит к переходу клеток в ГМК-подобный фенотип. Переход МСК в ГМК-подобный фенотип приводит к повышению контрактильности клеток.
4. У пациентов с ожирением и артериальной гипертензией моделирование гиперактивации симпатической нервной системы вызывает повышение чувствительности МСК к норадреналину. У пациентов с ожирением без артериальной гипертензии моделирование гиперактивации симпатической нервной системы не влияет на чувствительность МСК к норадреналину.
5. У пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы выявляются в перицитах, но не в гладкомышечных клетках. У пациентов с ожирением и артериальной гипертензией $\alpha 1A$ -адренорецепторы выявляются не только в перицитах, но и в гладкомышечных клетках.

Апробация работы

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 30.03.2023 г. на расширенном заседании кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины и института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты диссертации были представлены на научных конференциях: III Объединенный Научный Форум (Сочи, 2022), IV научно-практическая школа «Анализ отдельных клеток» (Томск, 2022), II Объединенный Научный Форум (Дагомыс, 2019), IX (XXVIII) Национальный диабетологический конгресс «Сахарный диабет и ожирение – неинфекционные междисциплинарные пандемии XXI века» (Москва, 2022), IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Публикации

По материалам работы опубликованы 8 статей в рецензируемых журналах, соответствующих перечню ВАК, из них 4 статьи, входящих в Q1, 10 тезисов докладов и материалов конференций и 9 статей в сборниках.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в рамках грантов РНФ № 19-75-30007-П и 21-15-00311.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 117 страницах машинописного текста, результаты проиллюстрированы 29 рисунками и 6 таблицами. Список литературы содержит 217 источников.

1. Обзор литературы

1.1. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются одними из самых распространенных в организме постнатальных стволовых клеток. МСК выявляются в периваскулярном пространстве стромы практически всех тканей организма человека. Эти клетки впервые открыты в 1960-х годах А.Я. Фриденштейном. Он назвал их колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕ-Ф). Позже они получили название МСК, и 2006 году международным обществом клеточной терапии консенсусно принято их определение (Рис. 1) [20]. По этому определению МСК представляют собой веретеновидные клетки, способные адгезировать к пластику и дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты. Эти клетки характеризуются экспрессией маркеров мезенхимных клеток, таких как CD73, CD90, CD105, и отсутствием маркеров гемопоэтических клеток CD11a/b/c, CD14, CD45, HLA-DR [35].

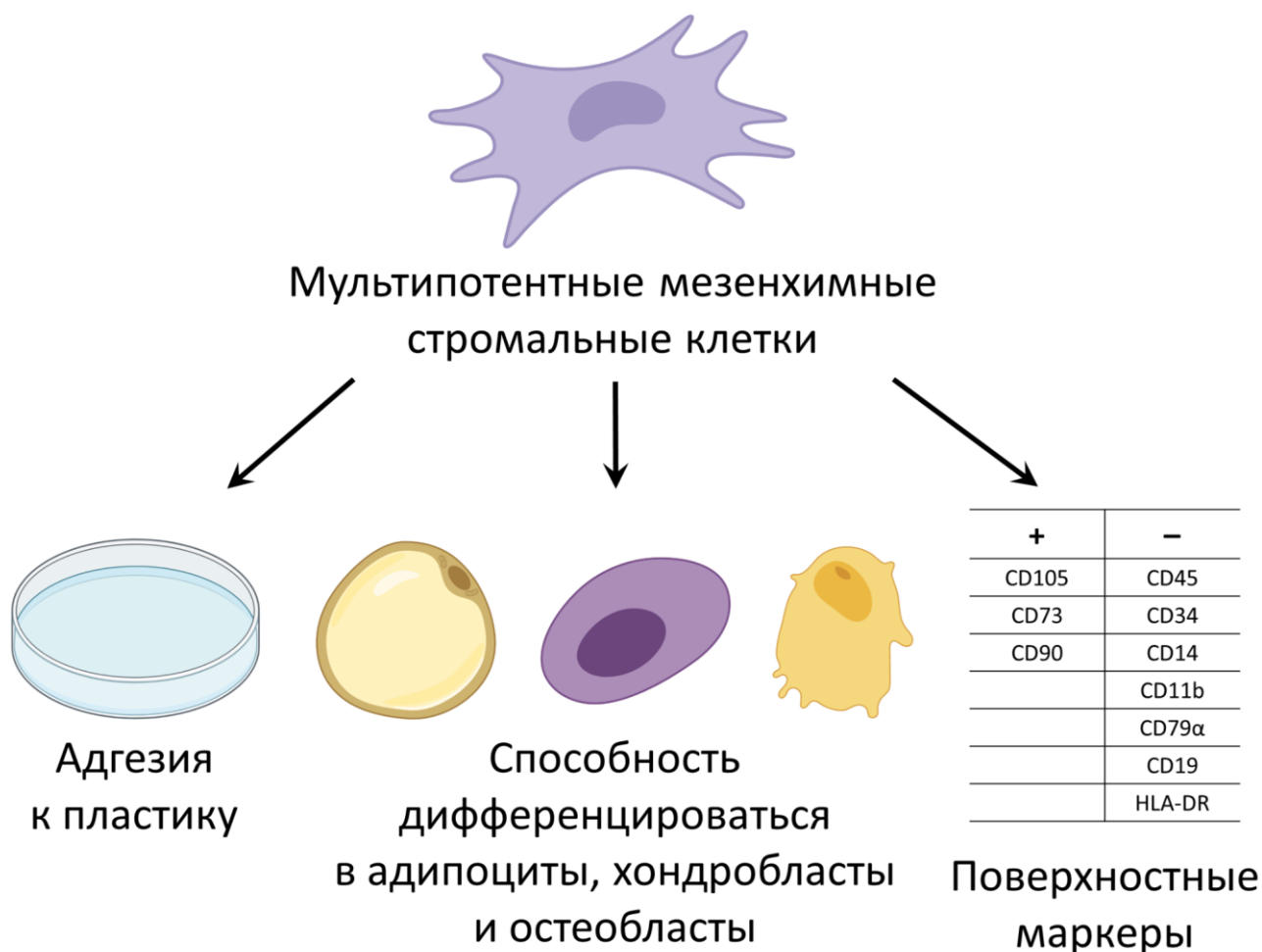


Рисунок 1. Минимальные критерии МСК, разработанные международным обществом клеточной терапии (ISCT) [35].

МСК являются ключевыми компонентами стромы тканей. В понятие «стромы» в данном случае следует включать не только внеклеточный матрикс, формирующий физические свойства ткани, но и клетки, которые синтезируют ВКМ, а также регуляторные клетки, которые паракринно на сигнальном уровне поддерживают гомеостаз ткани за счет регуляции функции тканеспецифических стволовых и терминально дифференцированных клеток. МСК также участвуют в процессах репарации, регенерации и обновления тканей. Данные функции МСК осуществляют за счет секреции множества факторов роста и путем дифференцировки в другие типы клеток (Рис. 2) [79].

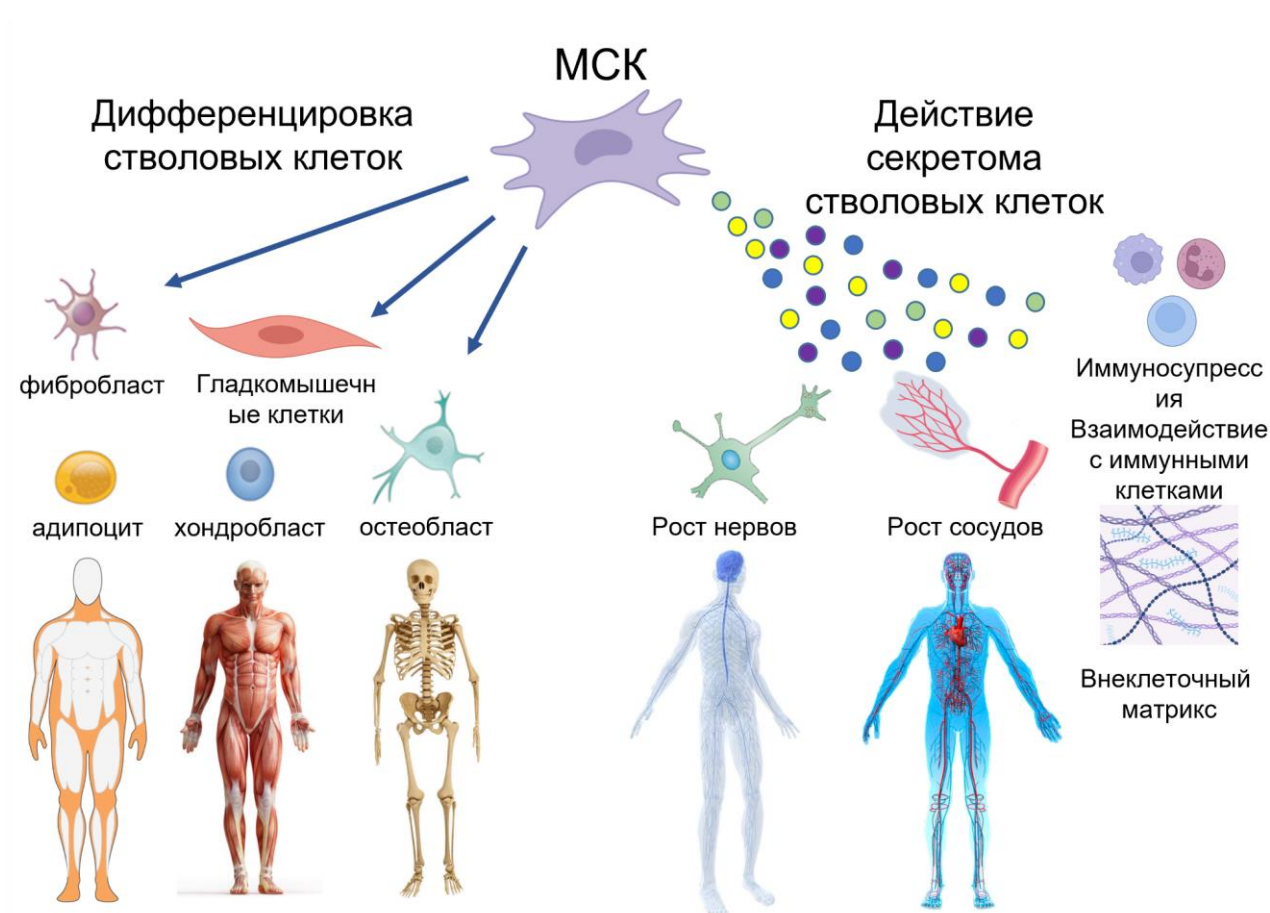


Рисунок 2. Функции МСК и их основные участники.

По определению МСК являются предшественниками остеобластов, адипоцитов и хондробластов, однако, показано, что данные клетки могут дифференцироваться также в фибробласты и гладкомышечные клетки. Стоит отметить, что в нормальных условиях здорового функционирования организма *in vivo* МСК одной ниши реализуют ограниченное количество направлений дифференцировки, соответствующих данной нише. Так, например, МСК жировой ткани (ЖТ-МСК) в здоровом организме не дифференцируются в остеогенном и хондрогенном направлениях. Вероятно, ограниченность направлений дифференцировки *in vivo* обусловлена микроокружением МСК в ткани.

1.1.1. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Дифференцировка МСК *in vivo* представляет собой механизм физиологического обновления тканей мезенхимного происхождения. Так, например, дифференцировка МСК в адипоциты способствует обновлению жировой ткани. Ежегодно порядка 10% адипоцитов заменяется на новые [13]. Одним из наиболее социально и медицински значимых заболеваний, ассоциированных с нарушением нормального обновления жировой ткани, является ожирение. Накопление липидов в адипоцитах при ожирении приводит к развитию инсулинорезистентности и изменению секреторного профиля клеток. Увеличение объема жировой ткани ассоциировано с развитием гипоксии, что дополнительно нарушает функционирование адипоцитов и вызывает их гибель. Помимо изменений адипоцитов при ожирении также нарушается функционирование иммунных клеток, расположенных в жировой ткани. В жировой ткани развивается хроническое воспаление, характеризующееся повышением количества и активности макрофагов, что приводит к окислительному стрессу. Повышение активности иммунных клеток, окислительный стресс, гипоксия и гибель клеток приводят к дисфункции МСК, а именно к снижению их дифференцировочного потенциала [92, 104].

Для изучения факторов, влияющих на адипогенную дифференцировку МСК, и нарушений, возникающих в клетках при развитии ожирения, была разработана *in vitro* модель. Дифференцировка МСК в адипогенном направлении *in vitro* происходит при действии глюкокортикоидов, 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) и инсулина, который является основным регулятором адипогенеза *in vivo* [29]. При помощи данной модели были определены ключевые мастер-регуляторы адипогенной дифференцировки МСК в адипоциты. Было продемонстрировано, что применение IBMX, неселективного ингибитора фосфодиэстераз (ФДЭ) необходимо для запуска C/EBP β . В норме фосфодиэстеразы гидролизуют цАМФ, что снижает активацию протеинкиназы А. А ингибирование ФДЭ приводит к повышению внутриклеточного уровня цАМФ, что задерживает протеинкиназу А в активированном состоянии. Протеинкиназа А фосфорилирует и активирует CREB и KLF4, которые запускают C/EBP β . Глюкокортикоиды запускают транскрипцию C/EBP β , C/EBP δ и PPAR γ , являющихся ключевыми участниками адипогенеза. Инсулин воздействует на SREBP-1c и блокирует FOXO1, что активирует PPAR γ . C/EBP β и C/EBP δ являются ранними генами адипогенеза – активируются в первые часы дифференцировки и запускают транскрипцию генов метаболизма глюкозы, трансляции белка, клеточного цикла и мастер-регуляторов адипогенной дифференцировки C/EBP α и PPAR γ (Рис. 3). C/EBP α и PPAR γ активируются в течение 2-6 дней и запускают гены метаболизма липидов (*LPL*, *FABP4*), образования митохондрий и метаболизма глюкозы (*PEPCK*, *GLUT4*) и другие гены адипогенеза (*ADIPOQ*, *LEP*); деление клеток при этом останавливается [9, 34, 149, 174]. В

результате адипогенной дифференцировки клетки приобретают фенотип адипоцитов, то есть набирают жировые капли, состоящие из триацилглицеридов, приобретают шарообразную форму, открепляются от культуральной чашки и начинают экспрессировать метаболическую машинерию синтеза и распада нейтральных липидов. При этом даже сочетание таких мощных адипогенных стимулов как инсулин и глюкокортикоиды не всегда может запустить дифференцировку МСК. МСК пожилых пациентов или больных ожирением плохо дифференцируются в адипогенном направлении. Это связывают с ослаблением экспрессии генов стволовости (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и других) и возникновением инсулинорезистентности клеток [104, 194]. Инсулинорезистентность блокирует способность МСК воспринимать инсулин, являющийся *in vivo* главным фактором, запускающим адипогенез. Для того чтобы заставить такие клетки дифференцироваться, часто применяют тиазолидиндионы. Тиазолидиндионы являются прямыми активаторами PPAR γ и используются для лечения сахарного диабета 2 типа, который развивается как осложнение ожирения. Помимо участия в адипогенезе, PPAR γ является одним из ключевых регуляторов инсулиновой чувствительности и метаболизма глюкозы в жировой ткани. Тиазолидиндионы могут быть частью коктейля для адипогенной дифференцировки МСК поздних пассажей или клеток, резистентных к стандартному адипогенному коктейлю [166]. Тиазолидиндионы превращают МСК в адипоциты, даже если в клетках нарушены нормальные механизмы, запускающие дифференцировку, как это происходит при ожирении.

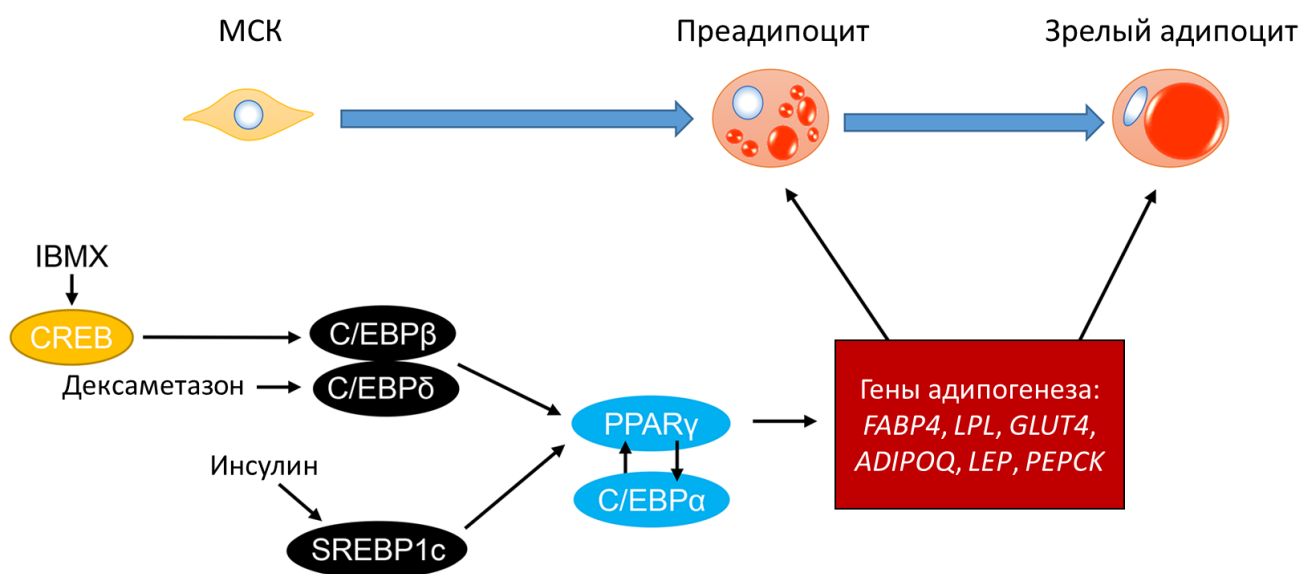


Рисунок 3. Регуляция адипогенной дифференцировки МСК.

Превращение в остеобласты является вторым направлением дифференцировки МСК, показанным *in vivo*. Ключевым мастер-регулятором остеогенеза является транскрипционный фактор RUNX2, который вместе с CBF β запускает экспрессию белков, специфичных для остеогенеза, коллагена 1 типа, щелочной фосфатазы, остеопонтина, остеокальцина и костного сиалопротеина. При этом RUNX2 запускается одним из первых при остеогенезе. Однако активности одного RUNX2 недостаточно для образования остеобластов из МСК. Для остеогенеза также необходим транскрипционный фактор Sp7 или остерикс (OSX). Sp7 ингибирует хондрогенную дифференцировку МСК и вместе с RUNX2 запускает поздние стадии превращения клеток в остеобласты. В отсутствие Sp7 ранние предшественники остеобластов превращаются в хондробласты [9, 175]. Одним из ключевых регуляторов последних этапов остеогенной дифференцировки МСК является ATF4, который, как и RUNX2, участвует в активации экспрессии Sp7 и костного сиалопротеина [26]. Для дифференцировки МСК в остеобласты также предложена модель *in vitro*. Так, остеогенная дифференцировка МСК осуществляется при действии дексаметазона, глицерол-2-фосфата и аскорбиновой кислоты [29]. При этом дифференцировка МСК в остеобласты *in vitro* не проходит при простой стимуляции транскрипционных факторов. Критически важным является наличие внеклеточного матрикса из коллагена и/или фибронектина. В связи с этим для запуска остеогенной дифференцировки культуральные чашки перед высаживанием клеток покрывают фибронектином или коллагеном [8, 142]. Однако возможен и другой подход, который не предполагает покрытие чашек белками внеклеточного матрикса. Обычно достаточно высадить клетки на чашки за 2-3 дня до запуска остеогенной дифференцировки. За это время МСК успевают наработать достаточное количество внеклеточного матрикса для ускорения остеогенеза. То есть клетки не способны дифференцироваться в остеобласты без подложки из ВКМ. Вероятно, данный феномен имеет место и *in vivo*. Остеогенная и адипогенная дифференцировка являются во многом антагонистичными и ингибируют друг друга. Так, если запускать адипогенную дифференцировку, происходит снижение активности RUNX2. И наоборот, при запуске остеогенной дифференцировки происходит подавление активности PPAR γ [43].

Третьим направлением дифференцировки МСК, показанным *in vivo*, является превращение в хондробласты. Основным транскрипционным фактором, запускающим хондрогенную дифференцировку МСК, является SOX9. Активация SOX9 приводит к запуску транскрипции маркеров хондрогенеза, таких как коллаген 2 и 9 типов, агрекан и олигомерный матриксный белок хряща. Помимо SOX9 в хондрогенной дифференцировке также принимают участие SOX5 и SOX6. Гетеродимеры SOX5 и SOX6 прикрепляются к энхансерам специфичных для хрящевой ткани генов рядом с гомодимерами SOX9 и тем самым усиливают хондрогенную

дифференцировку МСК. Эти данные подтверждаются результатами экспериментов по нокауту этих генов на мышах и анализа спорадических мутаций у человека. Так, гетерозиготная мутация гена *SOX9* приводит к развитию тяжелых мальформаций хрящевой ткани. Гетерозиготные мыши по *SOX5* или *SOX6* имеют небольшие мальформации в хрящах, однако полный нокаут приводит к внутриутробной смерти с тяжелой формой хондродисплазии. Гомозиготные мутации *SOX5* и *SOX6* у человека не связаны с развитием тяжелых мальформаций хрящевой ткани, но ассоциированы с низким ростом [102]. Вероятно, это связано с нарушением внутриутробного роста хрящевой ткани скелета или постнатального роста метафизарного хряща перед его окостенением. Хондрогенная дифференцировка МСК в модельной системе *in vitro* запускается при действии глюкокортикоидов (дексаметазон), аскорбиновой кислоты и TGF- β [29].

Модели остеогенной и хондрогенной дифференцировки могут быть использованы для изучения заболеваний, связанных с нарушением обновления и/или регенерации костей и хрящей, например, переломы у пожилых людей или формирование ложного сустава.

Модель дифференцировки МСК в ГМК-подобные клетки в основном включает действие на клетки TGF- β 1 [22]. TGF- β 1 ингибирует пролиферацию МСК и запускает экспрессию маркеров гладкомышечных клеток, таких как кальпонин, α -гладкомышечный актин и тяжелая цепь миозина. Действие TGF- β опосредуется активацией гетеротетрамеров T β RI, T β RII и T β RIII. T β RI, также известный как ALK5, фосфорилирует и запускает транскрипционные факторы SMAD2 и SMAD3, отвечающие за ранние этапы дифференцировки в ГМК-подобные клетки. На поздних этапах дифференцировки активируются RhoA киназа и транскрипционные факторы GATA6, SRF и MRTFs (миокардин-зависимые транскрипционные факторы) [9, 55]. В дифференцировке МСК в ГМК-подобные клетки также принимают участие мембранные рецепторы PDGF (PDGFR β), сфингозин-1-фосфата (S1PR1) и ангиотензина 2 (AT2R) [107]. S1PR1 и AT2R представляют собой Gi-белок ассоциированные рецепторы, которые по классическому пути ингибируют цАМФ-зависимый сигнальный каскад. Помимо классических сигнальных каскадов активация этих рецепторов также приводит к запуску ERK-зависимого сигнального каскада, активирующего MRTFs (миокардин-зависимые транскрипционные факторы). PDGFR β относится к семейству рецепторных тирозинкиназ и также может запускать ERK-опосредованную активацию MRTFs [100]. MRTFs совместно с SRF запускают экспрессию маркеров гладкомышечной дифференцировки (SM22, α -гладкомышечный актин и др.). Таким образом, МСК могут дифференцироваться не только в адипоциты, остеобласты и хондробласты, но и в ГМК-подобные клетки. Такая дифференцировка МСК напрямую не показана *in vivo*, но и не исключена. Превращение МСК в ГМК-подобные клетки может играть важную роль в развитии ряда патологий сосудов, например, артериальной гипертензии и атеросклероза.

1.1.2. Секреторная активность МСК

Критически важным фактором регуляции обновления и поддержания гомеостаза органов и тканей является секреторная активность МСК. За счет секреции большого разнообразия сигнальных паракринных веществ МСК взаимодействуют с другими клетками ткани, регулируя их функции. А синтез и секреция белков внеклеточного матрикса и матриксных металлопротеиназ позволяет МСК создавать и обновлять структуру ткани. Перечень секретируемых МСК веществ изменяется в зависимости от функционального состояния этих клеток и воздействующих на них гормонов [52, 81]. Основную роль в регуляции функций клеток играют сигнальные молекулы, в первую очередь, белки, и внеклеточные везикулы. Основную часть сигнальных белков, секретируемых МСК, составляют факторы роста и цитокины [54].

Кроме того, клетки взаимодействуют при помощи внеклеточных везикул, которые представляют собой ограниченные мембраной везикулы, секретируемые клетками во внеклеточное пространство, диаметром от 30 до 1000 нм. Основные свои функции внеклеточные везикулы осуществляют за счет расположенных внутри них мРНК, микроРНК и белков. МикроРНК и мРНК регулируют функциональную активность клеток-мишеней за счет изменения уровня экспрессии множества белков [90].

В составе внеклеточных везикул и в свободном виде МСК секретируют VEGF, EGF, HGF, TGF- β , GM-CSF, IL-3,6,10, IGF-1, KGF, PDGF, SDF-1 и прочие белки, участвующие в регуляции функциональной активности ткани и поддержании её гомеостаза [152]. Белки и другие молекулы, секретируемые МСК, регулируют множество различных процессов в ткани. Так, например, за счет экспрессии VEGF, EPO и ангиопоэтина 1 типа МСК регулируют ангиогенез, что имеет большое значение при регенерации или во время роста ткани, как, например, при ожирении. За счет секреции нейротрофических факторов (BDNF, GDNF и NT-3) МСК способны регулировать нейрогенез и осуществлять нейропротективные функции [181]. Это также важно при росте жировой ткани при ожирении. За счет секреции иммуномодулирующих факторов, таких как IL-10, IL-6, IDO, PD-L1, TGF- β и LIF, МСК проявляют иммуносупрессивную активность. МСК ингибируют активацию и пролиферацию натуральных киллеров, Т- и В-лимфоцитов, а также привлекают клетки, ингибирующие воспаление, например, регуляторные Т-лимфоциты и макрофаги М2 типа. Помимо этого, секретом МСК способствует превращению классических моноцитов в иммунорегулирующие моноциты, секретирующие множество противовоспалительных факторов (IL-10, CCL-18, TGF- β 1) [200]. Иммуносупрессивный эффект МСК напрямую зависит от активности воспаления. Чем активнее воспаление, тем сильнее иммуносупрессивное действие МСК [27, 46, 160, 192]. Таким образом, МСК секретируют

большое количество разнообразных факторов, за счет чего поддерживают гомеостаз тканей и принимают участие в патологических процессах.

Ожирение ассоциировано не только с проблемами с дифференцировкой МСК в новые адипоциты, но и ведет к нарушению секреторной активности этих клеток. Имеются данные, указывающие на нарушение ангиогенного и иммуномодулирующего потенциала МСК при развитии ожирения. Вероятно, это является следствием хронического воспаления и нарушения функций адипоцитов при ожирении. Ослабление иммуномодулирующих функций МСК дополнительно усиливает хроническое воспаление, что приводит к формированию патологической петли с положительной обратной связью [104].

МСК играют ключевую роль в построении и поддержании элементов внеклеточного матрикса, что также входит в их секреторную активность. Это имеет особое значение при ожирении, которое является одним из немногих не онкологических заболеваний, ассоциированных с ростом ткани. Рост жировой ткани требует значительного увеличения объема внеклеточного матрикса, который требуется для окружения новых сосудов, стромальных клеток и адипоцитов [15]. МСК секретируют различные коллагены (COL6A2, COL4A2, COL6A1, COL10A1, COL5A2, COL15A1, COL8A1, COL11A1, COL1A1, COL3A1 и другие), ламинины (LAMA2, LAMA4, LAMB), фибронектин и прочие белки ВКМ. Помимо секреции белков ВКМ МСК также должны активно разрушать белки матрикса. МСК осуществляют это за счет секреции матриксных металлопротеиназ. Клетки синтезируют MMP1, MMP2, MMP9 и другие металлопротеиназы и затем активируют их на своей поверхности. Также МСК на своей клеточной мембране активируют экзогенные металлопротеиназы, синтезируемые другими клетками. А для регуляции растворимых MMP эти клетки синтезируют тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) [11, 105]. Таким образом, МСК концентрируют активность металлопротеиназ на своей поверхности. В частности, это позволяет МСК легко перемещаться в тканях между другими клетками. А за счет секреции белков ВКМ МСК восстанавливают внеклеточные компоненты стромы тканей, которые разрушили при своей миграции. Важно отметить, что активность матриксных металлопротеиназ не ограничивается участием в миграции МСК, они также участвуют в процессах дифференцировки, пролиферации и контроля ангиогенеза в ткани [10].

1.2. Гетерогенность мультипотентных стромальных клеток

Несмотря на имеющееся достаточно строгое определение, МСК представляют собой в функциональном плане крайне гетерогенную популяцию [197]. Гетерогенность этих клеток можно разделить на 3 уровня: гетерогенность на уровне донора клеточного материала, на уровне

тканей и на уровне одиночных клеток. Наиболее очевидными являются различия в популяциях МСК, полученных от мужчин и женщин [134]. Так, группа Ричарда Шефера показала, что у женщин больше количество CD119+, CD130+ клеток, чем у мужчин. А у мужчин МСК в среднем имеют больший размер, но делятся медленнее, чем клетки, полученные от женщин [173]. Также, некоторые исследования указывают на то, что МСК, полученные от женщин, имеют большее время удвоения популяции и могут пассироваться в культуре дольше [84, 167]. От возраста доноров также могут зависеть фенотипические свойства МСК, например, доля клеток, позитивных по различным маркерам, и скорость пролиферации. Так, с возрастом в МСК костного мозга (КМ-МСК) уменьшается количество CD71+, CD146+, CD274+ клеток [173]. А группа ученых из университета Ханнемана показала, что клетки, полученные из костного мозга гребня подвздошной кости у 17 здоровых доноров, имеют различную скорость пролиферации, уровень активности щелочной фосфатазы и способность к остеогенной дифференцировке [135]. С увеличением возраста доноров-женщин также значительно быстрее замедляется деление клеток в культуре и ухудшается адипогенная дифференцировка МСК, по сравнению с МСК, полученными от доноров мужчин. При этом способность к остеогенной и хондрогенной дифференцировке не меняется ни у мужчин, ни у женщин в возрасте от 18 до 90 лет [167]. Но костномозговые МСК, полученные от детей до 12 лет, обладают намного большим остеогенным потенциалом, чем клетки доноров в возрасте от 25 до 50 лет [211].

Помимо различий между клетками на уровне доноров клеточного материала также имеется разница в свойствах МСК, полученных из разных тканей. Показано, что МСК, выделенные из пуповины, и костномозговые МСК имеют много схожих характеристик, а именно фибробластоподобную морфологию, иммунофенотип, потенциал остеогенной дифференцировки. Однако скорость пролиферации и уровень экспрессии CD106 у МСК, полученных из пуповины, намного выше [197]. При сравнении пролиферативных, дифференцировочных и секреторных свойств ЖТ-МСК, КМ-МСК и МСК из пуповины было обнаружено множество существенных отличий. Самую высокую скорость пролиферации имеют клетки, полученные из пуповины. Намного хуже пролиферируют ЖТ-МСК. Пролиферативный потенциал КМ-МСК находится на третьем месте. ЖТ-МСК и КМ-МСК лучше проходят адипогенную дифференцировку, чем клетки из пуповины. МСК различных тканей также имеют отличный профиль секреции цитокинов и белков внеклеточного матрикса. Так, например, МСР-1 больше всего секретируют МСК пуповины, в 9,6 и 17,2 раза больше, чем ЖТ-МСК и КМ-МСК соответственно. ЖТ-МСК имеют более высокий профиль секреции IGF-1, VEGF, IL-8 по сравнению с КМ-МСК [11]. А МСК из кожи экспрессируют более высокие уровни лептина, МСР-2 и МСР-3 по сравнению с ЖТ-МСК и КМ-МСК [67]. Различия в секреторном профиле МСК

разных тканей определяют отличия в функциях клеток. Так, ЖТ-МСК обладают выраженным противовоспалительным действием, тогда как МСК из пуповины, напротив, часто проявляют провоспалительный эффект [11].

Помимо различий на уровне доноров и тканей также накапливается все больше данных, указывающих на высокую гетерогенность между одиночными МСК, выделенными из одной ткани. Например, в популяцию ЖТ-МСК, вероятно, входят коммитированные преадипоциты, мультипотентные стволовые клетки жировой ткани, перициты и гладкомышечные клетки [117]. Однако секреторный фенотип этих клеток, способность дифференцироваться и переходить друг в друга, а также ряд других характеристик остаются слабо исследованными. Развитие методов изучения одиночных клеток указывает на наличие нескольких субпопуляций в культуре МСК, отличающихся по секреторному фенотипу, экспрессии поверхностных маркеров, рецепторной чувствительности и прочим функциям. Основываясь на уровне экспрессии генов в одиночных клетках, популяцию МСК *in vitro* можно разделить на несколько функциональных субпопуляций. Это делящиеся клетки (на Рис. 4 они обозначены как субпопуляции C2, C6), ВКМ-синтезирующие клетки (C3), сократительные (C8), синтетические (C0), клетки, опосредующие нейрогенез (C7), и рецепторные клетки (C11), воспринимающие гормональные и паракринные сигналы (C10) [199]. В ВКМ-синтезирующих клетках повышена экспрессия мРНК компонентов внеклеточного матрикса. Сократительные клетки характеризуются экспрессией *ACTG2* и *PPP1R14A*. В синтетических клетках повышена экспрессия белков рибосом и синтеза мРНК. Рецепторные клетки обладают повышенной экспрессией белков сигнальных каскадов. Однако различия в профиле экспрессии мРНК этих субпопуляций не описывают их функциональные характеристики. Для подтверждения функциональных различий между отдельными клетками необходимо применять другие методы, например, иммуноцитохимический анализ, проточную цитометрию, прижизненную микроскопию.

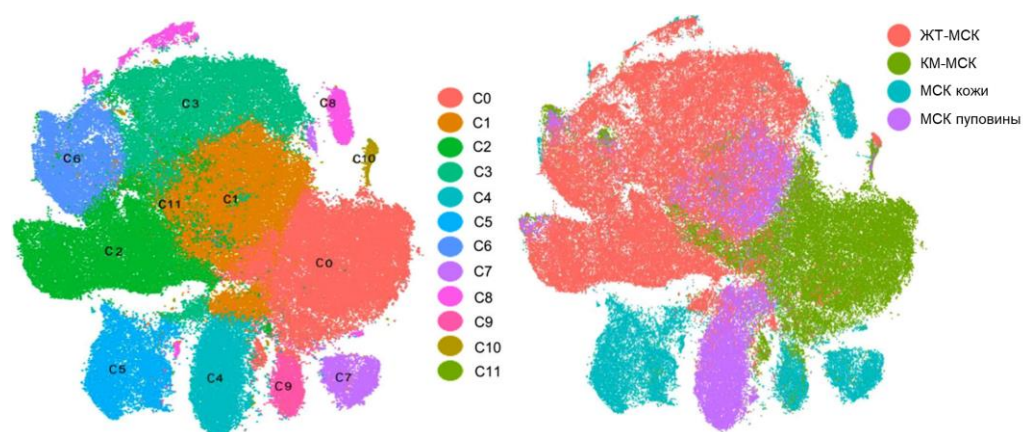


Рисунок 4. Визуализация 130942 МСК, выделенных из жировой ткани (ЖТ-МСК), красного костного мозга (КМ-МСК), кожи и пуповины. В популяции МСК выделены 12 кластеров от C0 до C11 [199] (с изменениями).

С помощью проточной цитометрии Xiao-Jie и соавторы определили, что с течением культивирования изменяется соотношение субпопуляций в культуре МСК. К 3-4 пассажу в культуре МСК растет количество клеток, экспрессирующих CD44, CD105, CD73 и CD13, являющихся маркерами стволовости. А на поздних пассажах падает уровень экспрессии *ITGA5*, *MME* и *ICAM1* [116]. Вероятно, эти изменения являются следствием условий культивирования клеток, когда преимущество получают быстро делящиеся клетки, и для всех клеток актуален процесс прикрепления к чашке и синтеза ВКМ.

Прижизненная съемка МСК с помощью микроскопа является одним из наиболее удобных методов оценки функциональных характеристик отдельных клеток. С помощью данного метода можно проследить за миграцией, сигнальной активностью и дифференцировкой одиночных клеток. Ранее в нашей лаборатории при помощи данного метода было показано, что при стимуляции МСК норадреналином повышением внутриклеточного кальция отвечает только малая субпопуляция из $6.9 \pm 0.8\%$ клеток [190]. При этом $\alpha 1$ -адренорецепторы, потенциально способные запустить кальциевую сигнализацию в ответ на норадреналин, обнаруживаются на всей популяции МСК [189]. Вероятно, на большинстве клеток данные рецепторы не сопряжены с сигнальным каскадом. Вообще, индивидуальные МСК отвечают на разные кальций-мобилизующие гормоны, проявляя функциональную гетерогенность на сигнальном уровне [89].

Можно предположить, что МСК представляют собой сосуществующие субпопуляции клеток, специализированные для выполнения определенных функций. Среди них есть отдельные субпопуляции клеток, которые лучше дифференцируются в адипогенном направлении, и субпопуляции, ответственные за регуляцию функций других клеток ткани [165, 179]. Отдельные субпопуляции МСК чувствительны к различным гормонам-регуляторам, что, вероятно, определяет их функции [88, 190]. При ожирении происходит существенное изменение субпопуляционного состава жировой ткани в целом и МСК в частности. Так, например, ожирение приводит к снижению адипогенного потенциала резидентных МСК, что может быть связано как с истощением субпопуляции клеток, способных дифференцироваться в адипоциты, так и с нарушением внутренней регуляции этого процесса.

1.3. Нейрогуморальная регуляция функциональной активности МСК

В организме взрослого человека функциональная активность постнатальных стволовых клеток находится под строгим нейрогуморальным контролем. Так, МСК располагаются преимущественно периваскулярно, при помощи отростков они проникают через эндотелий для непосредственного контакта с гормонами, транспортируемыми кровью. Кроме того, в костном мозге было показано, что МСК непосредственно иннервированы симпатической нервной

системой [114]. Стоит отметить, что МСК в организме подвергаются одновременному действию большого количества гормонов, нейромедиаторов и других регуляторных факторов. При этом в большинстве случаев ни один из гормонов и нейромедиаторов не способен в одиночку кардинально изменять функции клеток *in vivo*. Для изменения функциональной активности клеток обычно необходима комбинация действующих веществ с определенными временными и концентрационными характеристиками. Хорошим примером такого координированного действия гормонов является описанная выше регуляция дифференцировки МСК в адипоциты. Так, адипогенная дифференцировка требует одновременного действия инсулина, глюкокортикоидов и агониста цАМФ-зависимого сигнального пути. Если бы единичного воздействия какого-то гормона хватало для активации стволовой клетки и запуска ее дифференцировки, тогда бы пул стволовых клеток взрослого человека мог быть быстро израсходован из-за неспецифической активации клеточных ответов.

Постнатальные стволовые клетки находятся в динамическом равновесии между различными функциональными состояниями при действии множества гормонов и других сигнальных молекул. Это динамическое равновесие заключается в том, что часть сигналов, которые приходят к клетке, постоянно пытаются направить ее в дифференцировку, а часть сигналов, наоборот, сохраняет клетки недифференцированными. При этом определенная популяция стволовых клеток постоянно должна находиться в недифференцированном состоянии. Вероятно, смещение этого равновесия под действием внешних регуляторов является ведущим фактором запуска дифференцировки клеток *in vivo*. При этом постоянное смещение такого равновесия в сторону дифференцировки может привести к истощению пула стволовых клеток и нарушению обновления ткани, как это происходит при ожирении.

Одним из наиболее значимых регуляторов функциональной активности МСК является симпатическая нервная система и ее ключевое действующее вещество норадреналин. В жировой ткани норадреналин ингибирует адипогенную дифференцировку МСК, активирует липолиз и ингибирует липогенез в адипоцитах, регулирует тонус сосудов. При этом на сегодняшний день неизвестно, какие именно типы клеток жировой ткани непосредственно иннервированы окончаниями симпатической нервной системы, а на какие СНС действует опосредованно.

Среди адипоцитов в жировой ткани только 2-3% клеток напрямую взаимодействуют с нервными окончаниями. Некоторые исследования показывают, что на остальные адипоциты действует норадреналин, который разливается между клетками [176]. Эта гипотеза может быть объяснена строением симпатических нервных окончаний. Окончания СНС в жировой ткани представляют собой варикозные расширения, а не классические химические синапсы с

синаптической щелью [69]. При этом можно предположить, что при разлипании норадреналина, чем дальше он оттекает от варикоз СНС, тем сильнее снижается его концентрация, воздействующая на рецепторы. Снижение концентрации норадреналина приводит к изменению преимущественно активируемого рецептора и сигнального каскада. В связи с различающимся сродством разных изоформ адренорецепторов к норадреналину, при более высоких концентрациях этот нейромедиатор и гормон в основном активирует β -адренорецепторы, тогда как при более низких - в основном α -адренорецепторы [138]. То есть можно предположить, что в наиболее удаленных от симпатических волокон участках жировой ткани норадреналин в основном активирует α -адренорецепторы, а рядом с варикозами в основном β -адренорецепторы. Это может определять преимущественный сигнальный каскад, активируемый катехоламинами в разных по локализации клетках жировой ткани.

Про взаимодействие стромальных клеток жировой ткани с СНС известно мало. С другой стороны, полезно посмотреть, как МСК контактируют с СНС в других тканях. В костном мозге МСК соприкасаются с симпатическими нервными волокнами (Рис. 5) [114]. Можно предположить, что при активации симпатической нервной системы норадреналин воздействует на эту субпопуляцию МСК сильнее и раньше, чем на другие группы клеток. Симпатическая иннервация МСК костного мозга играет ключевую роль в регуляции ниши гемопоэтических клеток. Активация симпатической нервной системы приводит к подавлению экспрессии CXCL12 и повышению синтеза G-CSF исключительно в МСК. CXCL12 и G-CSF являются паракринными факторами, регулирующими выход клеток крови из костного мозга в просвет сосудов [71]. Таким образом, регуляция гемопоэза в красном костном мозге симпатической нервной системой опосредуется через непосредственную иннервацию МСК.

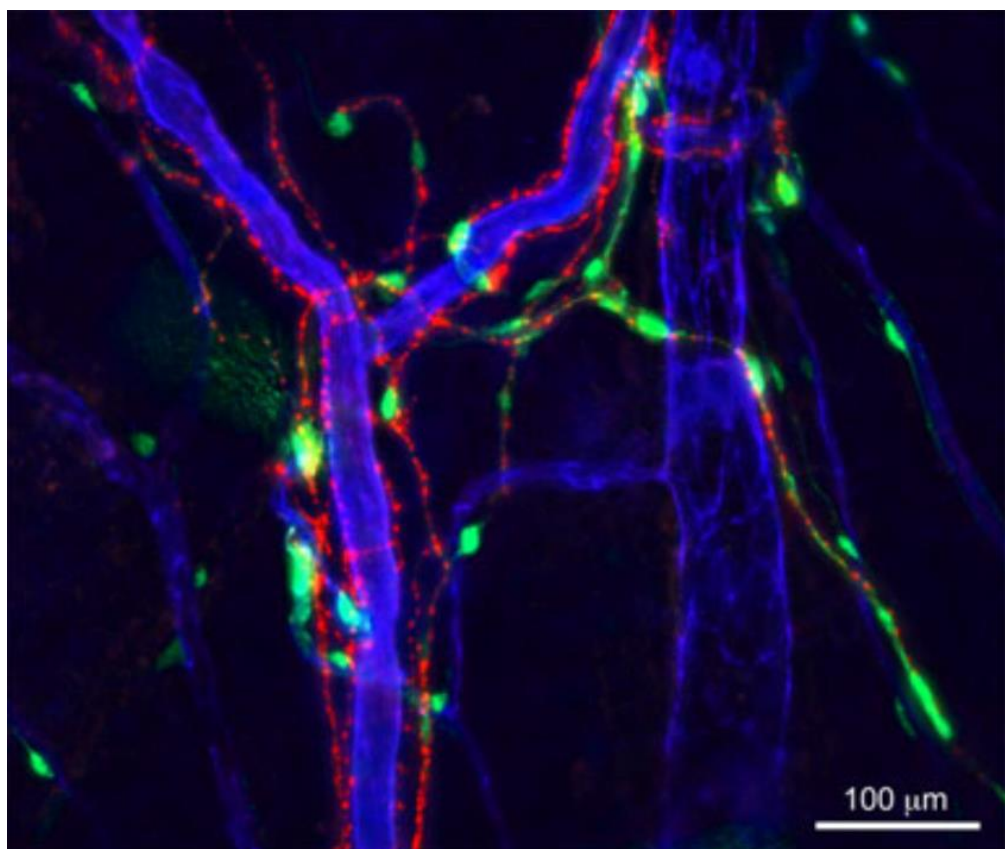


Рисунок 5. Организация периваскулярного пространства в костном мозге. Нестин-GFP позитивные МСК - зеленые клетки, CD31 позитивные эндотелиальные клетки - синие, аксоны симпатической нервной системы, экспрессирующие тирозин гидроксилазу – красные [71].

Помимо выделения норадреналина в тканях при активации симпатической нервной системы происходит выделение в кровь адреналина, что связано со стимуляцией мозгового вещества надпочечников [82]. Так как адреналин растворен в крови, то данный гормон воздействует в первую очередь на клетки, расположенные периваскулярно, то есть на эндотелиальные клетки, перициты и ГМК [144]. Как уже было сказано выше, ГМК и перициты при выделении в культуру попадают в культуру МСК. Таким образом, воздействие симпатической нервной системы на МСК осуществляется как за счет выделения норадреналина из нервных окончаний, так и при участии растворенного в крови адреналина, выделяемого надпочечниками.

Помимо регуляции адипогенеза, катехоламины являются ключевыми регуляторами сократительности сосудов жировой ткани. В настоящее время консенсусно считается, что вазоконстрикция запускается при активации $\alpha 1$ -адренорецепторов на гладкомышечных клетках. При длительном повышении активности симпатической нервной системы усиливается выброс катехоламинов, стабильно стимулирующих $\alpha 1$ -адренорецепторы. В ответ на стимуляцию $\alpha 1$ -адренорецепторы, как и все GPCR, десенситизируются. При избыточной стимуляции рецепторов наблюдается их даунрегуляция, то есть снижение уровня белка и мРНК рецептора.

Даунрегуляция приводит к длительному снижению уровня $\alpha 1$ -адренорецепторов. Логично предположить, что снижение стимуляции должно приводить к сохранению стабильного уровня белка $\alpha 1$ -адренорецептора на поверхности сосудов. Однако, Stassen и соавторы показали, что денервация сосудов крыс приводит к снижению количества $\alpha 1A$ -адренорецепторов на уровне белка [177]. То есть иннервация клеток окончаниями симпатической нервной системы необходима для поддержания уровня $\alpha 1$ -адренорецепторов. Из этого можно заключить, что катехоламины напрямую регулируют представленность $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах не только за счет способности их десенситизировать и/или даунрегулировать, но и также путем поддержания уровня белка рецептора в клетках.

Другим хорошо изученным гормоном, регулирующим функции МСК, является ангиотензин II. Ранее было показано, что ангиотензин II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК, что, вероятно, опосредовано активацией AT1R, который экспрессируется в 100% клеток популяции МСК. Добавление блокатора AT1R приводит к исчезновению данного эффекта [28]. При этом важно отметить, что активация AT1R приводит к быстрой интернализации рецепторов и развитию десенситизации клеток к ангиотензину II. Это приводит к неспособности ангиотензина II активировать AT1R [179]. Помимо AT1R МСК также экспрессируют ангиотензиновые рецепторы 2 типа (AT2R). Однако, в отличие от AT1R, AT2R экспрессируются только в 4-7% клеток. Причем в этих клетках AT2R, вероятно, гетеродимеризуется с AT1R, что блокирует интернализацию AT1R при действии ангиотензина II [188]. Таким образом, AT1R на поверхности этих клеток локализуется постоянно. В этих 4-7% клеток ангиотензин II способен активировать сигнализацию при многократном действии. Клетки с постоянным AT1R на поверхности в отличие от остальной популяции МСК обладают повышенным адипогенным потенциалом [179]. Можно предположить, что в ткани субпопуляция МСК, положительная по AT2R, первая дифференцируется в адипоциты при действии адипогенного стимула. Помимо этого, МСК имеют эндогенную ренин-ангиотензиновую систему, то есть самостоятельно способны синтезировать ангиотензин II. При дифференцировке МСК в адипогенном направлении происходит увеличение представленности AT2R и синтеза ангиотензина II [112]. Вероятно, на протяжении адипогенной дифференцировки антиадипогенный эффект ангиотензина II уменьшается и сменяется на проадипогенный из-за увеличения экспрессии AT2R. Можно предположить, что регуляция адипогенеза ангиотензином II имеет важное значение при развитии ожирения. Развитие ожирения опосредовано активацией ренин-ангиотензиновой системы (РАС), что приводит к повышению уровня циркулирующего ангиотензина II. При этом также происходит повышение активности локальной РАС *in vivo* в жировой ткани, что должно приводить к повышению локального уровня ангиотензина II.

Ангиотензин II, по всей видимости, локально усиливает контрактильность пероцитов и ГМК, а также смещает равновесие в сторону адипогенной дифференцировки МСК.

Функциональная активность МСК регулируется не только мембранными рецепторами, как это характерно для катехоламинов и ангиотензина II, но и тиреоидными и стероидными гормонами, имеющими в основном ядерные рецепторы. Наиболее изученным является влияние глюкокортикоидов на МСК. Дексаметазон, синтетический аналог глюкокортикоидов, в высоких концентрациях применяется для индукции адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки МСК. Однако в низких концентрациях дексаметазон усиливает пролиферацию и уменьшает апоптоз МСК [196]. Важно отметить, что несмотря на то, что основные эффекты стероидных и тиреоидных гормонов опосредованы ядерными рецепторами, у некоторых гормонов из этих групп также имеются неклассические мембранные рецепторы. Одним из примеров такого неклассического проведения сигнала является ингибирование хондрогенной дифференцировки МСК при действии эстрадиола. Эстрадиол активирует мембранные GPR-30 рецепторы, сопряженные с G-белками, что, как предполагается, приводит к трансактивации EGFR и запуску PI3K-зависимого сигнального каскада [74, 143]. Последний больше ассоциирован с адипогенной дифференцировкой, являющейся антагонистичной остеогенной и хондрогенной. Таким образом, стероидные гормоны регулируют функции МСК через ядерные и мембранные рецепторы.

Помимо гормонов и нейромедиаторов в регуляции адипогенеза и контрактильности МСК участвуют и негормональные стимулы. В качестве примера можно привести рецептор жирных кислот FFAR2, являющийся одним из регуляторов функций жировой ткани. При ожирении происходит повышение концентрации свободных жирных кислот в крови, что приводит к стимуляции FFAR2. Активный FFAR2 снижает липолиз в адипоцитах и ингибирует адипогенную дифференцировку МСК [70, 72]. Повышение уровня свободных жирных кислот может быть не только следствием ожирения. Одним из основных агонистов FFAR2 является пропионовая кислота. Уровень пропионовой кислоты повышается при пропионовой ацидемии. Данное заболевание характеризуется накоплением пропионовой кислоты в органах и тканях из-за нарушения активности пропионил-КоА карбоксилазы. Заболевание приводит к нарушению функциональной активности жировой ткани, а именно снижению уровня липолиза и окисления жирных кислот [178]. Метаболические эффекты данного заболевания могут являться как следствием нарушения активности фермента, так и быть вызваны избыточной активацией FFAR2. Можно предположить, что при данном заболевании происходит также нарушение дифференцировки МСК в адипоциты.

Другим примером негормонального сигнала, регулирующего функциональную активность МСК, являются адгезионные механорецепторы. Адгезионные рецепторы также являются G-белок ассоциированными рецепторами и состоят из классических для любого GPCR 7 трансмембранных спиралей и длинного нековалентно связанного внеклеточного домена [47, 128]. Белки внеклеточного матрикса, взаимодействуя с внеклеточным доменом, механически оттягивают его от самого рецептора, что приводит к активации сигнализации. GPR116 является одним из адгезионных рецепторов на поверхности МСК и может участвовать в регуляции адипогенной дифференцировки клеток. Нокаут GPR116 в мышах нарушает адипогенную дифференцировку МСК и функциональную активность самих адипоцитов, приводя к развитию инсулинорезистентности [126]. Эти данные коррелируют с необходимостью плотной посадки МСК для индукции адипогенной дифференцировки.

Нейрогуморальный контроль определяет функции, которые выполняют МСК в ткани. Изменение баланса воздействующих на МСК стимулов определяет как нормальное функционирование этих клеток, так и их работу при патологиях. Изучение механизмов нейрогуморального контроля в будущем позволит регулировать функциональное состояние МСК в тканях при патологиях, что позволит предложить новые методы терапии.

1.4. Регуляция рецепторной чувствительности МСК

Сигналы, действующие на МСК, регулируют функции клеток не только за счет влияния на дифференцировку, пролиферацию, секрецию и миграцию, но и путем изменения чувствительности клеток-мишеней к гормонам-регуляторам. Гормональная чувствительность отдельных клеток может регулироваться на разных уровнях передачи рецепторного сигнала. Наиболее хорошо изученным молекулярным механизмом изменения чувствительности на уровне рецепторов являются посттрансляционные модификации рецепторов. Одним из примеров такой регуляции является фосфорилирование С-концевого домена GPCR протеинкиназами А или С. Активация протеинкиназы А (ПКА) опосредована запуском цАМФ-зависимого сигнального каскада Gs-белком некоторых GPCR, например, β -адренорецепторов, серотониновых рецепторов 4, 6 и 7 типов, аденозиновых рецепторов 2a и 2b типов. Активация протеинкиназы Ц (ПКЦ) опосредована запуском фосфоинозитидного обмена и кальциевой сигнализации при участии Gq-белка ряда других GPCR. Среди них $\alpha 1$ -адренорецепторы, ангиотензиновые рецепторы 1 типа, гистаминовые рецепторы 1 типа. Фосфорилирование С-концевого цитоплазматического домена GPCR ПКА и ПКЦ может приводить к снижению сродства рецептора к G-белку, что снижает чувствительность рецептора к гормону, то есть происходит десенситизация. При этом фосфорилироваться могут и не связанные с лигандом рецепторы, в связи с этим данный тип десенситизации называют «независимая от агониста десенситизация» [57, 154]. Другим

вариантом фосфорилирования рецептора является «зависимая от агониста десенситизация», которая осуществляется киназами G-белок-связанных рецепторов (GRK). При взаимодействии рецептора с лигандом происходит привлечение GRK и направленное фосфорилирование активированного GPCR [18, 57, 154]. При данном типе десенситизации не происходит фосфорилирование неактивных рецепторов. Таким образом, фосфорилирование семидоменных рецепторов является наиболее распространенным механизмом снижения их чувствительности при избыточном действии гормона.

Фосфорилирование рецептора может приводить не только к десенситизации, но и являться механизмом переключения внутриклеточного сигнального каскада на альтернативный. Один из примеров такого переключения показывают β -адренорецепторы. В норме β -адренорецепторы связаны с Gs-белком, который активирует аденилатциклазу, запускающую цАМФ-зависимый сигнальный каскад и протеинкиназу A. Однако длительная активация протеинкиназы A приводит к фосфорилированию β -адренорецепторов. Фосфорилированные β -адренорецепторы теряют сродство к Gs-белку и связываются с Gi-белком. Это, с одной стороны, ингибирует цАМФ-зависимый сигнальный каскад, с другой - опосредует запуск сигнальных каскадов от $\beta\gamma$ -субъединицы тримерного Gi-белка [139]. Вероятно, данный механизм является одним из методов защиты клеток от гибели из-за чрезмерной адренергической стимуляции. Накоплено достаточно много данных, указывающих на то, что при избыточной длительной стимуляции цАМФ-зависимого сигнального каскада запускается апоптоз кардиомиоцитов [30, 172, 213]. Для МСК также обсуждается данный механизм регуляции сигнальных каскадов, запускаемых β -адренорецепторами. При стимуляции β -адренорецепторов в МСК может происходить активация Gi-белка и запуск ERK-зависимой сигнализации [59, 153]. Возможно, этот механизм сохраняет жизнеспособность сосудистых клеток при постоянной повышенной активации симпатической нервной системы.

Процесс дефосфорилирования является механизмом восстановления чувствительности рецепторов после их фосфорилирования. Для этой цели в клетке имеются протеин-фосфатазы, которые могут быть как растворимыми, так и входить в состав сигнальных комплексов. Сигнальные комплексы обычно образованы каркасными белками с заякореными на них участниками сигнальных каскадов. Одним из таких типов каркасных белков является АКАР, который связывает протеинкиназу A. Многие АКАР, помимо PKA также связывают и протеин фосфатазы PP2A, например, АКАР250 Gravin [101]. В связи с близким расположением фосфатаз и киназ можно предположить следующий механизм регуляции чувствительности рецепторов. При взаимодействии рецептора с лигандом происходит активация протеинкиназы A на каркасном белке АКАР, что приводит к фосфорилированию и десенситизации рецептора. Затем

протеинфосфатаза, заякоренная на том же АКАР, дефосфорилирует рецептор, что позволяет ему вернуться в исходное чувствительное к гормону состояние и снова проводить сигнал при связывании с ним. Этот механизм может быть одним из вариантов очень быстрой регуляции чувствительности клеток, который ограничивает избыточную активацию рецепторов, но и не позволяет клетке надолго терять способность воспринимать сигналы гормонов.

Если рецептор находится в фосфорилированном состоянии длительное время и не дефосфорилируется, то обычно он связывается с β -аррестином. Данный белок стерически нарушает взаимодействие рецептора с G-белком, что приводит к более длительному предотвращению активации сигнального каскада. Помимо этого, β -аррестин привлекает клатрин, запускающий интернализацию рецептора, и связывает Raf-1, активирующий MAP-киназный сигнальный каскад. В итоге β -аррестин индуцирует уход рецептора с поверхности клетки в эндосомы и переключает сигнализацию с кальциевой или цАМФ-зависимой на MAP-киназную [106, 212]. GPCR на МСК также подвергаются такому методу десенситизации, однако каждый тип рецепторов интернализуется при разном уровне стимуляции. Одним из примеров быстрой интернализации является AT1R. При стимуляции AT1R на МСК активируется кальциевая сигнализация и в течение 10 минут происходит интернализация рецепторов на 95% клеток. В результате повторная стимуляция клеток ангиотензином II не способна активировать AT1R и запустить кальциевую сигнализацию. Однако, есть небольшая популяция МСК, AT1R которой не интернализуются и способны запускать кальциевую сигнализацию при множественных повторных добавках ангиотензина II. Данная популяция клеток также несет на своей поверхности помимо AT1R и другие ангиотензиновые рецепторы, например, AT2R и MAS рецепторы [179]. Существует гипотеза, что AT1R на этих клетках образуют гетеродимеры с другими типами ангиотензиновых рецепторов, что предотвращает их интернализацию [188]. Медленная интернализация характерна для β -адренорецепторов и осуществляется в течение нескольких часов [190]. Некоторые GPCR в МСК не подвергаются столь быстрой интернализации, например, $\alpha 1$ -адренорецепторы. В связи с этим возможна повторная многократная стимуляция данных адренорецепторов при действии норадреналина [89]. Различие в способности к даунрегуляции может иметь функциональное значение для МСК. Так, норадреналин может постоянно запускать контракцию МСК, так как она опосредована не интернализуемыми $\alpha 1$ -адренорецепторами. С другой стороны, ангиотензин не способен постоянно запускать контракцию этих клеток, так как AT1R быстро интернализуются на большинстве клеток и теряют способность повышать уровень внутриклеточного кальция. При этом популяция клеток с неинтернализуемыми AT1R имеет повышенный адипогенный потенциал. Медленная интернализация β -адренорецепторов на МСК, возможно, является следствием высокой скорости их дефосфорилирования. Можно

предположить, что требуются множественные повторные активации, для того чтобы рецепторы были фосфорилированы достаточно для интернализации. Множественные воздействия на β -адренорецепторы может приводить к накоплению в клетке антиадипогенных сигналов. Подобное накопление антиадипогенных сигналов может блокировать адипогенную дифференцировку достаточно продолжительное время, в течение которого β -адренорецепторы будут интернализированы и не способны проводить антиадипогенные сигналы.

Другим способом регуляции рецепторной чувствительности клеток является димеризация и олигомеризация рецепторов. В рамках этого процесса несколько молекул рецепторов объединяются в комплекс для проведения сигнала. Наиболее хорошо изучена олигомеризация рецепторных тирозинкиназ. МСК экспрессируют множество тирозинкиназных рецепторов, например, рецептор инсулина (IR), рецептор фактора роста нейронов (TrkA) и рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR). Примером димеризации рецепторных тирозинкиназ в МСК является инсулиновый рецептор, который играет ключевую роль в адипогенной дифференцировке этих клеток. Рецептор инсулина при связывании с лигандом аутофосфорилируется и запускает MAP-киназный, а также PI3K/Akt сигнальный каскад. Инсулиновый рецептор также может участвовать в регуляции чувствительности клеток к цАМФ-активирующим гормонам. Инсулиновый рецептор запускает PI3K/Akt сигнальный каскад, что приводит к активации фосфодиэстеразы 3В [86]. Повышение активности фосфодиэстеразы может приводить к снижению гормон-опосредованного повышения уровня цАМФ. Помимо рецепторных тирозинкиназ димеризации также могут подвергаться GPCR. Выше уже была описана вероятная роль данного процесса в регуляции чувствительности AT1R. Накапливается все больше данных, указывающих на то, что многие другие GPCR на поверхности клеток находятся в виде гомо- и гетеродимеров. Одним из примеров является CXCR4, связанный с Gi-белком и ингибирующий цАМФ-зависимый сигнальный каскад. CXCR4 может гетеродимеризоваться с $\alpha 1$ -адренорецепторами в ГМК, что необходимо для нормального функционирования сосудистых ГМК. Подавление экспрессии CXCR4 в ГМК приводит к снижению способности агонистов $\alpha 1$ -адренорецепторов запускать кальциевую сигнализацию и контракцию ГМК [141, 186]. Многие другие GPCR также могут формировать постоянные гомо- и гетеродимеры, например, mGluR и GABA_B [121, 205].

Даунрегуляция – это механизм десенситизации, при котором происходит интернализация рецептора с последующим его расщеплением в лизосомах или протеасомах и, в некоторых случаях, снижением уровня мРНК этого рецептора. При данном механизме десенситизации снижение чувствительности клеток будет более долговременным, чем при фосфорилировании

или просто интернализации с последующей рециклизацией. В МСК даунрегуляции подвергаются β -адренорецепторы, толл-подобные рецепторы, рецепторы TGF- β и другие [58, 119, 190].

Таким образом, в настоящее время достаточно хорошо изучены разнообразные механизмы снижения чувствительности клеток к гормональным воздействиям. При этом механизмы повышения чувствительности долгое время ограничивались процессами восстановления базальных значений после десенситизации и даун-регуляции. Среди таких механизмов повышение чувствительности клеток за счет дефосфорилирования рецептора или путем рециклизации ранее интернализированных рецепторов. После деградации рецептора клетки возвращают свою чувствительность путем повышения экспрессии белка рецептора. Однако, все эти механизмы в основном направлены на восстановление чувствительности клеток до уровня базальных значений. Механизмы повышения чувствительности клеток выше базальных значений изучены слабо.

В качестве примера механизма гормон-опосредованного повышения чувствительности клеток к внешним сигналам можно привести явление пермиссивного действия одного типа рецепторов на другой. При этом стимуляция одного рецептора приводит к увеличению экспрессии или выходу на поверхность других рецепторов, в результате чего чувствительность клетки к гормону-мишени превышает базальные значения. Одним из наиболее известных примеров этого является пермиссивный эффект глюкокортикоидов на $\alpha 1$ -адренорецепторы [158]. Можно предположить, что такой тип взаимодействия рецепторов *in vivo* нужен для поддержания экспрессии $\alpha 1$ -адренорецепторов за счет циркадных осцилляций уровня глюкокортикостероидов в крови [130]. А значит, возможно, чувствительность $\alpha 1$ -адренорецепторов в МСК может циркадно повышаться и понижаться, опосредуя повышенную и пониженную контрактильность клеток в ответ на катехоламины.

Другой механизм пермиссивного взаимодействия адренорецепторов был ранее показан в нашей лаборатории и получил название гетерологической сенситизации. На МСК был показан уникальный для постнатальных клеток феномен гетерологической сенситизации [190]. Этот феномен проявляется в том, что чувствительность ЖТ-МСК к норадреналину повышается через 6 часов после активации в клетках цАМФ-зависимой сигнализации катехоламинами. При этом через 6 часов после стимуляции МСК норадреналином транзиторно увеличивается уровень $\alpha 1A$ -адренорецепторов на поверхности МСК. На простую стимуляцию норадреналином повышением внутриклеточного уровня Ca^{2+} отвечает $6.9 \pm 0.8\%$ клеток. А на повторное действие норадреналином кальциевая сигнализация запускается уже в 2-2,5 раза большем количестве клеток. Данный эффект опосредуется активацией β -адренорецепторов при первичном

воздействии норадреналина и повышением количества $\alpha 1A$ -адренорецепторов на уровне белка (Рис. 6). Экспрессия других изоформ адренорецепторов не изменяется. Доля клеток, экспрессирующих $\alpha 1A$ -адренорецептор также не изменяется. Однако повышается концентрация $\alpha 1A$ -адренорецепторов на поверхности МСК, что приводит к увеличению чувствительности клеток к норадреналину в 5 раз. Таким образом, стимуляция β -адренорецепторов пермиссивно действует на $\alpha 1A$ -адренорецепторы.

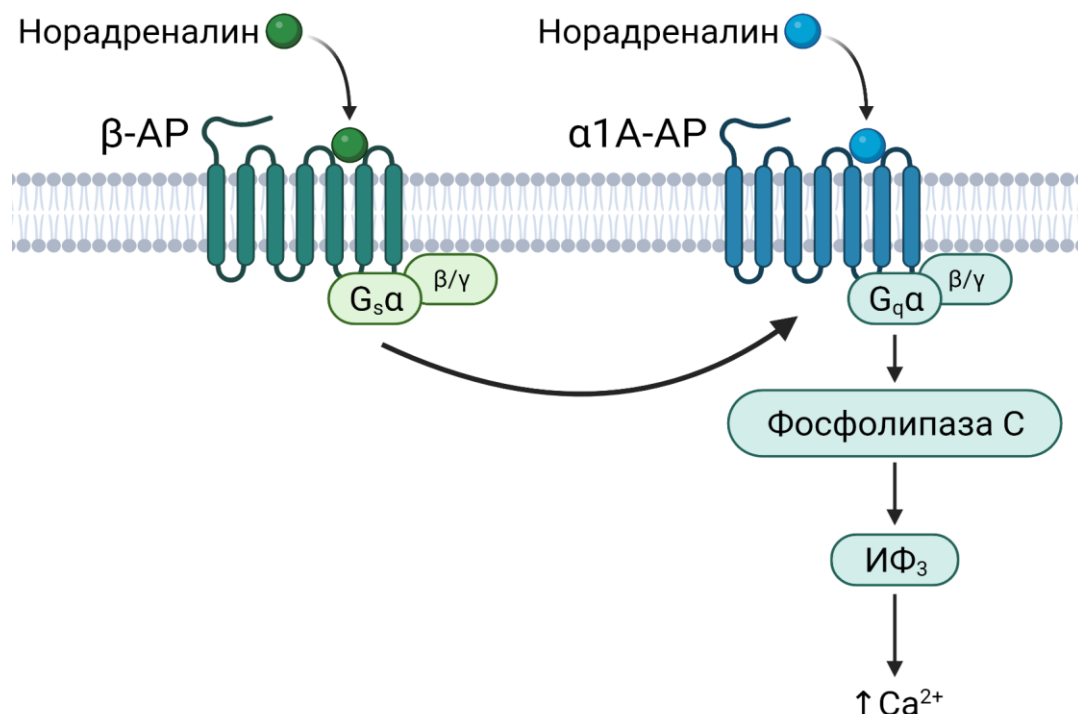


Рисунок 6. Феномен гетерологической сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов при действии норадреналина.

Следует отметить временные характеристики развития гетерологической сенситизации. Через 3 часа после стимуляции феномен еще не выявляется. Через 24 часа количество отвечающих на норадреналин клеток возвращается к базальному уровню $\pm 5-8\%$. Эффект повышения чувствительности МСК к норадреналину транзиторный и развивается очень быстро. Таким образом, в МСК реализуется феномен гетерологической сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов через 6-9 часов после стимуляции β -адренорецепторов [190]. Тем не менее, физиологический смысл данного феномена до сих пор неясен.

1.5. Регуляция артериального давления

МСК являются ключевыми участниками развития ожирения и связанных с ним сопутствующих заболеваний. Одним из наиболее социально и медицински значимых заболеваний, ассоциированных с ожирением, является артериальная гипертензия. Порядка 70% случаев первичной артериальной гипертензии ассоциированы с развитием ожирения [38]. Для

того чтобы разобраться, каким образом развивается артериальная гипертензия при ожирении, необходимо для начала описать механизмы регуляции артериального давления.

Артериальное давление представляет собой результат слаженной работы сердечной мышцы и сосудистой сети (Рис. 7). Мерой активности работы сердца является сердечный выброс. Сердечный выброс (СВ) – объем крови, перекачиваемый сердцем в минуту. Математически сердечный выброс можно представить как произведение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ударного объема (УО), то есть объема крови, перекачиваемого желудочком сердца за 1 сокращение. Мерой активности сосудистой системы принято считать общее периферическое сосудистое сопротивление (ОПСС). ОПСС это сила, с которой сосуды препятствуют току крови. Математически ОПСС можно рассчитать по уравнению Пуазейля [203]:

$$R = \frac{8\eta l}{\pi r^4},$$

где R - резистентность сосудов, η - вязкость крови, l - длина сосудов, r - радиус сосудов.

Вязкость крови меняется не сильно из-за постоянного контроля состава крови. Только при сильной анемии, когда уменьшается количество эритроцитов, или же при сильной дегидратации вязкость крови может значительно изменяться. Радиус сосудов из-за возведения в 4 степень вносит наибольший вклад в общее периферическое сосудистое сопротивление. Изменение длины сосудов у взрослого человека при ожирении несравнимо со вкладом уменьшения радиуса сосудов. Следовательно общее периферическое сосудистое сопротивление в основном регулируется за счет изменения диаметра просвета сосуда. Вазоконстрикторы представляют собой группу веществ, уменьшающих просвет сосуда и увеличивающих артериальное давление, например, ангиотензин II, норадреналин и вазопрессин (антидиуретический гормон). Вазодилататоры, например, брадикинин, ацетилхолин, простаглицлин, напротив увеличивают просвет сосуда и уменьшают АД.

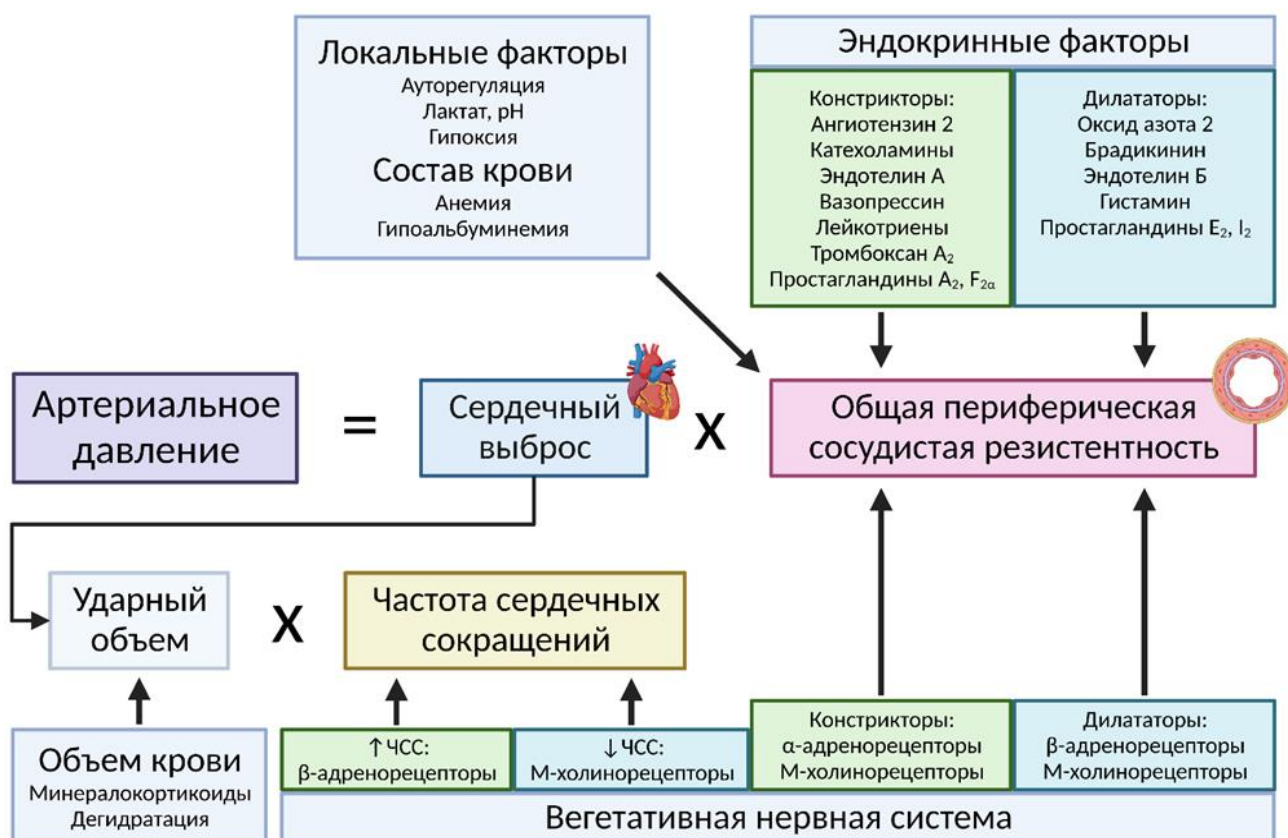


Рисунок 7. Регуляция артериального давления. Артериальное давление определяется сердечным выбросом и общей периферической сосудистой резистентностью. Обе этих составляющие в свою очередь регулируются эндокринными факторами и вегетативной нервной системой. ЧСС – частота сердечных сокращений.

Как сердечный выброс, так и ОПСС находятся под строгим нейроэндокринным контролем. Сокращение сердца реализуется путем генерации потенциала действия в синоатриальном узле и его передаче по проводящей системе сердца (предсердные пучки, атриовентрикулярный узел, пучок Гиса, ножки пучка Гиса, волокна Пуркинье). Проводящая система сердца передает возбуждение на миокард, что вызывает сокращение сердца. Частота и сила сокращений в основном регулируется за счет баланса в активности отделов вегетативной нервной системы (ВНС). Симпатический отдел ВНС непосредственно иннервирует сердце и может активировать выброс в кровь адреналина из надпочечников. Катехоламины активируют в сердце β1- и β2-адренорецепторы и запускают сигнальный каскад Gs-белок/аденилатциклаза/ПКА. Активация β-адренорецепторов в синоатриальном узле и других пейсмекерах приводит к увеличению частоты сердечных сокращений (положительный хронотропный эффект) и скорости передачи потенциала действия по проводящей системе сердца (положительный дромотропный эффект). Действуя на миокард, катехоламины усиливают возбудимость миокарда (положительный батмотропный эффект) и силу сокращений (положительный инотропный эффект). Парасимпатический отдел ВНС представлен ветвями блуждающего нерва и действует на сердце более локально. В отличие от СНС, которая диффузно

иннервирует сердце, парасимпатическая НС в основном действует на синоатриальный и атриовентрикулярный узлы и в меньшей степени на миокард желудочков. Ацетилхолин, выделяемый из нервных окончаний парасимпатической нервной системы, действует на М2-холинорецепторы, активируя Gi-белок, что ингибирует аденилатциклазный сигнальный каскад. Это приводит к уменьшению частоты (отрицательный хронотропный эффект) и силы сердечных сокращений, а также замедляет проведение потенциала действия по проводящей системе сердца (отрицательный дромотропный эффект) [3, 23, 91, 96].

Регуляция объема циркулирующей крови осуществляется в основном за счет изменения активности реабсорбции ионов и воды в почках. Активность канальцевой системы почек и осмолярность мочи также строго регулируется за счет действия нейрогуморальных факторов, например, антидиуретического гормона, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и натрийуретических пептидов. Данные группы паракринных веществ и гормонов также принимают участие в регуляции тонуса сосудистой стенки.

Симпатический отдел ВНС тонко регулирует просвет сосудов и ОПСС. Уровень вазоконстрикции и вазодилатации сосудов определяется концентрацией катехоламинов в крови. Так, сосуды скелетных мышц и печени расширяются при действии адреналина из-за преимущественной активации β -адренорецепторов. В других органах, например, в ЖКТ адреналин в основном активирует α -адренорецепторы и запускает вазоконстрикцию. Норадреналин в основном выделяется из окончаний СНС и на сосудах преимущественно активирует α -адренорецепторы, вызывая вазоконстрикцию в желудке, тонкой и толстой кишке, поджелудочной железе и селезенке. В почках норадреналин стимулирует β_1 -адренорецепторы юкстагломерулярных клеток и повышает синтез ренина, что активирует ренин-ангиотензиновую систему. Суммарно при действии симпатической НС увеличивается ОПСС, СВ и растет САД, ДАД и среднее АД. Парасимпатическая НС также противоречиво действует на сосуды [3, 23]. Ацетилхолин, действуя непосредственно на сосудистые ГМК, вызывает вазоконстрикцию путем активации М3-холинорецепторов и сигнального каскада ФЛС/ИФ₃/Ca²⁺ [171, 184]. Воздействие ацетилхолина на эндотелий вызывает активацию М3-холинорецепторов и запуск эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы 2 типа. NO-синтаза превращает аргинин в оксид азота (II), а циклооксигеназа 2 типа синтезирует простагландин I₂. Оксид азота (II), попадая в ГМК, активирует растворимую гуанилатциклазу, что приводит к повышению уровня цГМФ, запускающего вазодилатацию. Простагландин I₂ воздействует на собственные GPCR и повышает уровень внутриклеточного цАМФ, что также приводит к вазодилатации [36, 40, 95, 170]. Данный механизм называют эндотелий-зависимой вазодилатацией. По этому механизму также работают и другие вазодилататоры, такие как, брадикинин, АТФ, аденозин и гистамин [65].

Регуляция активности автономной нервной системы в отношении сердечно-сосудистой системы у спокойного человека осуществляется за счет барорефлекса. Изменение АД постоянно происходят при перемене положения тела. Когда человек встает, происходит падение АД, когда ложится - напротив, артериальное давление увеличивается. Барорефлексы осуществляют быструю настройку уровня АД при изменении положения тела. В области каротидного синуса располагаются барорецепторы, воспринимающие в основном падение АД. Повышение АД по большей части воспринимают барорецепторы дуги аорты. Барорецепторы постоянно передают сигналы в вазомоторный центр ЦНС, изменение давления лишь меняет частоту передачи сигналов. Активность вазомоторного центра направлена на контроль артериального давления таким образом, чтобы среднее АД было приблизительно 100 мм рт.ст. Если уровень среднего АД падает, вазомоторный центр активирует симпатическую НС и ингибирует парасимпатическую НС, что приводит к повышению активности работы сердца и способствует вазоконстрикции. Эти изменения в работе сердечно-сосудистой системы приводят к повышению уровня АД. При повышении АД вазомоторный центр ингибирует симпатическую НС и активирует парасимпатическую НС, что приводит к снижению АД за счет вазодилатации и ослабления работы сердца [31, 63].

Эндокринными регуляторами тонуса сосудистой стенки являются ренин-ангиотензиновая система, натрийуретические пептиды, вазопрессин, калликреин-кининовая система, эндотелины и некоторые другие активные вещества. Выделение адреналина из мозгового вещества надпочечников при активации СНС также следует относить к эндокринным механизмам регуляции тонуса сосудов.

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) является одним из наиболее сильных регуляторов баланса натрия и уровня артериального давления. Ангиотензиноген, секретируемый печенью, в крови подвергается ферментативному расщеплению ренином, который синтезируют юкстагломерулярные клетки почек. Образующийся ангиотензин 1 в легких под воздействием ангиотензин-превращающего фермента переходит в ангиотензин 2. Ангиотензин 2, воздействуя на AT1P ГМК сосудов, вызывает вазоконстрикцию [118]. Также, ангиотензин 2 регулирует уровень синтеза минералокортикоидов в надпочечниках. Воздействуя на AT1P клубочковой зоны коры надпочечников, ангиотензин 2 стимулирует синтез альдостерона из холестерина. Альдостерон повышает реабсорбцию натрия в корковых собирательных трубках, что повышает объем циркулирующей крови [183]. Помимо этого, минералокортикоиды, к которым относится альдостерон, могут вызывать гипертрофию ГМК и повышать экспрессию AT1P [161, 162]. Кроме классической системной РАС в последние годы накапливается все больше данных, указывающих на существование локальных тканевых ренин-ангиотензиновых систем. Группа

шведских ученых под руководством С. Karlsson показала, что в жировой ткани экспрессируется ангиотензиноген и все ферменты для его преобразования в ангиотензин 2 [83]. В сердце, надпочечниках и головном мозге также присутствуют локальные РАС [113, 133, 208]. Локальные РАС могут участвовать в контроле локального кровотока и регулировать гомеостаз отдельных тканей [182].

Калликреин-кининовая система (ККС) является метаболическим каскадом, регулирующим АД за счет образования вазоактивных кининов. Секретируемый печенью кининоген под воздействием калликреина плазмы крови превращается в брадикинин. Системно действующий брадикинин активирует В2-рецепторы на эндотелиальных клетках многих органов и тканей и запускает эндотелий-зависимую вазодилатацию. Далее карбоксипептидазы отщепляют от брадикинина С-концевую аминокислоту, что приводит к образованию брадикинина-(1-8). Брадикинин-(1-8) активируя В1-рецепторы также вызывает эндотелий-зависимую вазодилатацию. ККС, также как и РАС, делится на классическую системную и локальную. Однако тканевой калликреин локальной ККС отличается от калликреина плазмы крови. Тканевой калликреин расщепляет кининоген до каллидина, отличающегося от брадикинина наличием на N-конце остатка лизина. Каллидин, в отличие от брадикинина, является агонистом как В2-, так и В1-рецепторов. Инактивация брадикинина и каллидина осуществляется ангиотензин-превращающим ферментом, аминопептидазой Р, нейтральной эндопептидазой и карбоксипептидазами М и N [24, 108, 120].

Система натрийуретических пептидов участвует в регуляции артериального давления в основном за счет изменения объема циркулирующей крови. Повышение объема крови приводит к увеличению преднагрузки на сердце и расширению камер сердца. Расширение предсердий сопровождается выделением предсердного (тип А – ANP) и мозгового (тип В – BNP) натрийуретических пептидов в кровь. ANP и BNP действуют системно на NPR-A и NPR-C рецепторы. NPR-B рецепторы не воспринимают ANP и BNP, а активируются натрийуретическим пептидом типа С (CNP). CNP синтезируется в эндотелиальных клетках, нейронах и клетках Лейдига. Вероятно, CNP, в отличие от ANP и BNP, действует локально, а не системно. NPR-A и NPR-B являются рецепторными гуанилатциклазами, повышающими уровень внутриклеточного цГМФ при действии гормонов. Повышение цГМФ в ГМК приводит к вазодилатации. Расширение афферентных артериол в почечных клубочках, а также снижение секреции ренина при действии натрийуретических пептидов на NPR-A и NPR-B усиливает натрийурез, что приводит к снижению объема циркулирующей крови и падению АД. NPR-C в основном участвует в клиренсе натрийуретических пептидов, то есть уменьшает их концентрацию в крови [129, 216].

Антидиуретический гормон (АДГ) является одним из наиболее значимых регуляторов осмолярности и объема крови. Данный гормон секретируется нейрогипофизом в системный кровоток в ответ на повышение осмолярности плазмы крови при снижении ее объема. АДГ имеет 3 основных рецептора V1aR, V1bR, связанные с Gq-опосредованной кальциевой сигнализацией, и V2R, активирующий Gs-белок и цАМФ-зависимую сигнализацию. V2R рецептор в основном располагается в собирательных трубчатках почек и регулирует реабсорбцию воды. Активация этих рецепторов приводит к встраиванию аквапоринов 2 типа в мембрану главных клеток собирательных трубочек, что приводит к усилению реабсорбции воды, повышению объема и снижению осмолярности плазмы крови. Мутация V2R рецепторов связана с развитием несахарного диабета, сопровождающегося увеличением объема мочи, падением АД и повышением осмолярности крови. V1aR, V1bR располагаются в основном на ГМК сосудов и при активации запускают вазоконстрикцию, повышая АД. В связи с вазоконстрикторным действием антидиуретический гормон также называют вазопрессином [16, 185].

Таким образом, при падении артериального давления включаются системы, усиливающие тонус сосудистой стенки, сердечный выброс и увеличивающие объем циркулирующей крови. А системы, ослабляющие тонус сосудистой стенки, сердечный выброс и уменьшающие объем циркулирующей крови, активируются при повышении АД. Слаженная работа множества систем позволяет быстро регулировать как системное артериальное давление, так и локальный кровоток и не допускать значительных отклонений от нормы, что препятствует развитию патологических процессов. При этом кратковременные изменения артериального давления допустимы и являются физиологическим ответом организма, например, повышение АД при физической нагрузке, снижение АД во сне. Однако длительное изменение АД - это патология. Так, длительное снижение артериального давления и локального тока крови может приводить к гипоксии, сопровождающейся нарушением работы или смертью органов и тканей, например, транзиторная ишемическая атака, острый инфаркт миокарда, инфаркт зоны водораздела. Длительное не компенсируемое повышение систолического АД ≥ 140 мм рт.ст. или диастолического АД ≥ 90 мм рт.ст. принято называть артериальной гипертензией (АГ) по рекомендациям Российского кардиологического общества и Европейского общества кардиологов [2, 206]. По рекомендациям международного общества гипертензии диагноз АГ следует выставлять при среднем уровне систолического АД ≥ 130 и/или среднего диастолического АД ≥ 80 мм рт.ст. за 24 часа, ≥ 135 и/или 85 мм рт.ст. в среднем за время бодрствования, ≥ 120 и/или 70 мм рт.ст. в среднем за ночь [164]. Артериальная гипертензия в свою очередь может приводить к повреждению сосудов и развитию ряда осложнений, например,

диссекции аорты, аневризмы аорты, нефросклерозу, хронической болезни почек, гипертензивной ретинопатии, гипертензивной энцефалопатии [5, 164, 206].

1.6. Механизмы развития артериальной гипертензии при ожирении

Основными механизмами развития артериальной гипертензии при ожирении являются гиперактивация симпатической нервной системы, системная вазоконстрикция и нарушение натрийуреза. Гиперактивацию симпатической нервной системы связывают с повышением секреции лептина жировой тканью. В норме повышение уровня лептина приводит к активации термогенеза и снижению потребления пищи. При ожирении развивается гиперлептинемия и селективная лептиновая резистентность, что приводит к нарушению активации термогенеза и контроля над потреблением калорий. Однако влияние лептина на активацию симпатической нервной системы не страдает, а напротив усиливается, особенно при центральном типе ожирения (Рис. 8) [50, 78]. Избыточная активация симпатической нервной системы приводит к повышению уровня катехоламинов в крови. Катехоламины действуют на $\alpha 1$ -адренорецепторы, что приводит к усилению вазоконстрикции.

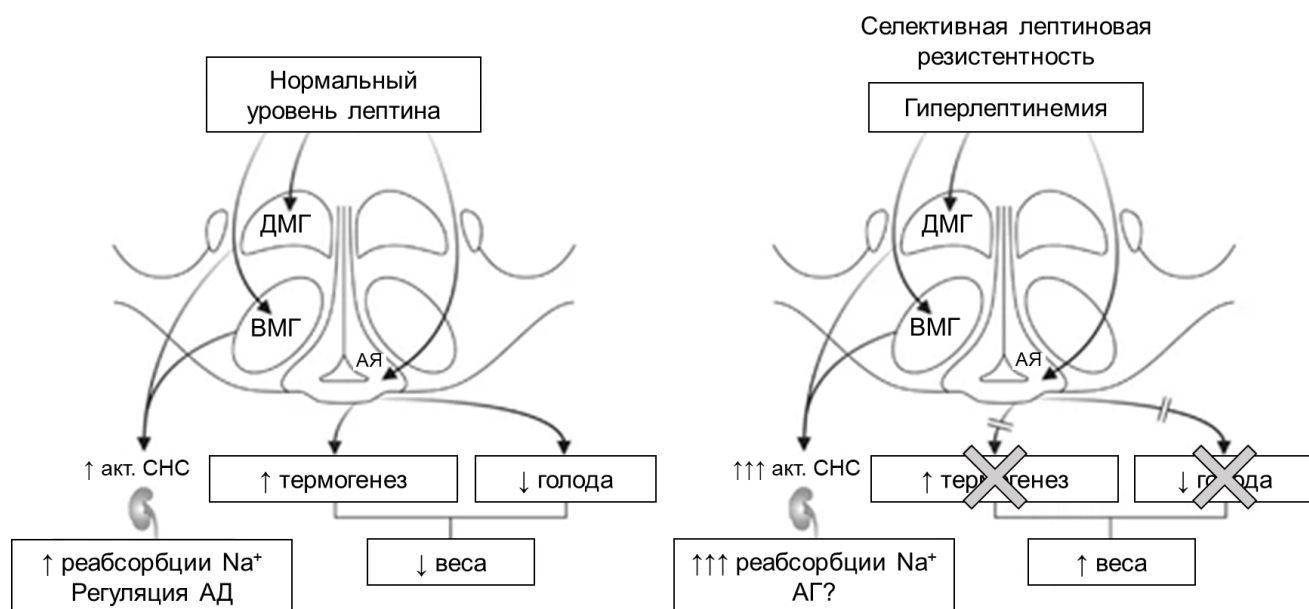


Рисунок 8. Селективная лептиновая резистентность приводит к развитию артериальной гипертензии и усиливает ожирение вследствие неконтролируемого повышения симпатической иннервации почек, снижения иннервации бурой жировой ткани и возникновения чувства насыщения [78] (с изменениями). АЯ - аркуатное ядро, ДМГ - дорсомедиальный гипоталамус, ВМГ - вентромедиальный гипоталамус, АД - артериальное давление, АГ - артериальная гипертензия, СНС - симпатическая нервная система.

Помимо стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов катехоламины также активируют β -адренорецепторы, что усиливает продукцию ренина юктагломерулярными клетками почек и повышает частоту сердечных сокращений. Повышение уровня ренина активирует ренин-

ангиотензиновую систему [159]. Активация РАС в свою очередь также опосредована повышением синтеза ангиотензиногена и альдостерона жировой тканью. Образующийся в РАС ангиотензин II способствует повышению тонуса сосудов и стимулирует корковое вещество надпочечников, что увеличивает синтез альдостерона. Альдостерон воздействует на каналцы нефронов почек и повышает реабсорбцию натрия, что способствует увеличению объема циркулирующей крови [202]. Таким образом гиперактивация симпатической нервной системы опосредует повышение активности РАС, что приводит к развитию артериальной гипертензии за счет усиления вазоконстрикции и увеличения объема циркулирующей крови (Рис. 9).

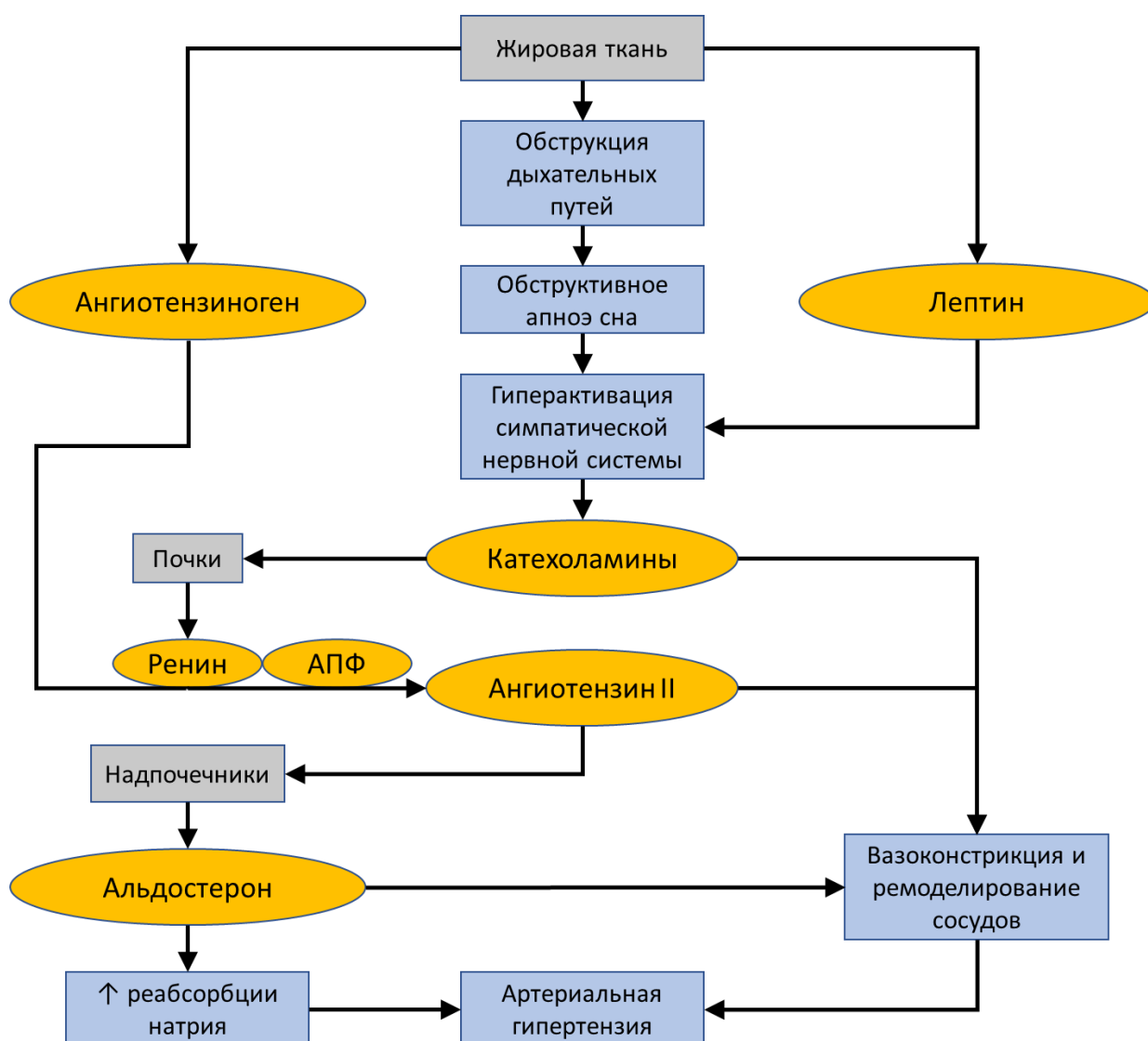


Рисунок 9. Основные механизмы развития артериальной гипертензии при ожирении.

Усиление вазоконстрикции при ожирении происходит не только из-за увеличения уровня вазоконстрикторов в крови, но и также за счет нарушения механизмов эндотелий-зависимой вазодилатации. Нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации является следствием развития инсулинорезистентности, окислительного стресса и воспаления в периваскулярной жировой

ткани. Все эти факторы повреждают эндотелий сосудов, что также опосредует развитие атеросклероза у пациентов с ожирением [33].

Усиление вазоконстрикции при ожирении является обратимым процессом, при снижении массы тела уровень активности СНС падает, что приводит к снижению АД. Однако ожирение также связано с механизмами, приводящими к необратимой потере сосудами способности к вазодилатации, называемую ремоделированием сосудов. Ремоделированием сосудов считается потеря эластичности сосудов из-за изменения в составе внеклеточного матрикса, продуцируемого сосудистыми клетками. Ожирение приводит к увеличению синтеза TGF- β и CTGF, что повышает синтез фибронектина и коллагенов сосудистыми клетками. Увеличение количества фибронектина и коллагена приводит к фиброзу сосудов и нарушению их эластических свойств [75]. Потеря эластичности приводит к неспособности сосудов расслабляться, что не позволяет снизить артериальное давление [33]. Можно заключить, что ожирение опосредовано необратимыми изменениями в структуре сосудистой стенки, что нарушает их способность к вазодилатации.

Таким образом, ожирение приводит к артериальной гипертензии путем активации симпатической нервной и ренин-ангиотензиновой систем, а также за счет развития инсулинорезистентности и воспаления периваскулярной жировой ткани. Активация вышеописанных систем и развитие патологических процессов приводит к усилению вазоконстрикции, увеличению объема циркулирующей крови и ремоделированию сосудов.

1.7. МСК в регенеративной медицине

Помимо участия в развитии ожирения и артериальной гипертензии, МСК также могут включаться в патогенез других заболеваний, например, ишемических болезней сердца, болезней печени, почек и центральной нервной системы. В связи с этим данные клетки могут быть мишенью или применяться в качестве терапии различных заболеваний. С каждым годом растет количество доклинических и клинических испытаний применения МСК для лечения различных заболеваний. Изучается их применение в ортопедии, для лечения аутоиммунных заболеваний, реакций отторжения трансплантата, тяжелых воспалительных состояний, дегенеративных заболеваний [124, 160].

Для дальнейшего описания клинических исследований необходимо привести ряд терминов. Клинические испытания – экспериментальное исследование с вовлечением людей, при котором сравниваются 2 и более методов терапии или метод терапии и плацебо. Клинические испытания делят на 4 фазы. На первой фазе проверяется безопасность нового вида терапии,

токсические эффекты на организм человека. На втором этапе эффективность, оптимальное дозирование и побочные эффекты. Третья стадия заключается в сравнении нового метода лечения с существующей терапией и более подробная оценка побочных эффектов. А на последнем этапе проверяется выживаемость пациентов после применения нового метода лечения, а также долгосрочные побочные эффекты и эффективность. Большая часть клинических испытаний препаратов, основанных на применении МСК, находится на 1-2 фазах [41]. Следовательно, клиническое применение МСК пока проходит стадии оценки безопасности и оптимального дозирования и меньшей степени эффективности по сравнению с имеющейся терапией.

На сегодняшний день наиболее перспективно в клиническом плане себя показывают не сами клетки, а их секретом. Секретом МСК собирают путем кондиционирования клеток в течение 1-3 суток. Клетки выращивают на 100 мм чашках Петри до плотности 80-100% от монослоя. Затем среду заменяют на бессывороточную и выдерживают в ней клетки в течение 24-72 часов. За это время в среде накапливается большое количество секретируемых МСК факторов роста, цитокинов, везикул и малых молекул [76]. Супернатант с секретомом можно сразу применять или концентрировать для повышения уровня активных факторов. Также применяют методы обогащения секретома определенными фракциями. Например, концентрированием на фильтрах с определенным размером пор можно получить исключительно белковую фракцию секретома. У секретома есть ряд преимуществ по сравнению с самими МСК. Во-первых, культивированные клетки не безопасно подсаживать человеку, так как это может приводить к развитию опухолей. В культуре клетки делятся в разы быстрее, чем в организме человека, помимо этого высокая скорость роста приводит к накоплению генетических ошибок в клетках. Во-вторых, основные эффекты самих клеток определяются их секретомом, а сами клетки часто быстро умирают после подсаживания в организм. В-третьих, необходимость постоянно получать первичные культуры МСК повышает цену лечения самими клетками. Также немаловажным фактором является высокая гетерогенность МСК в зависимости от донора клеточного материала, что снижает универсальность данного лечения [197]. В отличие от клеток, секретомом можно набирать с культивируемых иммортализованных линейных МСК с известными охарактеризованными свойствами. Помимо того, что эти клетки можно вести много пассажей, их свойства можно модифицировать путем введения различных генно-инженерных конструкций. Меняя свойства клеток, можно контролировать состав секретома, повышая его терапевтические свойства при том или ином заболевании.

На сегодняшний день проходят клинические исследования применения МСК в лечении COVID-19, болезней глаз, ЖКТ, сердечно-сосудистой системы, иммунной и мочевыводящей

систем, а также метаболических, дерматологических, ортопедических и дегенеративных заболеваний. При этом рассматривается применение МСК из различных источников, КМ-МСК, ЖТ-МСК, МСК пуповины. Наиболее распространены в клинических испытаниях КМ-МСК [41, 124, 155].

Возможности использования МСК для терапии в каждой группе заболеваний определяется их уникальными свойствами. Способность МСК дифференцироваться в адипоциты и регулировать функции жировой ткани позволяет рассматривать их как мишень для лечения ожирения. Клинически значимым является только метаболически нездоровое ожирение, которое сопровождается нарушением секреторной функции жировой ткани и приводит к развитию вторичных патологий, таких как артериальная гипертензия и сахарный диабет. Метаболически нездоровое ожирение характеризуется преимущественной гипертрофией адипоцитов висцеральной жировой ткани, и слабо связано с увеличением их количества. Гипертрофию адипоцитов связывают с нарушением способности стволовых клеток превращаться в зрелые адипоциты. Отсутствие обновления жировой ткани вкупе с поступающими сигналами к накоплению энергетических запасов приводит к усилению накопления липидов в имеющихся адипоцитах, что приводит к их гипертрофии. Метаболически здоровое ожирение, напротив, связано с гиперплазией адипоцитов подкожной жировой клетчатки, возникающих вследствие дифференцировки стволовых клеток. Накопление липидов при этом происходит равномерно между многими адипоцитами.

Для перевода метаболически нездорового ожирения в здоровое требуется активация дифференцировки МСК. Одними из наиболее распространенных лекарств, которые могут управлять дифференцировкой МСК в адипоциты, являются тиазолидиндионы, которые активируют транскрипционный фактор PPAR γ , являющийся мастером-регулятором адипогенной дифференцировки МСК [9]. Применение этих препаратов улучшает профиль секреции цитокинов жировой тканью, увеличивает количество адипоцитов и снижает уровень хронического воспаления жировой ткани [77]. Однако одним из основных побочных эффектов данных препаратов является набор веса, усугубляющий ожирение. Другим подходом может быть превращение МСК в бежевые адипоциты. Ожирение вызывается ростом размеров и количества белых адипоцитов, запасующих липиды. Однако МСК способны дифференцироваться не только в белые, но и в бежевые адипоциты, которые осуществляют термогенез, окисляя липиды. Помимо этого, белые адипоциты могут трансдифференцироваться в бежевые [131]. Продуктами работы бежевых адипоцитов являются тепло и вода, образующиеся при расщеплении липидов в процессе β -окисления жирных кислот в жировой ткани. Тепло легко выводится с поверхности кожи, а вода с мочой, потом и при дыхании. Запуск процесса образования бежевых адипоцитов может стать

перспективным методом лечения ожирения за счет эндогенных ресурсов организма без значимых побочных эффектов. На данный момент не существует препаратов, которые контролировали бы процесс образования бежевых адипоцитов в человеке. Однако существуют животные модели, в которых воспроизводится формирование бежевых адипоцитов при длительном действии холода или агониста $\beta 3$ -адренорецепторов [198]. Изучение механизмов дифференцировки МСК в адипогенном направлении может обнаружить новые мишени для создания терапии ожирения.

Исследования применения МСК в травматологии и ортопедии основываются на способности этих клеток дифференцироваться в остеобласты и хондробласты. Остеобласты и хондробласты в свою очередь секретируют внеклеточный матрикс и строят строму костной и хрящевой ткани [29, 142, 180]. Одним из примеров возможного использования МСК может являться лечение остеоартрита – хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание суставного хряща и субхондральной костной ткани. Регенерации хряща можно достичь, если добавить в колено биоактивные вещества, способствующие дифференцировке уже имеющихся в суставной жидкости МСК в хондробласты, например BIOF2 [32, 132, 192]. Другим подходом является прямое введение МСК пациента в больной сустав. Мультицентровое рандомизированное контролируемое исследование внутрисуставной инъекции аутологичных КМ-МСК показало улучшение функции коленного сустава в течение 4 лет [94]. А группа Cécile Gjerde провела клинические испытания применения аутологичных КМ-МСК в качестве активаторов регенерации кости при тяжелой атрофии нижней челюсти. Было показано значительное увеличение объема костной ткани при лечении стволовыми клетками [45].

Благодаря проявляемым иммуномодулирующим свойствам имеются перспективы применения МСК в лечении аутоиммунных и других тяжелых воспалительных заболеваний. Первая фаза клинических испытаний показала безопасность применения аллогенных МСК пуповины в лечении сепсиса [64]. Исследования применения МСК для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) показали, что эти клетки приводят к даунрегуляции циклооксигеназы 2 типа путем активации сигнального каскада ERK. Снижение активности ЦОГ2, вероятно, приводит к уменьшению образования провоспалительных простагландинов в тканях легких. Также МСК снижают вызванные сигаретным дымом рекрутирование и активацию макрофагов. Первая фаза клинических испытаний показала безопасность и положительный эффект применения МСК в качестве терапии ХОБЛ. Наблюдалось увеличение количества регуляторных Т-лимфоцитов, снижение уровня С-реактивного белка. Вероятно, МСК подавляют воспалительный процесс при ХОБЛ [12, 53]. Применение МСК в лечении ХОБЛ может помочь снизить частоту и тяжесть осложнений у пациентов.

Также МСК могут найти своё применение в лечении заболеваний печени, в частности фиброза/цирроза печени. Фиброз печени представляет собой следствие хронического повреждения печени при вирусном гепатите или алкоголизме. При таком хроническом повреждении происходит активация резидентных иммунных клеток печени, что вызывает формирование положительной обратной связи, усиливающей повреждение гепатоцитов. МСК за счет секреторной активности и межклеточных взаимодействий могут снижать активность иммунных клеток [37, 209]. Помимо этого, МСК могут *in vivo* дифференцироваться в клетки, подобные гепатоцитам. Группа Guo-Zun Zhang на животной модели фиброза печени показала, что инфузия человеческих МСК пуповины приводит к улучшению биохимических показателей у крыс. А иммуногистохимические данные показали возникновение клеток, секретирующих человеческий альбумин, в ткани печени крыс [214]. Эти данные указывают на возможное применение МСК как источника регенерации гепатоцитов при лечении заболеваний и патологических состояний, связанных с тяжелым повреждением печени, например, цирроза, тяжелого вирусного гепатита и стеатогепатита.

МСК обладают нейропротективными свойствами за счет ингибирования апоптоза клеток и воспаления, усиления ангиогенеза и нейрогенеза, секреции нейротрофических факторов. Нейропротективные свойства МСК пытаются использовать в лечении неврологических заболеваний. Рандомизированное плацебо-контролируемое слепое исследование терапии детского церебрального паралича (ДЦП) показало эффективность применения МСК пуповинной крови. У детей с ДЦП наблюдалось значительное улучшение моторных функций, если к лечению добавлялись инфузии МСК, по сравнению со стандартной терапией [68]. А группа ученых под руководством Oh Young Bang показала эффективность применения аутологичных МСК в лечении ишемического инсульта в бассейне среднемозговой артерии [98].

МСК приводят к регенерации сердечной мышцы вследствие их способности останавливать фиброз и ремоделирование сердца, вызывать ангиогенез и активировать дифференцировку стволовых клеток [127]. В 2008-2009 годах проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование эффективности внутривенного введения МСК пациентам с инфарктом миокарда. Было показано, что в группе пациентов, которым вводили МСК, в отдаленном периоде снизилось количество эпизодов желудочковой тахикардии, улучшилась функция легких и фракция выброса левого желудочка. При этом количество побочных эффектов не отличалось между контрольной и экспериментальной группами [68]. А в 2021 году был проведен метаанализ клинических исследований применения МСК для лечения острого инфаркта миокарда (ОИМ), показавший высокую эффективность новой терапии. По результатам анализа было установлено, что введение МСК пациентам с ОИМ приводило к

увеличению фракции выброса левого желудочка. Также было установлено, что введение МСК в первые недели после возникновения ОИМ улучшает эффект от данной терапии [14]. Таким образом, можно заключить, что лечение ишемических заболеваний головного мозга и сердца может стать перспективным направлением применения МСК.

Таким образом, МСК являются мультипотентными стволовыми клетками взрослого организма, которые играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тканей, регуляции процессов регенерации и репарации. За счет мощной паракринной активности МСК, выражающейся в секреции множества факторов роста, цитокинов и других гормоноподобных веществ МСК регулируют функционирование других клеток ткани. Нарушение функциональной активности МСК связывают с развитием ряда патологических состояний, например, ожирения, сахарного диабета, злокачественных новообразований и ряда других. Ожирение широко распространено в современном обществе, является социально значимым заболеванием и ассоциировано с развитием порядка 70% случаев артериальной гипертензии. Основным механизмом возникновения артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, считается усиление вазоконстрикции вследствие гиперактивации симпатической нервной системы и РАС. При этом повышение активности данных систем происходит почти всегда при ожирении, но артериальная гипертензия развивается не у всех пациентов, страдающих от ожирения. Возможность перехода МСК в ГМК-подобные клетки позволяет предположить, что данные клетки занимают ключевую роль в патологическом механизме развития артериальной гипертензии при ожирении. Изучение механизмов гормональной регуляции функциональной активности МСК позволит разработать новые методы терапии заболеваний, ассоциированных с нарушениями функционирования МСК, в частности артериальной гипертензии.

2. Материалы и методы

2.1. Иммуногистохимический анализ экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани

Подкожную жировую ткань человека получали из области живота при проведении травматологических операций в госпитале Бурденко, Москва. Все доноры дали добровольное информированное согласие. Локальные этические комитеты главного военного клинического госпиталя имени Бурденко (Москва, Россия) и медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова (IRB00010587, Москва, Россия) одобрили протокол исследования №160 от 22 июля 2019 года и №4 от 4 июня 2018 года соответственно. Образец подкожной жировой ткани делился на несколько частей. Часть образца подкожной жировой ткани человека помещали в реагент tissue-tek ovt compound (Sakura Inc., Токио, Япония) и замораживали в жидком азоте. Срезы фиксировали в 4% пара-формальдегиде в течение 10 мин. Далее срезы промывали фосфатным буфером (PBS) и инкубировали в 0,1% бычьим сывороточным альбумине (BSA), содержащем 10% нормальной ослиной сыворотки (normal donkey serum), для блокирования неспецифического связывания антител. Затем следовала инкубация со специфическими первичными антителами в течение 1 часа и последующая интенсивная промывка в PBS. Затем срезы инкубировали с конъюгированными с Alexa594 ослиными антителами против кролика (A-21207, Thermo Fisher Scientific) и с конъюгированными с Alexa488 козьими антителами, специфичными к мышинным иммуноглобулинам (A-11001, Thermo Fisher Scientific). Адренорецепторы визуализировали в ткани путем иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов толщиной 10 мкм с использованием антител к $\alpha 1A$ - (ab137123, Abcam, 1:250), $\alpha 1B$ - (ab169523, Abcam, 1:100), $\alpha 1D$ - (sc-390884, Santa Cruz, 1:100), $\beta 3$ -адренорецепторам (Abnova, H00000155-B01P, 1:100). Для оценки совместной локализации клеток, экспрессирующих различные изоформы адренорецепторов, и сосудов проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: срезы инкубировали со смесью антител к адренорецепторам (ab137123, Abcam) и/или антител к эндотелиальным клеткам (CD31, IR610, Dako), или гладкомышечным клеткам (α -SMA, M0851, Dako), или мультипотентным стромальным клеткам (PDGFR β , P7679, Sigma-Aldrich), или симпатическим нервам (тирозингидроксилаза, AB152, Sigma-Aldrich). Ядра клеток окрашивали DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) и срезы монтировали в Aqua Poly/Mount (Cat#18606, Polysciences Inc). В качестве отрицательного контроля использовали мышинные или кроличьи неспецифические IgG в соответствующей концентрации. Изображения были получены с использованием конфокального микроскопа LSM 780, программного обеспечения ZEN2010 (Zeiss) и ImageJ (NIH) [163].

2.2. Выделение первичной культуры МСК

Первичные культуры МСК выделяли из подкожной жировой ткани человека [123, 215]. Подкожная жировая клетчатка состоит из кровеносных сосудов, нервных окончаний и непосредственно белой жировой ткани. Белая жировая ткань состоит из внеклеточного матрикса и различных клеток. Внеклеточный матрикс богат коллагеном, также он включает ламинин, фибронектин, гепаран сульфат и прочие белки. Клеточный компонент в основном состоит из адипоцитов, но также содержит МСК, преадипоциты, резидентные макрофаги и прочие клетки иммунной системы. МСК располагаются периваскулярно в строме ткани. Чтобы выделить клетки из жира, необходимо разрушить межклеточные контакты и внеклеточный матрикс, который, как сеть, удерживает клетки. Этапы выделения МСК из жировой ткани (Рис. 10):

1. Готовили стерильный раствор Хэнкса с коллагеназой, диспазой, антибиотиками (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковым препаратом (Амфотерицин Б). Итоговые концентрации коллагеназы – 400 ЕД/мл, диспазы 2 мг/мл, пенициллина 100 ЕД/мл, стрептомицина 100 мкг/мл и амфотерицина Б 2,5 мкг/мл.
2. Измельчали жир. Данный этап облегчал дальнейшее ферментативное расщепление коллагена внеклеточного матрикса и разрушение межклеточных контактов.
3. Добавляли раствор ферментов к нарезанному жиру в отношении 1:1 по объему.
4. Инкубировали полученную смесь при 37°C в течение 0,5-1 часа. На данном этапе коллагеназа и диспаза разрушали внеклеточный матрикс и межклеточные контакты.
5. С помощью центрифугирования на скорости 200 оборотов/мин в течение 10 минут разделяли смесь на 4 слоя. Верхними двумя слоями оказывались жир и белые адипоциты, третьим слоем – раствор коллагеназы, в нижнем слое оставались остальные клетки. Аспирировали верхние три слоя.
6. Добавляли среду AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащую 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, USA) и 1% раствор антибиотика, и суспензировали полученный раствор. Среда ингибировала ферменты, поэтому полностью снижалась активность коллагеназы и диспазы.
7. Переносили раствор на пластиковую чашку Петри. МСК хорошо адгезировали к пластику в отличие от остальных клеток.
8. На следующий день добавляли 1 мл среды роста и ждали 2 дня полного осаждения клеток на чашку.

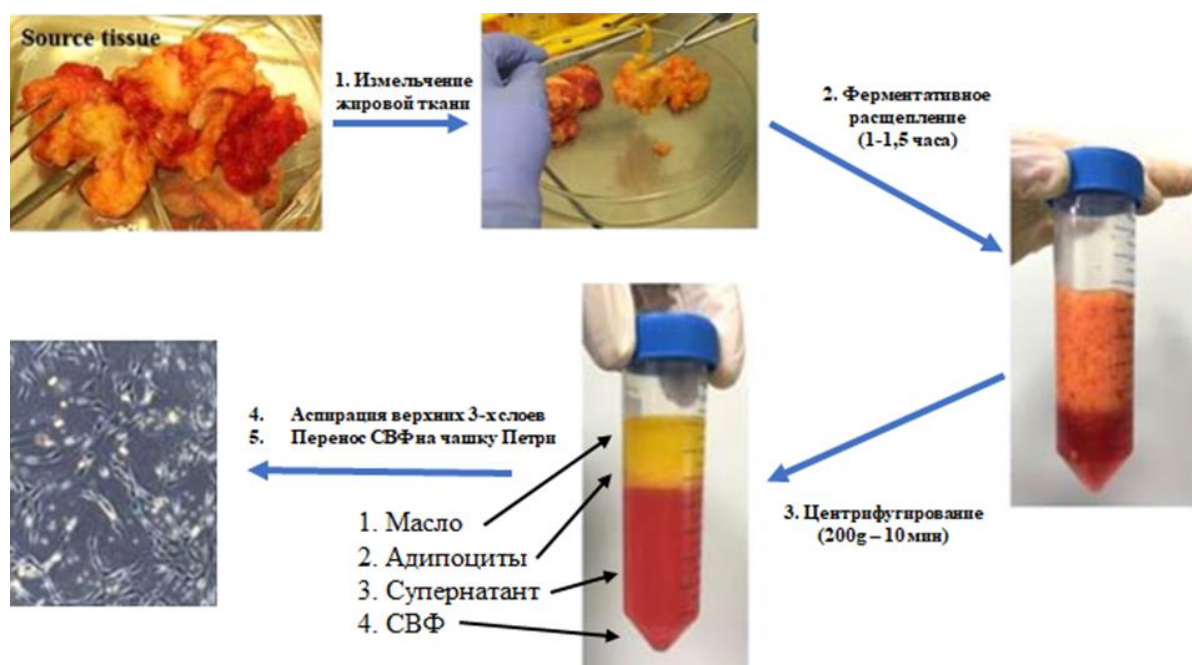


Рисунок 10. Этапы выделения МСК из донорской жировой ткани. СВФ – стромально-васкулярная фракция [215] (с изменениями).

2.3. Культивирование первичной культуры МСК

Первичные клеточные культуры МСК вели на 60 мм чашках в AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media с добавлением 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, Logan, UT, USA) и 1% раствор антибиотика-антимикотика (HyClone, Logan, UT, USA), в инкубаторе при температуре 37°C и с 5% содержанием CO₂. Пересаживали первичные МСК с помощью растворов Версена и трипсина (Кат. №: П034, ПанЭко, Россия). При достижении плотности в 90-100% от конфлюэнтного монослоя клетки отмывали от среды роста 3 раза с использованием 4 мл раствора Версена. Затем раствор Версена аспирировали и клетки заливали 500-600 мкл 0,25% раствора трипсина и ставили в инкубатор на 2-3 минуты. Далее добавляли 5 мл среды роста и центрифугировали 180 об/мин в течение 3 минут. Супернатант аспирировали, чтобы избавиться от раствора трипсина. Клеточный осадок разводили в 5 мл свежей среды роста и распределяли на 3-4 новые 60 мм чашки Петри. Первичную культуру МСК пересаживали 8-9 раз (доводили до 8-9 пассажа), чтобы избежать избыточного накопления сенесцентных клеток в культуре и связанного с этим изменения свойств клеток (пролиферативная активность, морфология, метаболизм и способность к дифференцировке).

После выделения МСК из жировой ткани клетки высаживали на культуральные стекла и проверяли на контаминацию микоплазмой. Для этого культуральные стекла с клетками фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 минут и отмывали раствором фосфатно-солевого буфера. После промывания к фиксированным клеткам добавляли раствор

DAPI (1:5000, D9542, Sigma-Aldrich) в течение 10 минут [210]. Затем клетки промывали фосфатным буфером 2 раза. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Токио, Япония) и камерой Andor iXon 897 (Andor Technology, Белфаст, Великобритания).

2.4. Ca^{2+} -сигнализация

Функциональные ответы МСК на норадреналин регистрировали на уровне одиночных клеток, чтобы оценить индивидуальную чувствительность МСК к данному нейромедиатору.

1. За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 48-луночный планшет в плотности 5% от монослоя так, чтобы клетки сидели поодиночке. Такая плотность посадки обусловлена необходимостью анализа чувствительности к норадреналину отдельных клеток. В монослое МСК образуют щелевые контакты, что способствует перетеканию ионов и вторичных посредников и распространению воспринимаемого сигнала на соседние клетки [193].
2. Активацию α -адренорецепторов определяли по изменению концентрации кальция в клетках. Для этого клетки окрашивали с помощью проникающего через мембрану красителя Fluo8-AM, который после отщепления ацетометилowych групп становится чувствительным к изменениям внутриклеточного уровня кальция (Abcam, Кембридж, Великобритания, ab142773). Чтобы снизить уровень аутофлуоресценции среды, перед окрашиванием клетки промывали 3 раза с помощью 0,3 мл раствора Хэнкса. Затем добавляли Fluo8 в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л в растворе Хэнкса с Хепесом 20 мМ. Хепес добавляли для поддержания уровня pH вне инкубатора. Клетки окрашивали в течение 1 часа в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 .
3. Для активации α -адренорецепторов использовали норадреналин (Abcam, Кембридж, Великобритания, ab120717) в концентрации 1 мкМ, так как он является нейромедиатором симпатической нервной системы. Норадреналин разводили в растворе Хэнкса с Хепесом 20 мМ непосредственно перед добавлением к МСК.
4. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Токио, Япония) и камерой Andor iXon 897 (Andor Technology, Белфаст, Великобритания). Для регистрации кальциевых ответов на добавление норадреналина на уровне одиночных клеток сначала записывали базальную активность клеток в течение 5-10 минут. Затем, не останавливая записи фильма, прямо под микроскопом добавляли к клеткам гормон в 2х концентрации и в объеме, равном объему среды над клетками для эффективного

перемешивания сред. Далее записывали фильм в течение необходимого времени (обычно дополнительно 10-15 мин). Изменение концентрации внутриклеточного кальция определяли в каждой клетке по отношению изменения интенсивности флуоресценции Fluo8 с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония). Чтобы увеличить количество анализируемых клеток (100-200 штук), мы снимали 36 полей зрения одновременно в режиме большого поля (Large Image). Определяемым показателем служило изменение числа клеток, отвечающих на норадреналин или агонисты адренорецепторов, по сравнению с контролем. Доля отвечающих клеток определялась как отношение количества отвечающих клеток к общему количеству клеток в поле зрения микроскопа.

Для исследования изменения чувствительности клеток при гиперактивации симпатической нервной системы за 6 часов до эксперимента клетки инкубировали в растворах AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media с норадреналином 1 мкМ в течение 1 часа. В экспериментах по исследованию сигнального каскада, активируемого при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы, специфические ингибиторы добавляли за 15-30 минут до добавления норадреналина. Чтобы избежать разведения ингибитора, для преинкубации к норадреналину также примешивали ингибитор. Через 1 час клетки промывали 3 раза по 0,3 мл раствором Хэнкса и оставляли в среде роста в инкубаторе. С контрольными лунками проводили все те же операции, что и с экспериментальными, но без добавления норадреналина и/или специфических ингибиторов. Схемы преинкубации и Ca^{2+} -сигналикации представлены ниже (Рис.11).

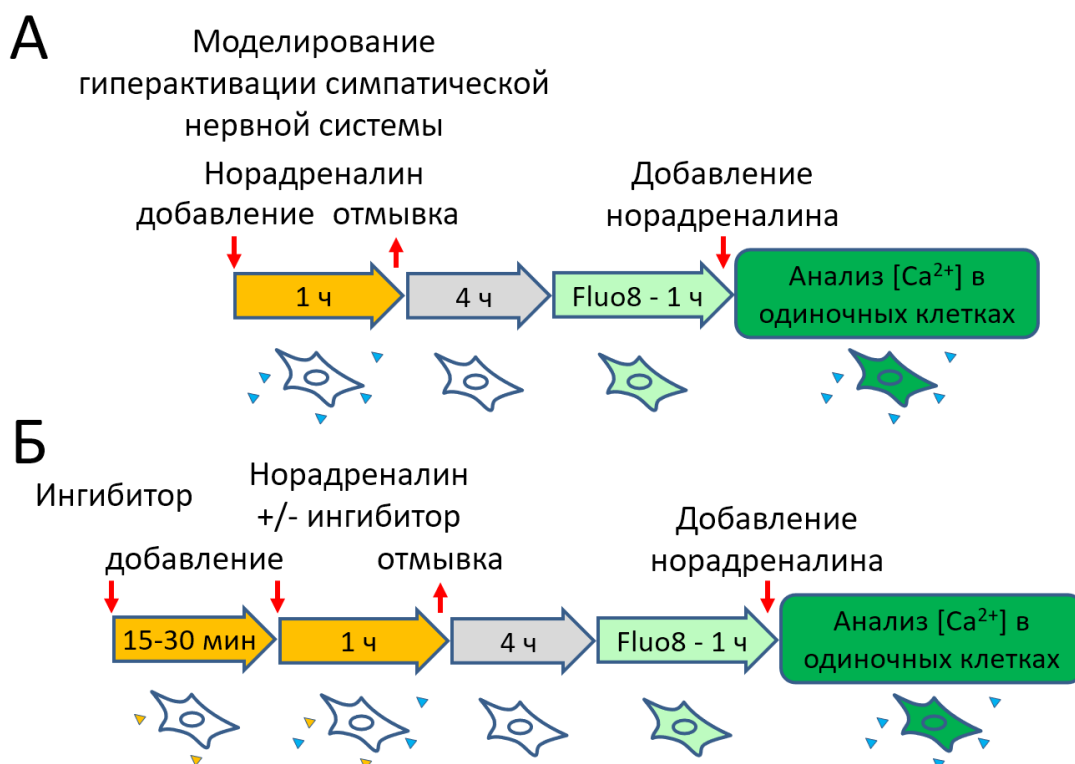


Рисунок 11. Схемы моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и анализа чувствительности МСК к норадреналину путем регистрации кальциевых ответов в одиночных клетках. А. Ca^{2+} -сигнализация при стимуляции норадреналином после преинкубации с норадреналином в течение 1 часа (моделирование гиперактивации симпатической нервной системы). Б. Схема эксперимента по анализу сигнального каскада, запускаемого норадреналином при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы.

2.5. Подготовка библиотек для анализа транскриптома одиночных клеток

Анализ транскриптома одиночных клеток проводили на МСК первого пассажа из подкожной жировой ткани человека. Клетки предварительно тестировали на то, что они проявляют высокий уровень сенситизации к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. Для подготовки образцов использовали 6-луночные планшеты с плотностью посадки клеток 60% от монослоя. МСК анализировали через 12 часов после двукратной обработки норадреналином в течение 1 часа с интервалом в 6 часов (Моделирование гиперактивации симпатической нервной системы - Норадреналин). Первая обработка норадреналином моделировала гиперактивацию симпатической нервной системы, а вторая воздействовала на повышенные $\alpha 1A$ -адренорецепторы. В качестве контроля использовали клетки, обработанные пустой средой без норадреналина. Клетки открепляли с помощью 0,25% раствора трипсина после 3-кратной промывки раствором Версена, как при пересадке. Для ингибирования трипсина добавляли 5 мл AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, центрифугировали 250 об/мин в течение 5 минут, аспирировали супернатант и добавляли 4 мл свежей среды роста. Чтобы удалить конгломераты клеток и дебрис, суспензию пропускали через

клеточное сито с диаметром пор 70 мкм. Для подсчета количества клеток использовали автоматический счетчик Countess с применением 0,4% раствора трипанового синего (Thermo Fisher Scientific, США). Далее суспензию клеток центрифугировали 180 об/мин в течение 3 минут, аспирировали супернатант и добавляли раствор PBS с 0,04% бычьего сывороточного альбумина из расчета 1000 кл/мкл. Объемы суспензии МСК брали с целью получить 10000 клеток на образец. Суспензии одиночных МСК прогоняли через Chromium Controller (10x Genomics, США) вместе с баркодированными гелевыми шариками. Каждый гелевый шарик содержал специальные последовательности РНК, состоящие из уникального для каждого шарика баркода, набора уникальных молекулярных идентификаторов и олиго-dT последовательности, на которую закреплялись поли-A участки мРНК. Уникальные молекулярные идентификаторы (UMI) метят каждую отдельную молекулу РНК. По количеству уникальных молекулярных идентификаторов одного типа мРНК можно судить об экспрессии гена в клетке. Далее образцы преобразовали в библиотеки scRNA-seq с использованием Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1, Chip D Single Cell DNA Kit и i7 Multiplex Kit (10x Genomics, США). Таким образом каждый образец превращался в библиотеку из набора мРНК каждой клетки отдельно. Образцы обрабатывали с использованием набора для баркодирования Library & Gel Bead Kit v3.1 (10x Genomics, США). Отдельные образцы (контроль и моделирование гиперактивации симпатической нервной системы – норадреналин) обрабатывали параллельно в соседних лунках одного ПЦР-планшета, в одном и том же термоциклере и системе секвенирования Illumina HiSeq1500.

2.6. Биоинформатический анализ транскриптома одиночных клеток

Секвенированные образцы были проанализированы с помощью референсного генома человека 38 версии (NCBI build 38, GRCh38) с использованием программного обеспечения Cell Ranger 6.1.2 (10x Genomics, США) в Linux [56]. Качественно секвенированными клетками считали МСК со следующим набором характеристик: >2500 или <7500 регистрируемых генов, >7000 или <70000 уникальных молекулярных идентификаторов и <5% митохондриальных мРНК. Остальные МСК были отфильтрованы как клетки низкого качества и не использовались для дальнейшего анализа. Эти параметры обусловлены рекомендациями производителя [217]. Данные из образцов были обработаны с использованием R-studio 1.4 (RStudio, Бостон, США) с версиями R 4.1.2 и Seurat 4.0.4 для регрессии митохондриальных генов [60]. Интеграция образцов выполнялась с помощью функции IntegrateData на основе схожего паттерна экспрессии 2000 генов. Гены для интеграции определялись с помощью функции SelectIntegrationFeatures на основе двух образцов (контроль, моделирование гиперактивации симпатической нервной системы – норадреналин) по рекомендации поставщика ПО. Для визуализации данных в виде 2d-

плота был применен анализ главных компонент и уменьшение размерности данных с помощью функции RunUMAP. Анализ главных компонент интегрированных образцов был выполнен с использованием тех же 2000 генов, использованных для интеграции. Кластеризация была проведена на основе первых 20 главных компонент с использованием модифицированного алгоритма Лувена [195]. Маркеры кластеров были определены с помощью функции FindAllMarkers методом Уилкоксона на основе уровня экспрессии генов в одиночных клетках. Определение маркеров осуществляли используя следующие параметры: повышение экспрессии в $\geq 1,2$ раза, наличие гена в $\geq 25\%$ клеток и значение $p < 0,05$. Типы клеток были аннотированы автоматически на основе маркеров кластеров с использованием g:Profiler [150]. Чтобы выполнить анализ тенденций изменения транскрипции мРНК, мы оценили количество несплайсированных и сплайсированных форм мРНК, используя velocity 0.17.16 [111]. Полученные данные были объединены с интегрированными образцами, а затем проанализированы с помощью пакета scVelo 0.2.4 на основе динамической модели с использованием параметров по умолчанию [19]. Динамическая модель позволяла предсказывать направление изменения клеток (дифференцировка и вход/выход из клеточного цикла). Изменение транскрипции мРНК визуализировали на интегрированных образцах с помощью UMAP. Построение траекторий развития было выполнено с помощью набора пакетов Dynverse [156] с использованием наиболее оптимального для наших данных метода Paga-tree [207]. Данный метод позволяет определять траекторию между терминальным и начальным состоянием, по которой движутся клетки при дифференцировке. Анализ активности транскрипционных факторов был осуществлен с помощью пакета SCENIC в R на основе 38 версии генома [7]. Данные о CD45- клетках стромально васкулярной фракции были взяты из базы данных NCBI GEO под номером GSE155960.

2.7. Контракция МСК-коллагеновых дисков

Коллаген (PC11-NCL, Imtek) нейтрализовали 1M NaOH (3 мг/мл в 0,1% уксусной кислоте, Imtek). Клетки открепляли от культуральных чашек с помощью 0,25% раствора трипсина (Кат. №: П034, ПанЭко, Россия), как при пересадке. Далее клетки суспензировали и центрифугировали, чтобы удалить трипсин. На 1 лунку 24-луночного планшета отбирали 100 000 клеток, добавляли DMEM LG и коллаген. Далее диск из коллагена и МСК оставляли при комнатной температуре на 30 минут, чтобы произошла полимеризация. Для того чтобы открепить МСК-коллагеновый диск от стенок лунки, добавляли среду для ведения клеток AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащую 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, USA). Через 30 мин после открепления диска к культуральной среде добавляли норадреналин так, чтобы итоговая концентрация была $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Через 1 ч диски промывали

DMEM LG и заменяли среду на свежую среду AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media) с 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, США). Через 5 часов в среду снова добавляли норадреналин. Площадь диска измеряли с помощью Nikon SMZ18 до и через 30 минут, 12, 24 ч после второго добавления норадреналина. Краткая схема эксперимента представлена на Рис. 12. Процент сокращения МСК-коллагенового диска (k) рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{S(t)}{S_0} \times 100\%$$

$S(t)$ - площадь диска через 30 минут, 12, 24 часа после второго добавления норадреналина,
 S_0 - площадь диска до второго добавления норадреналина [125].

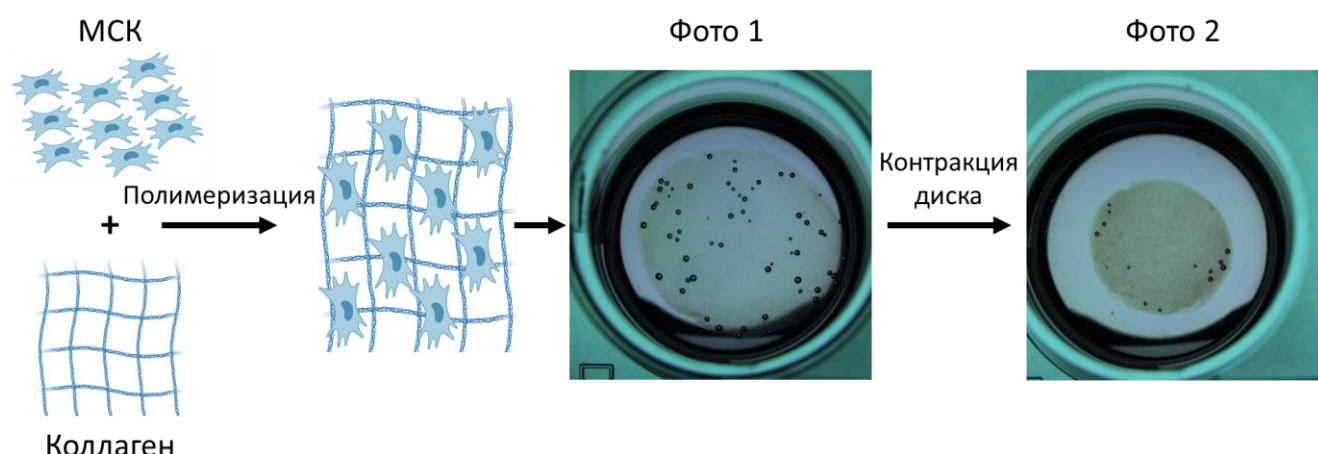


Рисунок 12. Схема образования и контракции дисков, полученных сополимеризацией мезенхимных стромальных клеток и коллагена.

2.8. Иммунофлуоресцентный анализ локализации ПКА в одиночных клетках

За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 24-луночный планшет в плотности 5% от монослоя так, чтобы клетки сидели по одиночке. Для активации цАМФ-зависимой протеинкиназы (ПКА) МСК инкубировали 30 минут с норадреналином 1 мкМ, растворенном в среде роста (Abscam, ab120717, Кембридж, Великобритания). В качестве контроля использовали клетки, инкубированные с пустой средой. После стимуляции клетки фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 минут. Затем промывали фосфатным буфером (PBS) (ПанЭко, Москва, Россия) и инкубировали клетки в 0,1% бычьем сывороточном альбумине (БСА), содержащем 10% нормальной ослиной сыворотки, для блокирования неспецифического связывания антител. Далее клетки инкубировали со специфическими первичными антителами против ПКА (PA5-70360, Thermo Fisher Scientific) в течение 1 ч с последующей промывкой с

помощью PBS. Затем клетки инкубировали с конъюгированным с Alexa488 ослиными антителами, специфичными к кроличьим белкам иммуноглобулинам (A-11001, Thermo Fisher Scientific). Ядра клеток контрастировали с DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) и заключали в Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc, Уоррингтон, Пенсильвания, США). В качестве отрицательного контроля использовали неспецифические IgG кролика в соответствующей концентрации. Изображения были получены с использованием конфокального микроскопа LSM 780 и программного обеспечения ZEN2010 (Zeiss, Оберкохен, Германия).

2.9. Вестерн-блоттинг

Клетки высаживали на 100 мм чашки Петри в плотности 60% от монослоя в среде AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media (Gibco, США), содержащей 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, USA) и 1% раствор антибиотика-антимикотика (HyClone, США). В соответствующих экспериментах при необходимости добавляли ингибитор CREB (666-15) в среде или в качестве контроля пустую среду за 30 мин до стимуляции гормонами. Клетки стимулировали раствором норадреналина 10^{-6} М в течение 1 часа для моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, далее чашки трижды промывали раствором Хэнкса и оставляли в питательной среде (Рис. 13). Через 1, 3, 6, 12 и 24 часов после стимуляции среду удаляли, чашки переносили на лед и промывали ледяным фосфатным буфером (5,2 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 и 150 mM NaCl). Далее добавляли 80 мкл 3-кратного SDS буфера без β -меркаптоэтанола (6% SDS, 0,2 М Трис, pH 6,8, 40% глицерина и 0,03% бромфенолового синего) и через 10 минут собирали лизат резиновым скребком (Corning). Образцы пропускали 5 раз через иглу 30G калибра и измеряли концентрацию белка методом Брэдфорда (BioRad, США). Затем в образцы добавляли 50 мкл β -меркаптоэтанола на 1 мл пробы и кипятили 5 мин при температуре 95°C с последующим охлаждением на льду. Подготовку проб ASC52telo после нокаута осуществляли по аналогичной методике без стимуляции норадреналином.

Белки разделяли с помощью белковых гелей Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (BioRad, США) и камеры для электрофореза Mini-PROTEAN 3 BioRad с использованием буфера Tris/Glycine/SDS (разбавленного из 10-кратного буфера для электрофореза, содержащего 25 mM Tris, 192 mM глицин, 0,1% SDS, pH 8,3, BioRad, США). Перенос белков осуществляли на 0,45 мкм поливинилиденфторидные (PVDF) мембраны (Amersham, США) в течение 1 ч при 350 мА в буфере для переноса, содержащем 25 mM Трис, 0,192 М глицина, pH 8,3, 10% этанола и 0,02% лаурилсульфата натрия. Мембраны блокировали в течение 50 минут в 5% обезжиренном молоке, растворенном в TBST (25 mM Трис/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Твин 20). Мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами (таблица 1) в течение ночи при температуре 4°C в разведении, рекомендованном

2.10. ПЦР в реальном времени

Для получения проб МСК от трех доноров ранних пассажей сажали в плотности 90-100% от монослоя на 60 мм культуральные чашки Петри. МСК каждого донора сажали на 6 чашек. В трех чашках среду роста заменяли на новую, содержащую норадреналин в концентрации 1 мкМ для моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. В трех других чашках среду заменяли на пустую без норадреналина. Как контрольные, так и чашки с норадреналином через 1 час отмывали раствором Хэнкса 3 раза по 4 мл. Затем раствор Хэнкса заменяли на свежую среду роста. Через 1, 3 и 6 часов после начала эксперимента лизировали пары чашек от каждого донора – контрольную и инкубированную с норадреналином (Рис. 14). В результате на каждую временную точку мы получали экспериментальный и контрольный образцы. Клетки лизировали с помощью 600 мкл RLT буфера с добавлением 1% β -меркаптоэтанола и получали тотальную РНК в соответствии с протоколом, описанном в RNeasy Mini Handbook (QIAGEN, США) для клеточных культур [146]. Пробы гомогенизировали с помощью вортексирования и путем пропускания через 20G иглу. Тотальную РНК выделяли на спин-колонках по протоколу, описанному в RNeasy Mini Handbook (QIAGEN, США). Количественный и качественный анализ тотальной РНК проводили с помощью оптического спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию тотальной РНК проводили с помощью рандомных (dN)10 праймеров и набора MMLV RT (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя [1]. Полученную кДНК сразу использовали для подготовки полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием готовой смеси qPCRmix-*HS* SYBR (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Праймеры к кДНК, приведенные в таблице 2, синтезировали в компании Евроген (Россия). Реакции проводили в амплификаторе CFX96 Touch (BioRad, США), используя следующую программу:

1. Первичная денатурация в течение 3 мин при 95°C
2. 40 циклов:
 - a. Денатурация в течение 10 секунд при 95°C
 - b. Отжиг праймеров в течение 10 секунд при 64°C (эмпирически подобранная температура для конкретного праймера)
 - c. Элонгация цепи в течение 30 секунд при 72°C с чтением планшета
 - d. Денатурация в течение 10 секунд при 95°C
 - e. Кривые плавления были получены в диапазоне от 65°C до 95°C с шагом в 0,5°C каждые 5 секунд.

Каждую пробу анализировали в дубликатах, используя соответствующий контроль для сравнения уровня экспрессии. В качестве референсного гена для ЖТ-МСК использовали *RPL13A*

[148]. Количественный анализ был выполнен методом $\Delta\Delta C_t$, где ΔC_t отражает разность между циклами регистрации *ADRA1A* и *RPL13A*, а $\Delta\Delta C_t$ – разность между экспериментальным и контрольным образцами. Относительный уровень мРНК представляли в виде $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

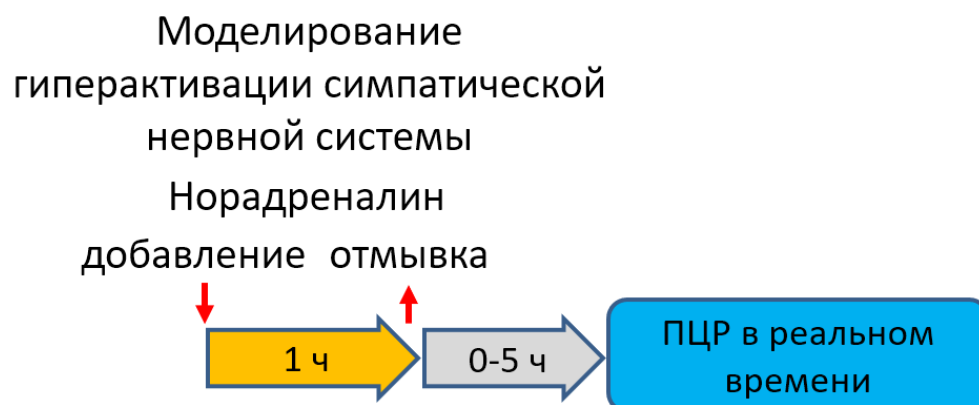


Рисунок 14. Схема стимуляции МСК для анализа уровня мРНК $\alpha 1A$ -адренорецептора.

Таблица 2. Праймеры, использованные для анализа экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецептора в МСК.

Ген	Последовательность нуклеотидов	Длина продукта, п.о.	Ссылка
<i>RPL13A</i>	Прямой 5'- CTCAAGGTCGTGCGTCTGAA-3' Обратный 5'- ACGTTCTTCTCGGCCTGTTT-3'	185	[179]
<i>ADRA1A</i>	Прямой 5'- TGCCAGATCAACGAGGAGC-3' Обратный 5'- GGCGTTTTTCCGATGGATGC-3'	198	[61]

2.11. CRISPR/Cas-опосредованный нокаут *ADRB2* и *ADRB3* в клетках ASC52telo

Для нокаута генов *ADRB2/ADRB3* ($\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецептор соответственно) использовалась пара лентивирусных конструкций, Lentiv2-AncBE4maxR33A-SpCas9D10A(NG)-

P2A-GFP для экспрессии высокоспецифичной цитозиндезаминазы и GFP на основе SpCas9D10A(NG) и Lentiv2-gRNA-RFP для экспрессии гидовой РНК (гРНК) и RFP. Лентивирусные конструкции были собраны с использованием векторов LentiCRISPRv2GFP (#82416, Addgene), pCMV_AncBE4max_P2A_GFP (#112100, Addgene), pX459-SpCas9-NG (#171370). Протоспейсеры гРНК клонировали в Lentiv2-gRNA-RFP с использованием сайтов BsmBI. В качестве гРНК для *ADRB2* и *ADRB3* использовали следующие последовательности соответственно: 5'-GTACCAGAGCCTGCTGACCA и 5'-ACTCCAGACCATGACCAACG. Лентивирусные частицы (LVP), кодирующие компоненты системы редактирования генома CRISPR/Cas9, собирали, как описано ранее [103]. Трансдукцию культуры ASC52telo проводили, как описано ранее [191]. Для подтверждения нокаута *ADRB2* или *ADRB3* ДНК выделяли из популяций ASC52telo и амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в таблице 3. Полученные ампликоны секвенировали по Сэнгеру. Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Австралия). Также, для подтверждения нокаута провели вестерн-блоттинг на β 2- и β 3-адренорецепторы по протоколу, приведенному в разделе 2.9 (Рис. 17 Б).

Таблица 3. Праймеры, использованные для амплификации участков генов *ADRB2* и *ADRB3* ДНК ASC52telo.

Праймер	Последовательность	Длина ампликона, пн	Температура, °C
hADRB2-прямой	GCAACTTCTGGTGCGAGTTT	415	59.5
hADRB2-обратный	AAGCGGCCCTCAGATTTGTC		
hADRB3-прямой	GCAGTAGATGAGCGGGTTGAA	830	60
hADRB3-обратный	ACGTGTTCGTGACTTCGCT		

2.12. Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 15.0 (Systat Software Inc., Калифорния, США) и R-studio 1.4 (Posit, Бостон, США) и языка программирования R версии 4.2.1. Описательная статистика количественных данных представлена медианами, первым и третьим квартилями. Сравнение двух независимых групп проводили с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. Сравнение трех и более независимых групп выполняли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (дисперсионный анализ по рангам (ANOVA on ranks)) с дальнейшим post-hoc анализом. Критический уровень значимости определяли как $p < 0,05$.

3. Результаты

3.1. Регуляция чувствительности МСК к норадреналину

Для ряда тканей, в первую очередь, костного мозга, показано, что норадреналин является ключевым регулятором функций МСК [71]. Используя иммуногистохимическую окраску, мы показали, что в жировой ткани периваскулярно расположенные МСК непосредственно иннервированы волокнами симпатической нервной системы (Рис. 15 А). Ранее в нашей лаборатории было показано, что МСК демонстрируют уникальный механизм регуляции адренергической чувствительности, при котором $\alpha 1A$ -адренорецепторы подвергаются гетерологической сенситизации. Данный феномен заключается в увеличении количества клеток, отвечающих на норадреналин повышением уровня внутриклеточного кальция через 6 часов после преинкубации с норадреналином. Причем повышение чувствительности связано со специфическим повышением экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Такая преинкубация клеток с норадреналином является моделью гиперактивации симпатической нервной системы, которая развивается *in vivo* в ряде патологий [48, 51, 147].

На первом этапе работы мы выяснили временные характеристики изменения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов и чувствительности клеток к норадреналину. Мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы путем стимуляции культуры МСК норадреналином (1 мкМ) в течение 1 часа. Далее анализировали экспрессию и функциональную активность $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК жировой ткани. При помощи вестерн-блоттинга мы показали, что в результате моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходит транзиторное увеличение экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Уровень белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов повышался в 2.22 раза [1,09; 2,98] ($p = 3.896 \cdot 10^{-7}$) через 6 часов и снижался к базальному уровню через 12 часов после воздействия норадреналина (Рис. 15 Б-В). Функциональную активность адренорецепторов определяли на уровне одиночных клеток по изменению цитоплазматического уровня кальция после воздействия норадреналина. Мы показали, что через 6 часов после преинкубации с норадреналином происходит увеличение доли клеток, чувствительных к норадреналину и отвечающих кальциевой сигнализацией. При этом увеличение чувствительности клеток является транзиторным и возвращается к базальному уровню через 12 часов после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (Рис. 15 Г-Е). Эти данные коррелировали с изменением уровня белка $\alpha 1A$ -адренорецептора. Таким образом, воздействие норадреналина на МСК приводило к повышению количества функционально-активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов в этих клетках.

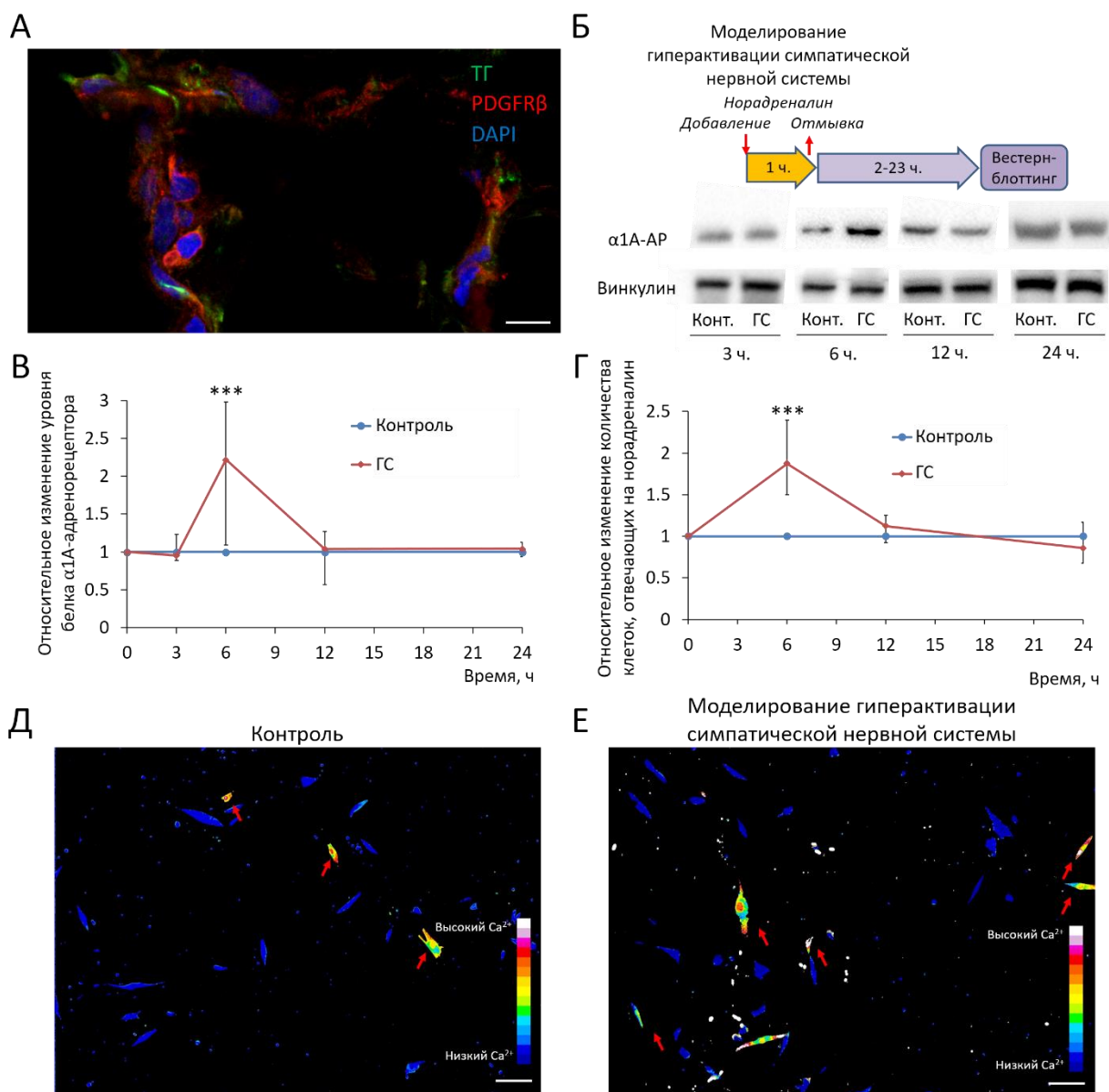


Рисунок 15. Норадреналин вызывает транзитное увеличение уровня α1A-адренорецептора в МСК. А. PDGFRβ⁺ МСК напрямую иннервированы симпатическими нервными волокнами (зеленый - ТГ). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. PDGFRβ (красный) – β-тип рецептора тромбоцитарного фактора роста, ТГ (зеленый) – тирозин-гидроксилаза. Масштабный отрезок 10 мкм. Б. Репрезентативные картинки результатов вестерн-блоттинга α1A-адренорецептора через 3, 6, 12 или 24 часа после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). В. Временная развертка относительного изменения уровня белка α1A-адренорецептора в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. Г. Временная развертка относительного изменения количества клеток, отвечающих кальциевой сигнализацией на норадреналин после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. Д-Е. Репрезентативные картинки кальциевых ответов при действии норадреналина на одиночные контрольные МСК и клетки после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. *** $p < 0,001$. Масштабный отрезок 100 мкм.

3.2. Активация $\beta 3$ -адренорецепторов приводила к сенситизации МСК за счет повышения уровня $\alpha 1A$ -адренорецептора

Повышение чувствительности клеток на гормон или нейромедиатор является нестандартным ответом клетки на действие этого же гормона или нейромедиатора. Обычно клетки десенситизируются при действии агонистов рецепторов. Так, например, β -адренорецепторы в кардиомиоцитах десенситизируются и даунрегулируются при длительном действии норадреналина [140].

Однако, исходя из результатов, полученных ранее в нашей лаборатории, а также из косвенных литературных данных, известно, что стимулом к повышению $\alpha 1A$ -адренорецепторов является активация β -адренорецепторов [177, 190]. Для выяснения вклада отдельных изоформ β -адренорецепторов в наблюдаемый феномен мы воспользовались специфическими ингибиторами. Мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы в присутствии селективных ингибиторов $\beta 1$ -, $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторов (CGP20712, ICI-118551, SR59230A соответственно). Мы показали, что повышение $\alpha 1A$ -адренорецепторов в модели гиперактивации симпатической нервной системы было связано с преимущественной активацией $\beta 3$ - и в меньшей степени $\beta 2$ -адренорецепторов (Рис. 16 Б). Небольшое влияние ингибитора ICI-118551 на наблюдаемый эффект можно объяснить его частичным связыванием с $\beta 3$ -адренорецепторами ($K_i = 257$ нМ, что всего в 5 раз выше рабочей концентрации, использованной нами для блокады $\beta 2$ -адренорецепторов).

Для того чтобы независимо подтвердить результаты ингибиторного анализа, мы нокаутировали $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторы в МСК при помощи CRISPR/Cas9 технологии. Нокаут проводили в линии immortalized МСК жировой ткани ASC52telo, так как данная культура, в отличие от первичных культур МСК человека, с которыми мы работали во всех остальных экспериментах, может подвергаться длительному пассированию. Это позволяет сделать необходимые для нокаута манипуляции и требуемое количество экспериментов. Доля клеток ASC52telo, отвечающих кальциевой сигнализацией на норадреналин, была в 5,7 раз ($p = 1,258 \cdot 10^{-5}$) ниже первичных культур МСК жировой ткани (Рис. 18, таблица 4). В то же время, immortalized МСК демонстрировали сходный с первичными клетками ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы, что нам позволило делать дальнейшие эксперименты (Рис. 16 В-Г).

Используя 2 лентивирусные конструкции и систему CRISPR/Cas9, мы по отдельности нокаутировали $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторы в линии ASC52telo (гены *ADRB2*, *ADRB3* соответственно). Нокаут осуществили путем внесения нонсенс-мутации за счет дезаминирования

цитозина. При дезаминировании цитозина образуется урацил, а в этом месте оказывается стоп-кодон, который прерывает транскрипцию гена. Эффективность нокаута подтвердили с помощью секвенирования участков ДНК, подвергшихся изменениям (Рис. 17 А), а также вестерн-блоттинга на $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторы (Рис. 17 Б). Нокаут $\beta 3$ -адренорецепторов (*ADRB3*) полностью предотвращал усиление чувствительности клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы, что подтвердило результаты ингибиторного анализа (Рис. 16 Г).

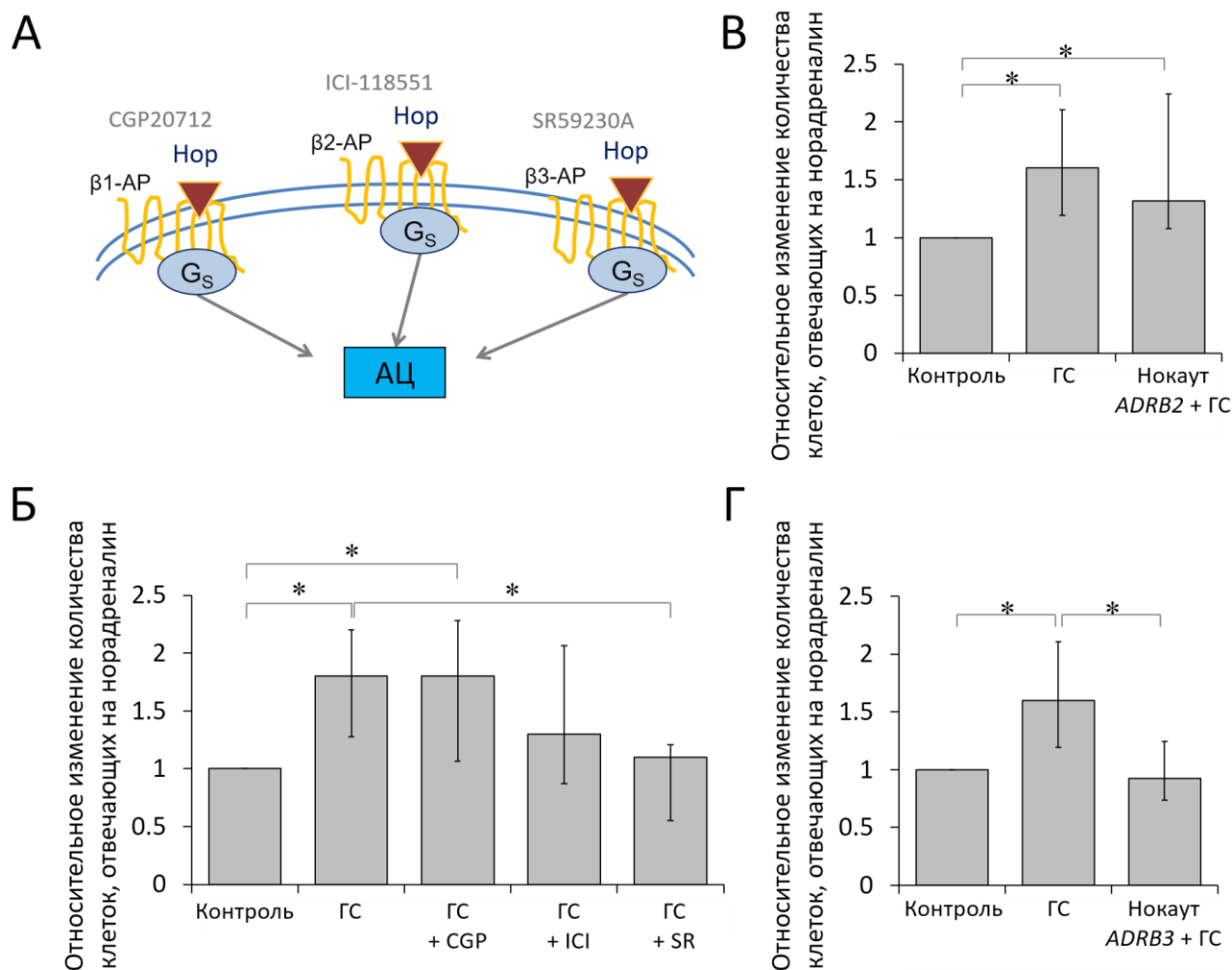


Рисунок 16. Определение изоформы β -адренорецепторов, ответственных за повышение чувствительности клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. А. Разные изоформы β -адренорецепторов, ассоциированы с активацией аденилатциклазы. Б. Ингибиторный анализ β -адренорецепторов при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. В-Г. Нокаут $\beta 3$ -, но не $\beta 2$ -адренорецепторов в ASC52telо приводит к полному исчезновению сенситизации клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). CGP (CGP20712, 100 нМ) - специфический ингибитор $\beta 1$ -адренорецепторов, ICI (ICI-118551, 50 нМ) - специфический ингибитор $\beta 2$ -адренорецепторов, SR (SR59230A, 250 нМ) - специфический ингибитор $\beta 3$ -адренорецепторов. * $p < 0,05$.

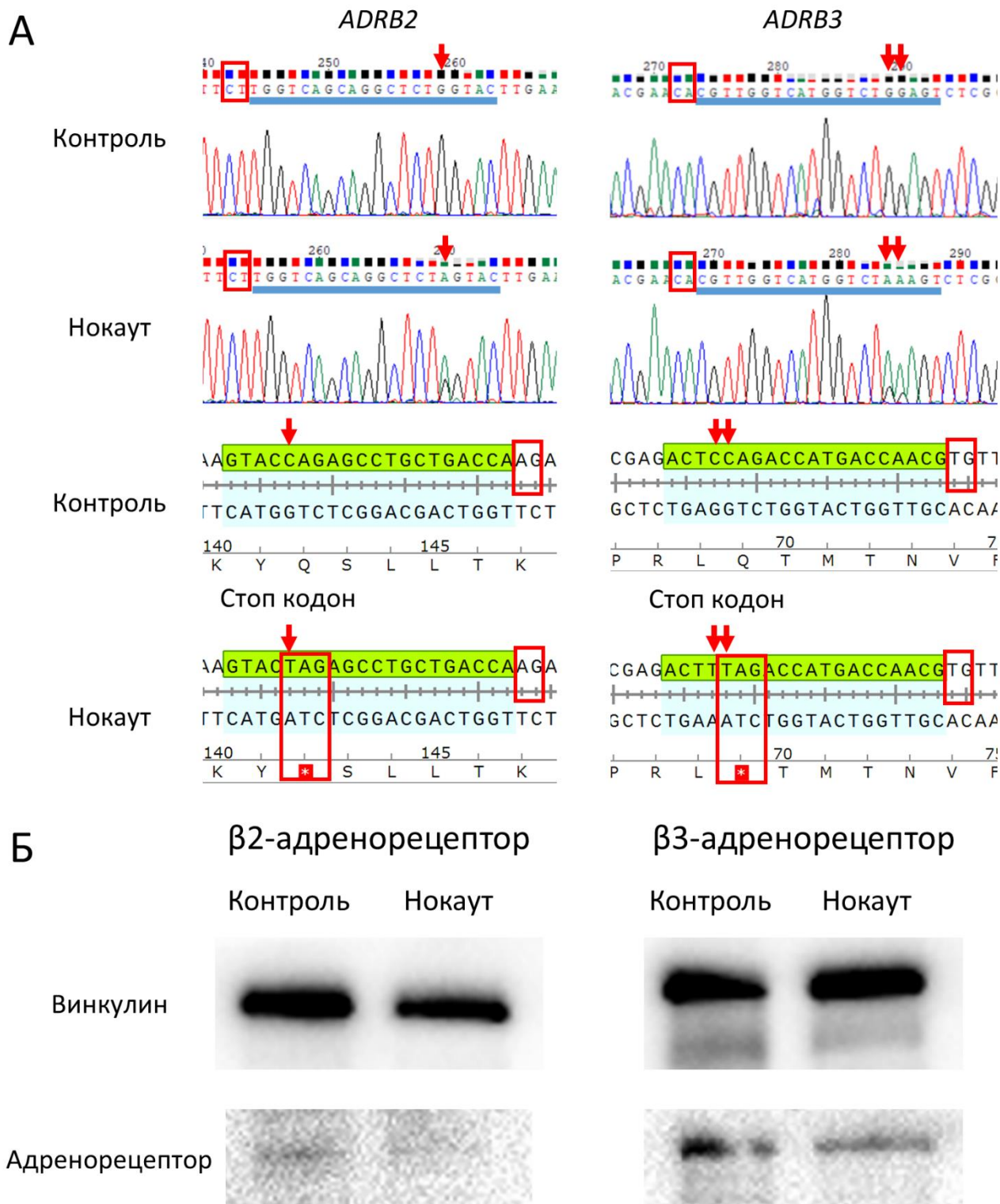


Рисунок 17. Проверка нокаута генов *ADRB2* и *ADRB3* в ASC52telo. А. Результаты секвенирования по Сэнгеру ДНК клеток, в которых был проведен нокаут. Б. Репрезентативные картинки вестерн-блоттинга β2- и β3-адренорецепторов в клетках линии ASC52telo, нокаутированных по генам *ADRB2* (β2-адренорецептор) или *ADRB3* (β3-адренорецептор).

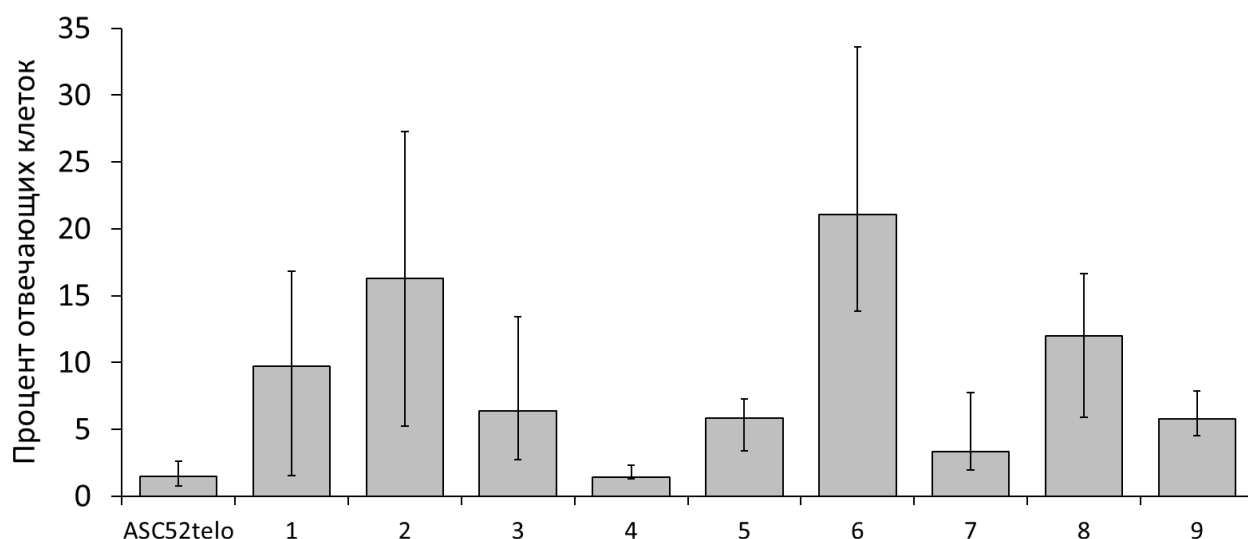


Рисунок 18. Линейные МСК (ASC52telo) имеют более низкую чувствительность к норадреналину по сравнению с большинством первичных МСК (1 - 9).

Таблица 4. Характеристики чувствительности первичных и линейных (ASC52telo) МСК

Номер донора МСК	Медиана % отвечающих клеток	Квартиль 25%	Квартиль 75%	Средний % отвечающих клеток	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка среднего
ASC52telo	1,50	0,76	2,63	1,79	1,27	0,33
1	9,73	1,55	16,84	10,48	9,64	3,41
2	16,30	5,26	27,27	18,68	15,06	5,69
3	6,38	2,72	13,46	8,62	7,50	2,08
4	1,43	1,31	2,33	1,71	0,89	0,25
5	5,84	3,37	7,31	5,44	2,15	0,96
6	21,06	13,83	33,64	26,36	18,46	6,53
7	3,35	1,98	7,76	4,68	3,95	1,40
8	12,00	5,88	16,67	12,25	7,80	1,79
9	5,81	4,53	7,88	6,17	3,32	1,18

Иммуногистохимический анализ распределения β 3-адренорецепторов в жировой ткани показал, что β 3-адренорецепторы (зеленый на Рис. 19) экспрессируются преимущественно на клетках кровеносных сосудов, в значительной степени на МСК (Рис. 19). В качестве маркера эндотелиальных клеток мы выбрали CD31 (молекулой адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов 1 типа, красный на Рис. 19), являющийся одним из наиболее стабильно экспрессирующихся маркеров в сосудах разных органов и тканей [145]. Для идентификации контрактильных гладкомышечных клеток мы использовали α -SMA (α -гладкомышечный актин, красный на Рис. 19), так как он является одним из наиболее специфических маркеров, связанных с функцией этих клеток [17]. МСК идентифицировали по наличию PDGFR β (β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста, красный на Рис. 19), как показано ранее этот маркер воспроизводимо

экспрессируется на 95-100% МСК разных доноров [81]. Колоколизацию маркеров определяли при близком расположении красного и желтого цветов в одной клетке.

Таким образом, можно предположить, что β_3 -адренорецептор, экспрессирующийся в сосудах жировой ткани, является ключевой мишенью для воздействия симпатической нервной системы, которое приводит к повышению чувствительности МСК к норадреналину.

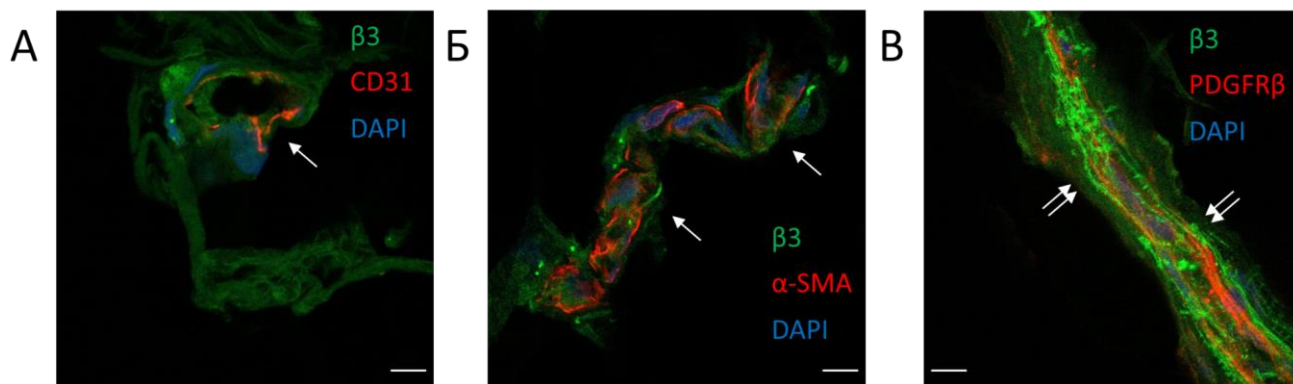


Рисунок 19. Распределение β_3 -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки человека. А. β_3 -адренорецепторы (зеленый) не экспрессируются $CD31^+$ эндотелиальными клетками (красный, одиночные стрелки) в сосудах жировой ткани. Б. β_3 -адренорецепторы (зеленый) не экспрессируются $\alpha\text{-SMA}^+$ гладкомышечными клетками (красный, одиночные стрелки). В. β_3 -адренорецепторы экспрессируются $PDGFR\beta^+$ мезенхимными стромальными клетками (красный, двойные стрелки) в сосудах жировой ткани. Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. $CD31$ – молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов тип 1, $\alpha\text{-SMA}$ – α -гладкомышечный актин, $PDGFR\beta$ – β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста. Масштабный отрезок 25 мкм.

3.3. Анализ сигнальных каскадов β_3 -адренорецепторов, ответственных за повышение уровня α_1A -адренорецепторов

Далее мы выяснили внутриклеточные сигнальные механизмы, приводящие к повышению чувствительности МСК к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. β -адренорецепторы классически активируют цАМФ-зависимый сигнальный каскад, запуская аденилатциклазу и синтез цАМФ с помощью G_s -белка. На Рис. 20 А показана схема β_3 -адренорецептор/цАМФ-зависимого сигнального каскада, вклад компонентов которого мы проверяли при помощи ингибиторного анализа. Используя специфический ингибитор аденилатциклазы – SQ22536 – мы показали, что для повышения чувствительности к норадреналину в модели гиперактивации симпатической нервной системы необходима активация аденилатциклазы (Рис. 20 Б). Аденилатциклаза повышает уровень цАМФ в клетках, что приводит к активации протеинкиназы А. Специфический ингибитор протеинкиназы А H89 полностью нивелировал эффект моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на чувствительность МСК к норадреналину (Рис. 20 В). Альтернативный сигнальный

путь, активируемый цАМФ, это EPAC. Используя специфический ингибитор EPAC ESI09, мы показали, что сенситизация клеток при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы не зависела от активации EPAC (Рис. 20 Г).

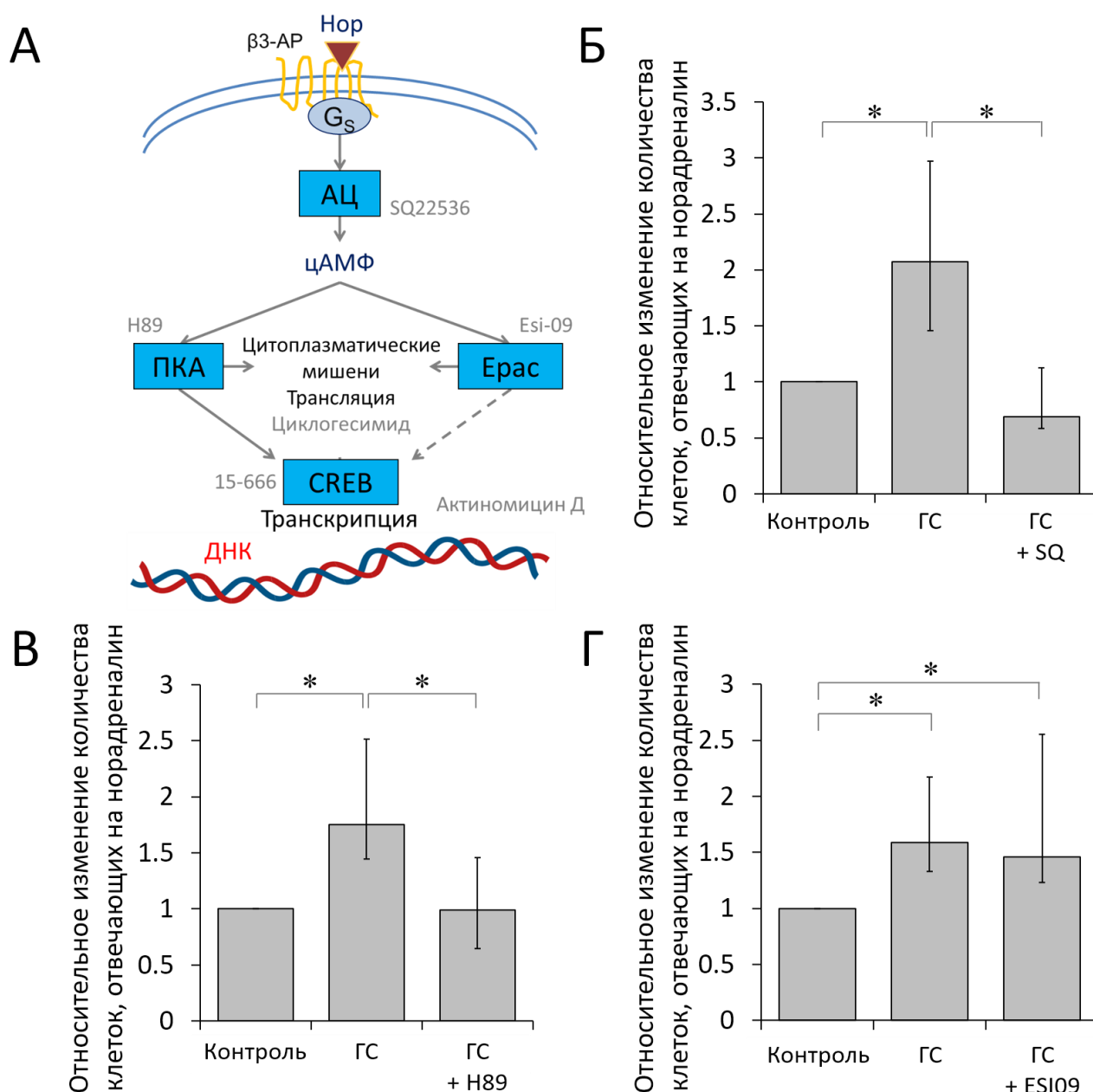


Рисунок 20. Сенситизация клеток к норадреналину опосредована активацией аденилатциклазы и протеинкиназы А. А. Схема сигнального каскада, запускаемого $\beta 3$ -адренорецептором. Б. Ингибирование аденилатциклазы (SQ - SQ22536, 1 мкМ) предотвращает сенситизацию клеток к норадреналину. В. Ингибирование протеинкиназы А (H89, 5 мкМ) предотвращает сенситизацию клеток к норадреналину. Г. Ингибирование EPAC (ESI09, 10 мкМ) не влияет на сенситизацию клеток к норадреналину. * $p < 0,05$.

На промоторной области гена $\alpha 1A$ -адренорецептора одними из наиболее часто встречающихся являются последовательности, регулируемые цАМФ (CRE-последовательности), связывающие CREB [151]. CREB – транскрипционный фактор, активирующийся при фосфорилировании протеинкиназой А. Однако каталитические субъединицы протеинкиназы А могут активировать CREB только при попадании в ядро. Используя иммунофлуоресцентный анализ, мы проанализировали локализацию протеинкиназы А при действии норадреналина. Мы показали, что при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы протеинкиназа А преимущественно не входила в ядро клетки (Рис. 21, А-Б). При этом уровень фосфорилирования CREB не изменялся после воздействия норадреналина. Ингибитор фосфорилирования CREB не влиял на сенситизацию МСК к норадреналину (Рис. 21, В-Д). Таким образом, протеинкиназа А в модели гиперактивации симпатической нервной системы регулировала уровень $\alpha 1A$ -адренорецептора, воздействуя на цитоплазматические мишени.

Мы дополнительно проанализировали вклад трансляции и транскрипции в норадреналин-зависимое повышение чувствительности к норадреналину. Для этого мы использовали неспецифические ингибиторы трансляции (циклогексимид) и транскрипции (актиномицин Д). Ингибирование трансляции, но не транскрипции, приводило к нивелированию норадреналин-зависимого повышения чувствительности клеток к норадреналину. Уровень мРНК $\alpha 1A$ -адренорецептора при длительном воздействии норадреналина также не изменялся. Из этих данных следует, что повышение чувствительности МСК к норадреналину в модели гиперактивации симпатической нервной системы опосредовано изменением трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -адренорецептора (Рис. 21, Е-Ж).

Таким образом, мы показали, что норадреналин повышал уровень $\alpha 1A$ -адренорецепторов путем активации сигнального каскада $\beta 3$ -адренорецептор/АЦ/цАМФ/ПКА и трансляции белка рецептора и не влиял на транскрипцию мРНК.

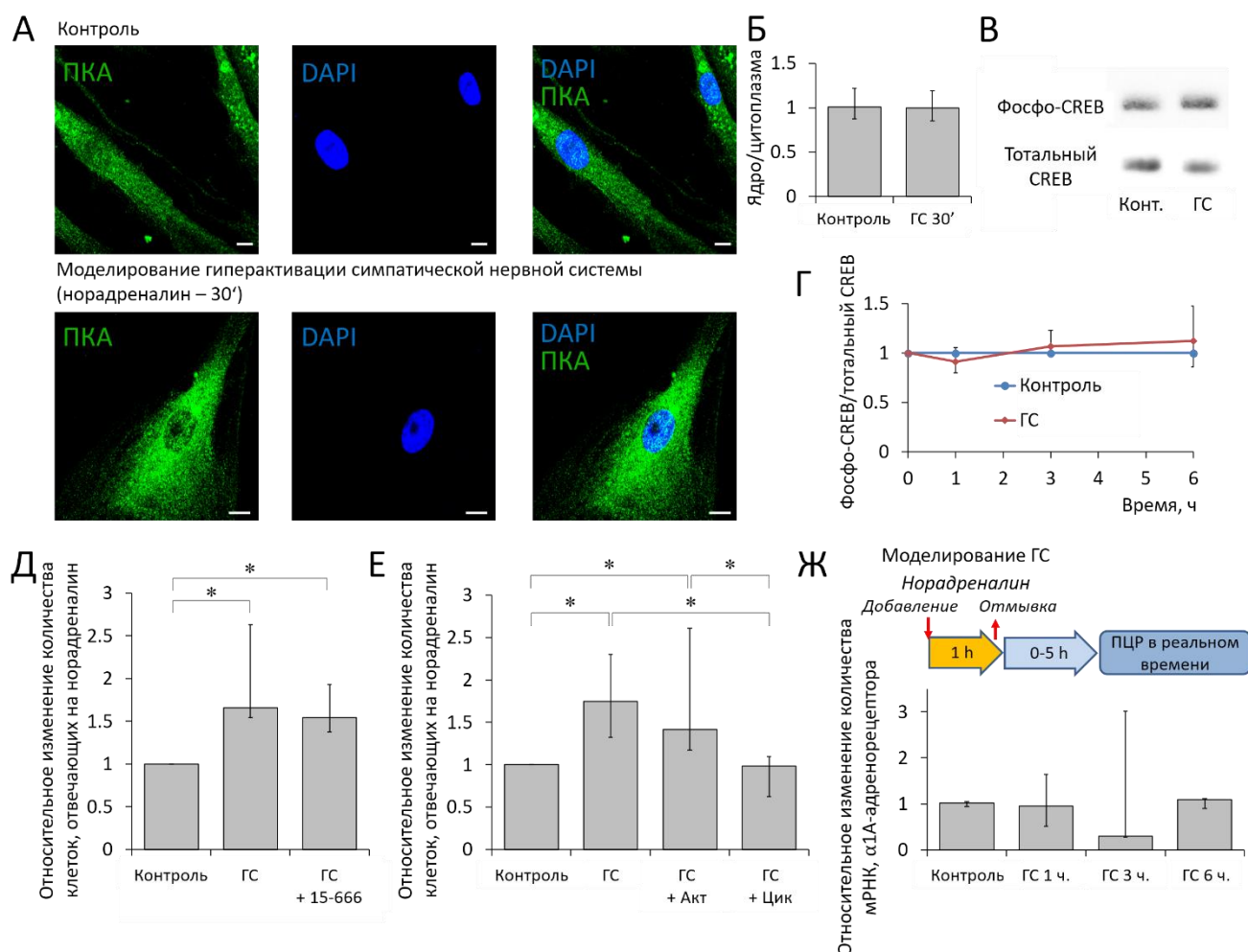


Рисунок 21. Сенситизация клеток к норадреналину опосредована изменением трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -адренорецептора. А. Репрезентативные картинки локализации протеинкиназы А (ПКА) в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. Б. Соотношение иммунофлуоресценции протеинкиназы А в ядре и цитоплазме. В. Репрезентативные картинки фосфо- и тотального CREB в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Г. Соотношение фосфо-CREB и тотального CREB в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Д. Ингибирование CREB (15-666, 2 мкМ) не влияло на сенситизацию клеток к норадреналину. Е. Ингибирование трансляции (Циклогексимид, 90 мкМ), но не транскрипции (Актиномицин Д, 4 мкМ) приводило к снижению сенситизации клеток к норадреналину. Ж. Моделирование гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ) не влияло на уровень мРНК $\alpha 1A$ -адренорецептора. * $p < 0,05$.

3.4. Анализ транскриптома одиночных клеток при воздействии норадреналина после индуцированной сенситизации МСК

Для того чтобы выяснить, каким образом повышение норадреналин-зависимой кальциевой сигнализации влияет на функциональную активность МСК, мы проанализировали транскриптом на уровне одиночных клеток. В качестве экспериментального образца использовали клетки, дважды стимулированные норадреналином: для моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и через 6 часов для стимуляции появившихся $\alpha 1A$ -адренорецепторов. В качестве контроля использовали клетки, претерпевшие все те же операции, но без норадреналина. Для того чтобы проанализировать изменения, которые произошли при обработке норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы сравнили экспериментальный и контрольный образцы, объединив их в один массив данных, используя интеграцию (Рис. 22 А-В). В объединенном массиве выделялись 6 субпопуляций (кластеров) клеток, различающихся по функциям (Рис. 22, Г, Табл. 5). В кластере 0 определялись клетки, в которых повышена экспрессия генов клеточного цикла (*TOP2A* (в 3,279 раз, $p < 10^{-308}$), *MKI67* (в 3,189 раз, $p < 10^{-308}$), *CENPF* (в 3,102 раз, $p < 10^{-308}$), *GTSE1* (в 2,97 раз, $p < 10^{-308}$) и *CDK1* (в 2,846 раз, $p = 5,57 \cdot 10^{-298}$)). Анализ, проведенный с помощью scVelo и Seurat, показал, что клетки 0 кластера находились в S и G2-M фазах клеточного цикла (Рис. 6 Д-Е). Таким образом, в 0 кластере находились пролиферирующие клетки. В кластере 4 определялись клетки с повышенной экспрессией генов внеклеточного матрикса (*COL16A1* (в 2,316 раз, $p = 3,05 \cdot 10^{-99}$), *LAMB2* (в 2,244 раз, $p = 1,41 \cdot 10^{-118}$), *COL6A1* (в 2,018 раз, $p = 6,91 \cdot 10^{-241}$), *COL6A2* (в 2,061 раз, $p = 3,74 \cdot 10^{-242}$), *FN1* (в 2,082 раз, $p = 3,87 \cdot 10^{-210}$), *FBLN2* (в 2,126 раз, $p = 1,17 \cdot 10^{-120}$), *COL1A1* (в 1,948 раз, $p = 8,03 \cdot 10^{-281}$), *COL1A2* (в 1,941 раз, $p = 1,02 \cdot 10^{-276}$)) и клеточной адгезии (*ITGB1* (в 2,846 раз, $p = 5,57 \cdot 10^{-298}$), *THBS1* (в 1,992 раз, $p = 3,08 \cdot 10^{-63}$), *THBS2* (в 2,039 раз, $p = 1,02 \cdot 10^{-148}$)). 5 кластер представлял собой клетки, выполняющие контрактильную функцию, в связи с экспрессией генов, связанных с контрактильностью: *ACTA2* (в 5,602 раз, $p = 2,97 \cdot 10^{-57}$), *ACTG2* (в 28,951 раз, $p = 6,91 \cdot 10^{-241}$), *MYOCD* (в 2,353 раз, $p = 2,96 \cdot 10^{-9}$), *MYL9* (в 2,049 раз, $p = 3,92 \cdot 10^{-49}$), *MYH11* (в 13,825 раз, $p = 1,86 \cdot 10^{-287}$), *MYLK* (в 6,172 раз, $p = 3,76 \cdot 10^{-64}$), *TAGLN* (в 2,066 раз, $p = 3,59 \cdot 10^{-36}$), *LMOD1* (в 4,646 раз, $p = 2,41 \cdot 10^{-55}$) и *CALD1* (в 2,381 раз, $p = 1,57 \cdot 10^{-47}$). Клетки кластера 1, вероятно, активнее других синтезировали белки, так как в них была повышена экспрессия генов трансляции (*RPL27A* (в 1,319 раз, $p = 2,03 \cdot 10^{-203}$), *RPL23* (в 1,246 раз, $p = 4,75 \cdot 10^{-154}$), *RPL31* (в 1,244 раз, $p = 3,18 \cdot 10^{-95}$), *RPS27L* (в 1,235 раз, $p = 9,94 \cdot 10^{-85}$)) и метаболизма аминокислот (*GLS* (в 1,285 раз, $p = 2,08 \cdot 10^{-44}$), *SAT1* (в 1,296 раз, $p = 1,25 \cdot 10^{-40}$)). Кластер 3 состоял из синтезирующих клеток с высоким уровнем аэробного метаболизма, так как в нем была повышена экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ (*COX7A1* (в 1,46 раз,

$p = 1,43 \cdot 10^{-166}$), *COX7A2* (в 1,282 раз, $p = 1,83 \cdot 10^{-126}$), *ATP5F1E* (в 1,329 раз, $p = 1,08 \cdot 10^{-232}$)), а также рибосомальные белки (*RPL41* (в 1,337 раз, $p < 10^{-308}$), *RPL28* (в 1,351 раз, $p = 4,82 \cdot 10^{-296}$), *RPS28* (в 1,34 раз, $p = 2,33 \cdot 10^{-307}$), *RPS12* (в 1,36 раз, $p < 10^{-308}$)). В кластере 2 располагались фенотипически не определяемые клетки, вероятно, эта субпопуляция являлась промежуточной между 1 и 3 кластерами. Таким образом, по данным анализа транскриптома одиночных клеток в популяции МСК выделялись ВКМ-синтезирующие, контрактильные, пролиферирующие и синтетические субпопуляции клеток.

Таблица 5. Основные гены, экспрессия которых повышена в кластерах интегрированного датасета.

Название гена	Значение p	Отн, ур-нь экспрессии (отн, других кластеров)	Доля клеток кластера, экспрес, ген	Доля клеток остальных кластеров, экспрес, ген	Кластер	Расшифровка гена
HIST1H4C	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,766	0,998	0,947	0	H4 Clustered Histone 3
HIST1H1B	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,724	0,542	0,134	0	H1,5 Linker Histone, Cluster Member
TOP2A	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,279	0,835	0,484	0	DNA topoisomerase II alpha
PBK	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,213	0,704	0,252	0	PDZ binding kinase
MKI67	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,189	0,784	0,365	0	marker of proliferation Ki-67
CEP55	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,167	0,748	0,302	0	centrosomal protein 55
CENPF	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,102	0,751	0,365	0	centromere protein F
NUSAP1	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	3,088	0,666	0,255	0	nucleolar and spindle associated protein 1
BIRC5	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,988	0,863	0,446	0	baculoviral IAP repeat containing 5
GTSE1	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,970	0,693	0,271	0	G2 and S-phase expressed 1
PRC1	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,969	0,851	0,422	0	protein regulator of cytokinesis 1
RRM2	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,968	0,874	0,478	0	ribonucleotide reductase regulatory subunit M2
CLSPN	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,964	0,915	0,447	0	claspin
UBE2C	$2,30 \cdot 10^{-275}$	2,951	0,747	0,397	0	ubiquitin conjugating enzyme E2 C
HMGB2	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,878	0,925	0,653	0	high mobility group box 2
TPX2	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,870	0,818	0,441	0	TPX2 microtubule nucleation factor
CDK1	$5,57 \cdot 10^{-298}$	2,846	0,648	0,256	0	cyclin dependent kinase 1
CENPU	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,786	0,693	0,248	0	centromere protein U
TACC3	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,758	0,676	0,266	0	transforming acidic coiled-coil containing protein 3
PCLAF	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,750	0,909	0,531	0	PCNA clamp associated factor
CENPK	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,744	0,790	0,350	0	centromere protein K
TYMS	$<1,00 \cdot 10^{-308}$	2,734	0,911	0,543	0	thymidylate synthetase
ASPM	$2,37 \cdot 10^{-285}$	2,721	0,663	0,271	0	assembly factor for spindle microtubules
CCNA2	$8,00 \cdot 10^{-308}$	2,710	0,656	0,246	0	cyclin A2

SHCBP1	$<1,00*10^{-308}$	2,709	0,803	0,350	0	SHC binding and spindle associated 1
HELLS	$<1,00*10^{-308}$	2,690	0,825	0,376	0	helicase, lymphoid specific
UBE2T	$<1,00*10^{-308}$	2,662	0,776	0,355	0	ubiquitin conjugating enzyme E2 T
MYBL2	$1,38*10^{-293}$	2,627	0,660	0,267	0	MYB proto-oncogene like 2
NCAPG	$<1,00*10^{-308}$	2,603	0,616	0,201	0	non-SMC condensin I complex subunit G
CENPE	$5,88*10^{-179}$	2,596	0,476	0,187	0	centromere protein E
DEK	$<1,00*10^{-308}$	2,590	0,996	0,910	0	DEK proto-oncogene
CCNB1	$3,72*10^{-166}$	2,587	0,537	0,251	0	cyclin B1
RAD51AP1	$<1,00*10^{-308}$	2,585	0,643	0,223	0	RAD51 associated protein 1
MCM7	$<1,00*10^{-308}$	2,580	0,836	0,418	0	minichromosome maintenance complex component 7
CKS2	$3,35*10^{-263}$	2,575	0,878	0,648	0	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
CDKN1A	$3,38*10^{-41}$	1,740	0,969	0,932	1	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2B	$1,37*10^{-19}$	1,664	0,366	0,276	1	cyclin dependent kinase inhibitor 2B
GLRX	$5,93*10^{-81}$	1,568	0,913	0,800	1	glutaredoxin
RSPO3	$9,13*10^{-11}$	1,504	0,225	0,167	1	R-spondin 3
CEBPD	$3,73*10^{-50}$	1,477	0,783	0,641	1	CCAAT enhancer binding protein delta
PNRC1	$1,11*10^{-70}$	1,442	0,727	0,506	1	proline rich nuclear receptor coactivator 1
MIR22HG	$1,78*10^{-64}$	1,426	0,825	0,669	1	MIR22 host gene
ANKRD37	$2,30*10^{-8}$	1,403	0,549	0,488	1	ankyrin repeat domain 37
MXD4	$2,10*10^{-64}$	1,403	0,798	0,610	1	MAX dimerization protein 4
NUPR1	$1,13*10^{-70}$	1,399	0,984	0,937	1	nuclear protein 1, transcriptional regulator
SCG5	0,113	1,395	0,445	0,427	1	secretogranin V
DEPTOR	$1,43*10^{-42}$	1,373	0,337	0,189	1	DEP domain containing MTOR interacting protein
CLIC3	$4,95*10^{-21}$	1,359	0,765	0,666	1	chloride intracellular channel 3
ZMAT3	$9,83*10^{-46}$	1,355	0,743	0,584	1	zinc finger matrin-type 3
FBXO32	$2,39*10^{-3}$	1,355	0,560	0,528	1	F-box protein 32
RARG	$1,74*10^{-41}$	1,348	0,446	0,281	1	retinoic acid receptor gamma
CHAC1	$4,67*10^{-21}$	1,346	0,413	0,310	1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
RNF41	$4,01*10^{-45}$	1,345	0,587	0,398	1	ring finger protein 41
MIR100HG	$1,55*10^{-59}$	1,341	0,966	0,918	1	mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene
FAM43A	$3,96*10^{-12}$	1,338	0,592	0,515	1	family with sequence similarity 43 member A
FTL	$1,78*10^{-139}$	1,335	1,000	1,000	1	ferritin light chain
SNHG18	$1,81*10^{-42}$	1,323	0,662	0,483	1	small nucleolar RNA host gene 18
PEG10	$8,14*10^{-11}$	1,320	0,761	0,809	1	paternally expressed 10
TRIB3	$5,09*10^{-17}$	1,320	0,379	0,285	1	tribbles pseudokinase 3
RPL27A	$2,03*10^{-203}$	1,319	1,000	1,000	1	ribosomal protein L27a
PAPPA	$2,30*10^{-5}$	1,313	0,724	0,666	1	pappalysin 1
FGF7	$9,61*10^{-37}$	1,311	0,950	0,925	1	fibroblast growth factor 7
FAM214B	$7,86*10^{-46}$	1,302	0,782	0,618	1	atos homolog B

BEX4	3,10*10 ⁻³⁴	1,301	0,345	0,207	1	brain expressed X-linked 4
SAT1	1,25*10 ⁻⁴⁰	1,296	0,954	0,901	1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
GABARAPL1	1,06*10 ⁻²⁵	1,295	0,626	0,482	1	GABA type A receptor associated protein like 1
GLS	2,08*10 ⁻⁴⁴	1,285	0,989	0,973	1	glutaminase
RPL23	4,75*10 ⁻¹⁵⁴	1,246	1,000	1,000	1	ribosomal protein L23
RPL31	3,18*10 ⁻⁹⁵	1,244	1,000	0,986	1	ribosomal protein L31
RPS27L	9,94*10 ⁻⁸⁵	1,235	1,000	1,000	1	ribosomal protein S27 like
FUCA1	6,13*10 ⁻¹⁹	2,843	0,321	0,262	2	alpha-L-fucosidase 1
CXCL8	9,07*10 ⁻⁹	2,619	0,237	0,200	2	C-X-C motif chemokine ligand 8
HLA-DRA	5,46*10 ⁻¹⁷	2,378	0,146	0,090	2	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
LRRC75A	1,83*10 ⁻²⁸⁶	2,223	0,901	0,524	2	leucine rich repeat containing 75A
CD74	1,64*10 ⁻¹⁸	2,220	0,136	0,078	2	CD74 molecule
LYZ	2,44*10 ⁻¹⁸	2,164	0,116	0,062	2	lysozyme
SPP1	7,62*10 ⁻⁶	2,100	0,216	0,190	2	secreted phosphoprotein 1
APOE	6,69*10 ⁻¹¹	2,055	0,174	0,128	2	apolipoprotein E
C1orf56	2,69*10 ⁻¹¹³	1,986	0,587	0,351	2	chromosome 1 open reading frame 56
C1QB	1,74*10 ⁻²⁶	1,984	0,094	0,037	2	complement C1q B chain
MMP9	6,08*10 ⁻¹²	1,904	0,078	0,042	2	matrix metalloproteinase 9
CTSS	3,49*10 ⁻⁶	1,903	0,123	0,094	2	cathepsin S
ACP5	2,66*10 ⁻¹⁰	1,873	0,094	0,057	2	acid phosphatase 5, tartrate resistant
FCER1G	9,52*10 ⁻¹¹	1,859	0,144	0,100	2	Fc epsilon receptor Ig
SOD2	2,18*10 ⁻¹³	1,828	0,535	0,559	2	superoxide dismutase 2
HLA-DRB1	1,09*10 ⁻¹⁶	1,827	0,075	0,034	2	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
S100A9	6,52*10 ⁻²³	1,812	0,109	0,051	2	S100 calcium binding protein A9
PHKG1	1,27*10 ⁻⁴⁸	1,801	0,368	0,239	2	phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1
LAPTM5	1,97*10 ⁻¹¹	1,738	0,083	0,046	2	lysosomal protein transmembrane 5
CCL3	3,36*10 ⁻⁸	1,705	0,121	0,085	2	C-C motif chemokine ligand 3
CCL2	1,50*10 ⁻⁵	1,694	0,336	0,325	2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL4	8,65*10 ⁻⁷	1,631	0,065	0,041	2	C-C motif chemokine ligand 4
C15orf48	5,60*10 ⁻⁷	1,615	0,107	0,076	2	chromosome 15 open reading frame 48
RNASE1	1,09*10 ⁻⁵	1,608	0,057	0,036	2	ribonuclease A family member 1, pancreatic
C1QA	3,22*10 ⁻¹⁴	1,593	0,060	0,026	2	complement C1q A chain
CD14	2,74*10 ⁻¹⁴	1,582	0,053	0,021	2	CD14 molecule
LENG9	1,15*10 ⁻²²	1,571	0,181	0,108	2	leukocyte receptor cluster member 9
TYROBP	4,50*10 ⁻¹⁰	1,508	0,062	0,033	2	transmembrane immune signaling adaptor TYROBP
CD84	7,19*10 ⁻¹⁶	1,500	0,054	0,020	2	CD84 molecule
PLA2G7	1,67*10 ⁻¹³	1,488	0,050	0,020	2	phospholipase A2 group VII
CD163	1,68*10 ⁻¹⁴	1,461	0,047	0,018	2	CD163 molecule
CDC42SE1	1,00*10 ⁻⁴¹	1,435	0,701	0,670	2	CDC42 small effector 1
C1QC	4,57*10 ⁻¹¹	1,427	0,042	0,017	2	complement C1q C chain

CCL4L2	2,33*10 ⁻⁶	1,427	0,049	0,029	2	C-C motif chemokine ligand 4 like 2
C5AR1	1,64*10 ⁻⁶	1,423	0,071	0,046	2	complement C5a receptor 1
LRRC75A	<1,00*10 ⁻³⁰⁸	2,784	0,981	0,553	3	leucine rich repeat containing 75A
C1orf56	<1,00*10 ⁻³⁰⁸	2,654	0,890	0,326	3	chromosome 1 open reading frame 56
CDC42SE1	1,45*10 ⁻¹⁶⁵	1,768	0,931	0,634	3	CDC42 small effector 1
PAQR7	8,34*10 ⁻¹⁰⁵	1,575	0,565	0,232	3	progesterin and adipoQ receptor family member 7
SNHG29	6,59*10 ⁻²⁷⁷	1,523	1,000	0,988	3	small nucleolar RNA host gene 29
CTNNB1	1,94*10 ⁻¹⁶¹	1,515	0,995	0,914	3	catenin beta 1
CCL3	1,05*10 ⁻⁹⁰	1,508	0,252	0,066	3	C-C motif chemokine ligand 3
PHKG1	1,82*10 ⁻¹⁰⁰	1,504	0,557	0,221	3	phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1
WSB2	7,72*10 ⁻¹³⁰	1,468	0,990	0,880	3	WD repeat and SOCS box containing 2
COX7A1	1,43*10 ⁻¹⁶⁶	1,460	0,998	0,960	3	cytochrome c oxidase subunit 7A1
MT1X	2,46*10 ⁻¹⁶³	1,454	1,000	0,959	3	metallothionein 1X
B4GALT1	1,12*10 ⁻¹³⁹	1,447	0,995	0,925	3	beta-1,4-galactosyltransferase 1
LINC01705	4,56*10 ⁻¹⁰⁷	1,437	0,533	0,203	3	long intergenic non-protein coding RNA 1705
MTA2	5,22*10 ⁻⁵⁹	1,413	0,579	0,308	3	metastasis associated 1 family member 2
FTH1	4,72*10 ⁻³⁰²	1,394	1,000	1,000	3	ferritin heavy chain 1
COPS9	5,58*10 ⁻¹⁶⁵	1,392	1,000	0,974	3	COP9 signalosome subunit 9
KCNMA1	1,09*10 ⁻¹⁰⁷	1,386	0,934	0,617	3	potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1
NPPB	3,97*10 ⁻¹⁰⁰	1,379	0,368	0,116	3	natriuretic peptide B
SERF2	2,09*10 ⁻²⁹⁵	1,372	1,000	1,000	3	small EDRK-rich factor 2
IL33	1,37*10 ⁻¹⁰³	1,371	0,958	0,674	3	interleukin 33
CTBP1	4,98*10 ⁻⁵⁷	1,367	0,893	0,667	3	C-terminal binding protein 1
MIF	1,68*10 ⁻²⁰⁹	1,363	1,000	0,999	3	macrophage migration inhibitory factor
RPS12	<1,00*10 ⁻³⁰⁸	1,360	1,000	1,000	3	ribosomal protein S12
HNRNPH1	7,16*10 ⁻⁸⁵	1,360	0,985	0,883	3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1
CXCL8	2,89*10 ⁻¹²¹	1,356	0,468	0,165	3	C-X-C motif chemokine ligand 8
PPP1R14B-AS1	1,99*10 ⁻⁵²	1,356	0,869	0,624	3	PPP1R14B antisense RNA 1
MT1E	7,43*10 ⁻¹⁶⁸	1,352	1,000	0,996	3	metallothionein 1E
RPL28	4,82*10 ⁻²⁹⁶	1,351	1,000	1,000	3	ribosomal protein L28
RPS21	2,44*10 ⁻²⁶⁵	1,351	1,000	1,000	3	ribosomal protein S21
AMFR	2,47*10 ⁻⁴⁷	1,348	0,746	0,493	3	autocrine motility factor receptor
SERPINB2	5,15*10 ⁻¹⁵⁶	1,346	0,690	0,258	3	serpin family B member 2
NDUFB1	5,54*10 ⁻¹⁰⁵	1,346	0,999	0,941	3	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B1
RPS28	2,33*10 ⁻³⁰⁷	1,340	1,000	1,000	3	ribosomal protein S28
CCL2	7,39*10 ⁻¹⁰³	1,340	0,624	0,277	3	C-C motif chemokine ligand 2
RASSF3	3,89*10 ⁻⁴⁷	1,337	0,518	0,281	3	Ras association domain family member 3

TIMP1	2,33*10 ⁻²³⁶	2,538	1,000	1,000	4	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
HSPA5	1,39*10 ⁻²²⁹	2,520	1,000	0,995	4	heat shock protein family A (Hsp70) member 5
NEAT1	2,03*10 ⁻²¹⁴	2,500	0,997	1,000	4	nuclear paraspeckle assembly transcript 1
HSP90B1	9,96*10 ⁻²⁸⁷	2,440	1,000	0,999	4	heat shock protein 90 beta family member 1
P4HA2	2,37*10 ⁻¹⁹⁴	2,422	0,980	0,941	4	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2
POSTN	8,31*10 ⁻⁴⁵	2,411	0,942	0,970	4	periostin
SFRP2	2,06*10 ⁻⁷	2,410	0,497	0,503	4	secreted frizzled related protein 2
TMEM59	3,78*10 ⁻¹⁶⁰	2,408	0,946	0,868	4	transmembrane protein 59
ERP44	2,83*10 ⁻⁸¹	2,408	0,724	0,562	4	endoplasmic reticulum protein 44
APLP2	9,56*10 ⁻²⁵³	2,396	1,000	0,996	4	amyloid beta precursor like protein 2
SLC3A2	2,64*10 ⁻¹¹⁷	2,380	0,920	0,824	4	solute carrier family 3 member 2
KCNQ1OT1	7,74*10 ⁻⁵⁶	2,373	0,664	0,532	4	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1
CD9	4,11*10 ⁻¹²⁵	2,358	0,946	0,917	4	CD9 molecule
LMAN1	6,26*10 ⁻²¹⁵	2,351	0,984	0,954	4	lectin, mannose binding 1
COL16A1	3,05*10 ⁻⁹⁹	2,316	0,855	0,758	4	collagen type XVI alpha 1 chain
LRPAP1	5,16*10 ⁻¹¹¹	2,304	0,868	0,764	4	LDL receptor related protein associated protein 1
TXNDC15	6,89*10 ⁻⁶⁵	2,285	0,714	0,594	4	thioredoxin domain containing 15
PIIB	6,98*10 ⁻²⁷⁸	2,281	1,000	0,999	4	peptidylprolyl isomerase B
EMC7	6,49*10 ⁻¹⁵⁹	2,281	0,967	0,910	4	ER membrane protein complex subunit 7
PTX3	7,35*10 ⁻⁹	2,277	0,797	0,851	4	pentraxin 3
DDOST	1,12*10 ⁻⁸⁹	2,261	0,804	0,672	4	dolichyl-diphosphooligosaccharid*10-protein glycosyltransferase non-catalytic subunit
DCN	4,18*10 ⁻¹⁶⁴	2,258	0,997	0,983	4	decorin
TGFBI	5,61*10 ⁻²²⁷	2,258	1,000	0,999	4	transforming growth factor beta induced
CTSL	1,66*10 ⁻¹⁶⁴	2,255	0,983	0,962	4	cathepsin L
LAMB2	1,41*10 ⁻¹¹⁸	2,244	0,881	0,773	4	laminin subunit beta 2
VCAN	9,27*10 ⁻²²⁵	2,225	1,000	0,993	4	versican
ECM1	2,74*10 ⁻⁴²	2,198	0,631	0,528	4	extracellular matrix protein 1
FBLN2	1,17*10 ⁻¹²⁰	2,126	0,969	0,946	4	fibulin 2
FN1	3,87*10 ⁻²¹⁰	2,082	1,000	1,000	4	fibronectin 1
COL6A2	3,74*10 ⁻²⁴²	2,061	1,000	1,000	4	collagen type VI alpha 2 chain
THBS2	1,02*10 ⁻¹⁴⁸	2,039	0,994	0,991	4	thrombospondin 2
COL6A1	6,91*10 ⁻²⁴¹	2,018	1,000	1,000	4	collagen type VI alpha 1 chain
THBS1	3,08*10 ⁻⁶³	1,992	0,997	0,996	4	thrombospondin 1
COL1A1	8,03*10 ⁻²⁸¹	1,948	1,000	1,000	4	collagen type I alpha 1 chain
COL1A2	1,02*10 ⁻²⁷⁶	1,941	1,000	1,000	4	collagen type I alpha 2 chain
PPP1R14A	6,54*10 ⁻¹⁰⁰	31,724	0,956	0,277	5	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 14A

ACTG2	1,25*10 ⁻²²⁸	28,951	0,664	0,039	5	actin gamma 2, smooth muscle
ADGRF5	4,30*10 ⁻²²⁹	28,693	0,965	0,097	5	adhesion G protein-coupled receptor F5
CD36	3,23*10 ⁻⁷⁰	20,754	0,965	0,538	5	CD36 molecule
FABP4	3,71*10 ⁻¹⁰³	19,038	0,664	0,093	5	fatty acid binding protein 4
NES	6,87*10 ⁻¹²⁶	16,030	0,956	0,193	5	nestin
ACAN	4,95*10 ⁻¹¹⁸	15,931	0,761	0,111	5	aggrecan
SYNPO2	3,70*10 ⁻⁸⁶	15,819	0,991	0,382	5	synaptopodin 2
MYH11	1,86*10 ⁻²⁸⁷	13,825	0,522	0,016	5	myosin heavy chain 11
RGS16	2,41*10 ⁻⁶⁴	10,845	0,655	0,145	5	regulator of G protein signaling 16
EDIL3	1,10*10 ⁻¹¹¹	10,505	0,956	0,212	5	EGF like repeats and discoidin domains 3
TINAGL1	7,33*10 ⁻⁷¹	10,397	0,982	0,542	5	tubulointerstitial nephritis antigen like 1
MCAM	5,03*10 ⁻⁸⁷	10,381	0,956	0,289	5	melanoma cell adhesion molecule
C11orf96	1,98*10 ⁻⁶⁰	9,150	0,912	0,416	5	chromosome 11 open reading frame 96
ITGA1	1,27*10 ⁻⁷³	8,243	0,982	0,466	5	integrin subunit alpha 1
GLDN	3,25*10 ⁻¹³³	8,147	0,354	0,018	5	gliomedin
WFDC1	9,21*10 ⁻²⁵³	7,565	0,602	0,026	5	WAP four-disulfide core domain 1
COL18A1	1,44*10 ⁻⁶⁹	7,375	0,903	0,318	5	collagen type XVIII alpha 1 chain
IGFBP2	1,45*10 ⁻²⁰⁵	7,233	0,469	0,019	5	insulin like growth factor binding protein 2
PLN	8,34*10 ⁻²⁶⁷	6,619	0,487	0,015	5	phospholamban
PDGFA	4,71*10 ⁻⁶⁸	6,340	0,805	0,233	5	platelet derived growth factor subunit A
GMFG	6,49*10 ⁻¹⁹⁷	6,323	0,513	0,025	5	glia maturation factor gamma
INPP4B	4,00*10 ⁻⁸⁶	6,205	0,558	0,076	5	inositol polyphosphat*104-phosphatase type II B
MYLK	3,76*10 ⁻⁶⁴	6,172	1,000	0,842	5	myosin light chain kinase
A2M	2,39*10 ⁻⁶⁹	6,169	0,796	0,210	5	alpha-2-macroglobulin
CREB5	2,67*10 ⁻¹⁵³	6,136	0,504	0,032	5	cAMP responsive element binding protein 5
AOC3	2,93*10 ⁻²⁹⁴	6,132	0,496	0,014	5	amine oxidase copper containing 3
JAG1	8,79*10 ⁻⁵⁹	5,784	0,850	0,295	5	jagged canonical Notch ligand 1
GJA5	1,16*10 ⁻²³⁹	5,679	0,531	0,021	5	gap junction protein alpha 5
ACTA2	2,97*10 ⁻⁵⁷	5,602	0,991	0,941	5	actin alpha 2, smooth muscle
LMOD1	2,41*10 ⁻⁵⁵	4,646	0,690	0,174	5	leiomodoin 1
CALD1	1,57*10 ⁻⁴⁷	2,381	1,000	1,000	5	caldesmon 1
MYOCD	2,96*10 ⁻⁹	2,353	0,354	0,166	5	myocardin
TAGLN	3,59*10 ⁻³⁶	2,066	1,000	1,000	5	transgelin
MYL9	3,92*10 ⁻⁴⁹	2,049	1,000	0,999	5	myosin light chain 9

Во всех субпопуляциях интегрированного массива данных обнаруживались клетки как контрольного, так и экспериментального образцов, однако представленность клеток каждого образца в кластерах различна. Так, кластеры котрактивных (кластер 5), ВКМ-синтезирующих (кластер 4) и синтетических (кластер 1) клеток на 80%, 63% и 72%, соответственно, состояли из

клеток экспериментального образца. При этом кластеры 2 и 3 были представлены, в основном, клетками контрольного образца (на 60% и 96%, соответственно) (Рис. 22 Г). Таким образом, при действии норадреналина после гиперактивации симпатической нервной системы происходило повышение количества контрактильных, ВКМ-синтезирующих и синтетических клеток кластера 1 и уменьшение количества клеток кластера 3. Для того чтобы определить, откуда появляются новые клетки в кластерах 0, 1, 4, 5 при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы воспользовались методом построения траекторий развития. Мы показали, что при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы клетки из кластера 3, состоящего в основном из клеток контроля, переходили в синтетическую субпопуляцию 1 (Рис. 22, Ж). В кластере 1 находилась точка разветвления, из которой клетки направлялись в одно из нескольких состояний: деление (кластер 0), ВКМ-синтезирующий фенотип (кластер 4) и фенотип гладкомышечных клеток (кластер 5). Корректность построения траектории развития подтверждалась рассчитанным латентным временем (Рис. 22, З). Этот показатель предсказывает, находятся ли клетки в динамическом состоянии изменения фенотипа или же терминально дифференцировались и не изменяются. Наиболее высокие показатели латентного времени определялись в кластерах контрактильных, ВКМ-синтезирующих и делящихся клеток. Кроме того, латентное время было несколько повышено в промежуточном 1 кластере.

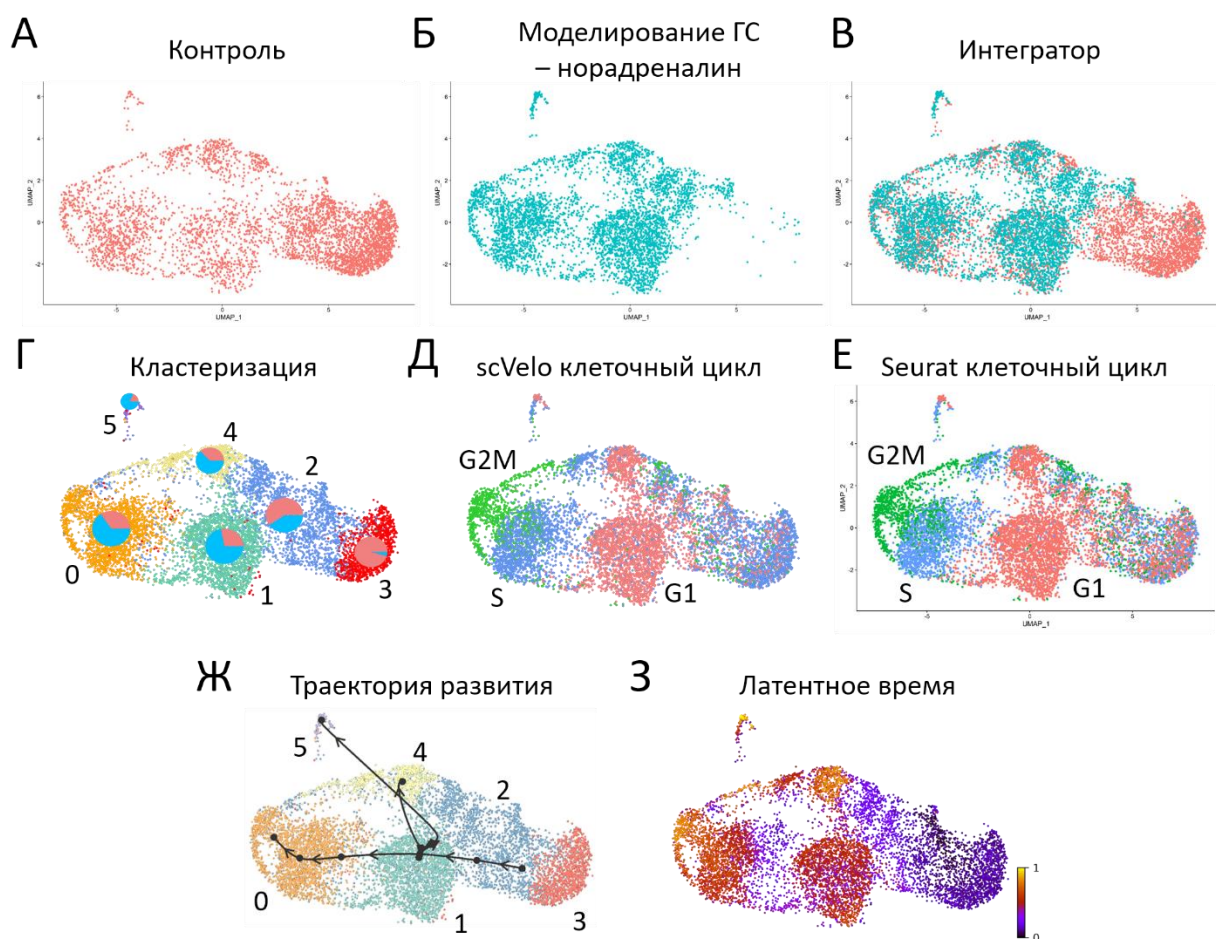


Рисунок 22. Анализ транскриптома одиночных клеток, стимулируемых норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. Каждая точка обозначает индивидуальную клетку. А. Контрольные клетки, не стимулированные норадреналином. Б. Клетки, стимулированные норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. В. Интегратор обоих массивов данных, где похожие клетки размещены рядом. Г. Кластеризация интегратора. Д-Е. Оценка клеточного цикла с использованием scVelo (Д) и Seurat (Е). Ж. Траектории развития на интеграторе, которые показывают движение клеток из кластеров 2 и 3 в кластеры 0, 4, 5. 3. Латентное время, предсказывающее реальные терминальные состояния при дифференцировке клеток.

Для того чтобы выяснить, какие именно сократительные клетки формировались при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы провели интеграцию наших образцов с массивом клеток стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани, предварительно отсортированных по CD45 (массив данных SRR12423012 из статьи “Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity” находится в свободном доступе) [66]. Предварительная сортировка стромально-васкулярной фракции позволила избавиться от большей части иммунных клеток, располагающихся в жировой ткани. По результатам этого интегрирования мы показали, что сократительные клетки наших образцов полностью интегрировались с гладкомышечными клетками из стромально-васкулярной фракции (Рис. 23 А-Б). Таким образом, согласно

транскриптомным данным, действие норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы приводило к переходу МСК в ГМК-подобный фенотип.

Биоинформатические алгоритмы позволяют не только определять уровень мРНК в одиночных клетках, но и оценивать активность транскрипционных факторов (SCENIC), которая определяется по паттерну активируемых генов-мишеней изучаемых транскрипционных факторов. Так, используя SCENIC, мы оценили активность транскрипционных факторов, связанных с контрактильностью, в МСК в опытном образце по сравнению с контрольным. Мы показали, что в экспериментальной группе клеток происходило повышение активности ключевых мастер-регуляторов контрактильного фенотипа и мастер-генов миоцитарной дифференцировки MEF2A (в 2,16 раз, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$), TEAD1 (в 1,78 раз, $p = 1,052 \cdot 10^{-6}$) и NFATC3 (в 1,51 раз, $p = 0,005$) (Рис. 23 В). Активация данных транскрипционных факторов ассоциирована с переходом клеток в ГМК-подобный фенотип [107].

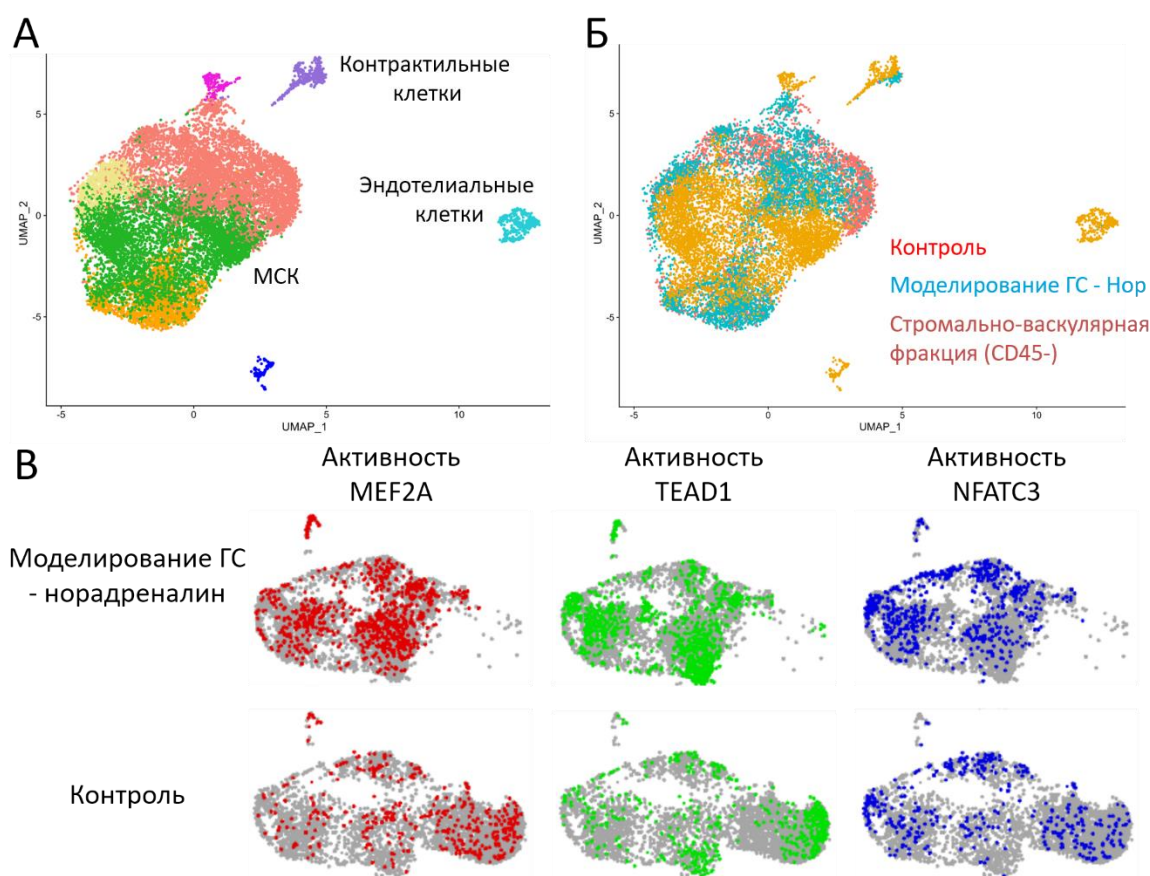


Рисунок 23. При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы МСК переходят в ГМК-подобный фенотип. А-Б. Сократительные клетки кластера 4 по транскриптому похожи на гладкомышечные клетки (А), определяемые в стромально-васкулярной фракции (Б). В. Оценка активности транскрипционных факторов, связанных с контрактильной функцией в МСК после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и действия норадреналина. Каждая точка обозначает индивидуальную клетку. ГС – гиперактивация симпатической нервной системы.

Для того чтобы попытаться предсказать, в каком направлении может изменяться популяция клеток, мы оценили транскрипционную динамику РНК (методы Velocyto и scVelo). Эти методы оценивают количество незрелых несплайсированных мРНК относительно зрелых, благодаря чему рассчитывает, какие гены активны в настоящее время, а какие - в прошлом синтезировали свою мРНК, но в настоящее время малоактивны. Используя данный метод, мы показали, что во всей популяции МСК появилась тенденция к повышению экспрессии генов, связанных с контракцией (Рис. 24). Так, уровень несплайсированных мРНК генов, ассоциированных с контрактильностью, *ACTA2*, *CNN1*, *MYLK*, *MYL9*, *MYOCD*, *TAGLN*, повышался не только в кластере 5, но и во всех остальных субпопуляциях МСК. Кроме того, во всей популяции МСК повышался уровень несплайсированных *LTBP1*, который регулирует действие TGF β на клетки. Повышение уровня TGF β ассоциировано с развитием неконтролируемой артериальной гипертензии [137].

Таким образом, из данных анализа транскриптома одиночных клеток следует, что при действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы часть популяции МСК приобретала контрактильный фенотип. При этом во всей популяции МСК происходила активация транскрипционных факторов, связанных с контрактильностью, и появлялась тенденция к повышению экспрессии мРНК генов, связанных с контракцией.

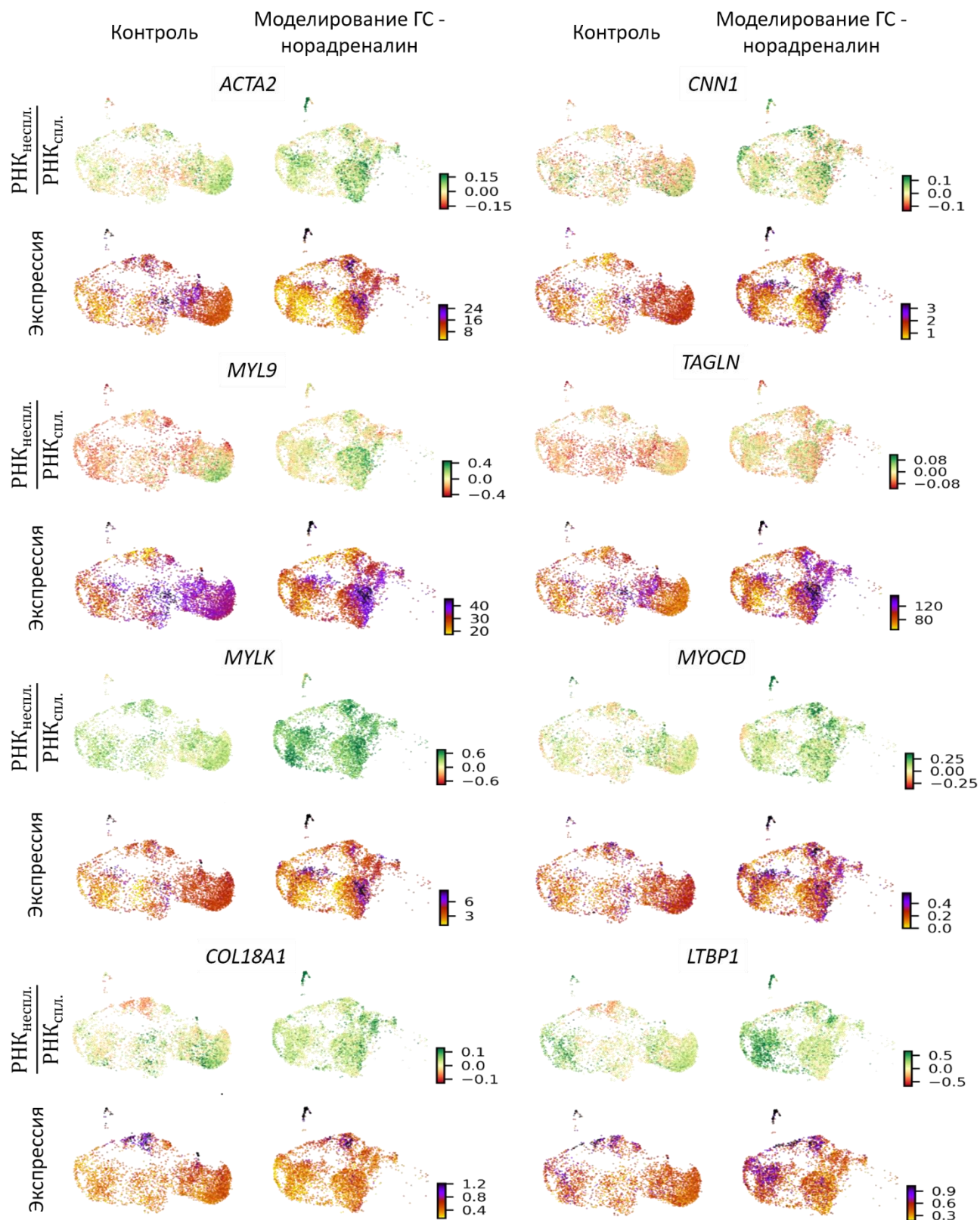


Рисунок 24. Определение уровня несплайсированных мРНК в МСК при действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. Каждая точка обозначает индивидуальную клетку. Зеленым обозначены клетки с высоким уровнем несплайсированной мРНК, красным с низким. Фиолетовым обозначены клетки с высоким уровнем экспрессии гена, желтым с низким.

3.5. Действие норадреналина на сенситизированные МСК приводило к усилению сокращения МСК-коллагеновых дисков

Для того чтобы проверить, переходят ли изменения транскрипции генов, обнаруженные нами, в изменения функций клеток, мы провели функциональные тесты. С помощью модели сокращения МСК-коллагеновых дисков мы проанализировали, как изменяются сократительные свойства МСК после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, а также после воздействия норадреналина на клетки, сенситизированные в модели гиперактивации симпатической нервной системы. Для этого мы полимеризовали коллаген в диски совместно с помещенными внутрь матрикса МСК, после чего обрабатывали клетки в соответствии с описанной выше моделью гиперактивации симпатической нервной системы. Само по себе моделирование гиперактивации симпатической нервной системы или норадреналина непосредственно перед запуском эксперимента не приводило к значимому усилению сокращения коллагеновых дисков. При действии же норадреналина через 6 часов после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходило усиление сокращения МСК-коллагеновых дисков на 49,23% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рис. 25).

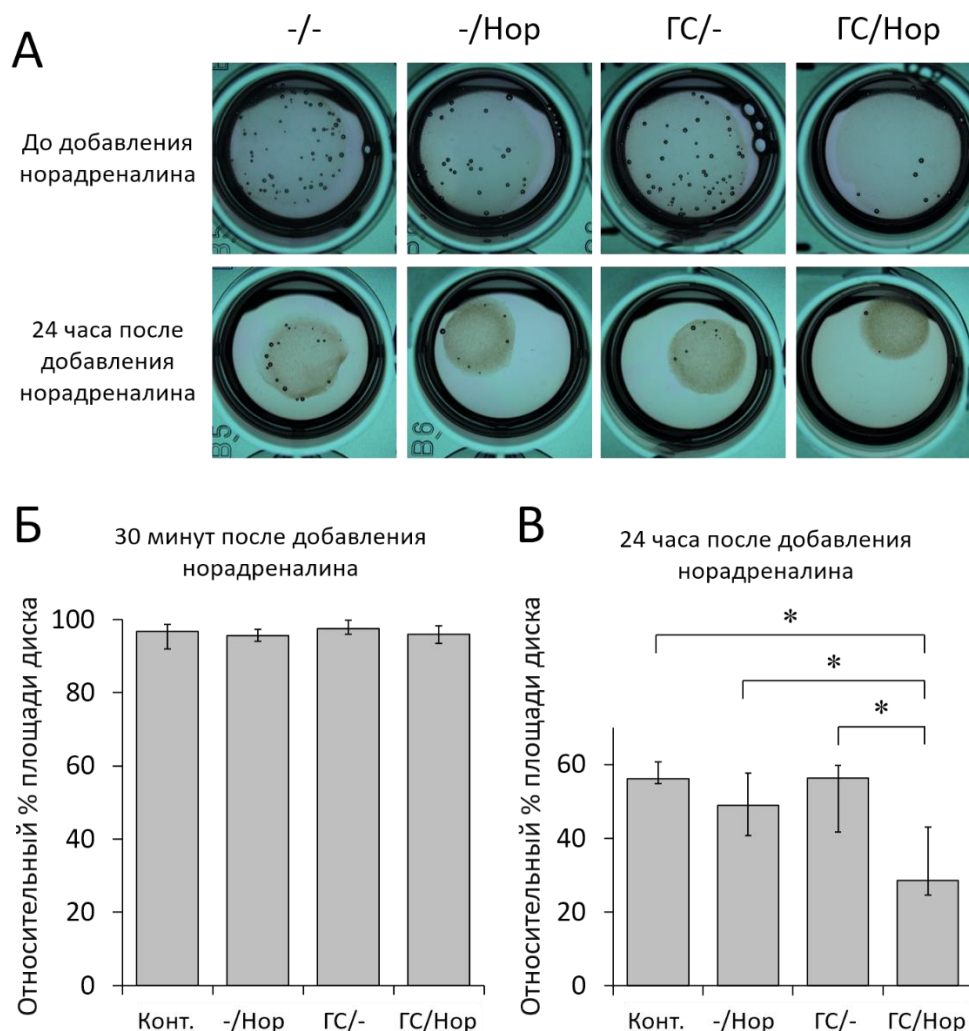


Рисунок 25. При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы усиливалась контрактильность МСК-коллагеновых дисков. А. Репрезентативные картинки дисков до и через 24 часа после добавления норадреналина (Нор - норадреналин, 1 мкМ) и моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Б. Относительный процент площади диска через 30 минут после добавления норадреналина. В. Относительный процент площади диска через 24 часа после добавления норадреналина. * $p < 0,05$.

3.6. Анализ распределения $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани

Для того чтобы выяснить, имеет ли место *in vivo* описанный нами феномен приобретения контрактильного фенотипа МСК, мы обратились к ключевому сократимому компоненту жировой ткани - сосудам. Одними из основных регуляторов контрактильности сосудов в организме человека являются $\alpha 1$ -адренорецепторы. Используя иммуногистохимический метод, мы проанализировали распределение всех изоформ $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой ткани здоровых доноров. Мы показали, что среди $\alpha 1$ -адренорецепторов в жировой ткани в целом и в сосудах в особенности преобладающей изоформой являются $\alpha 1A$ адренорецепторы. $\alpha 1B$ - и $\alpha 1D$ -адренорецепторы представлены в жировой ткани значительно

реже (Рис. 26 А-В). По умолчанию в настоящее время считается, что регуляторы контрактильности сосудов располагаются на ГМК. Тем не менее, согласно полученным нами данным, у здоровых доноров $\alpha 1A$ -адренорецептор локализовался на PDGFR β -экспрессирующих перичитах сосудов (в культуре они входят в популяцию МСК) (Рис. 26 А, Г-Д).

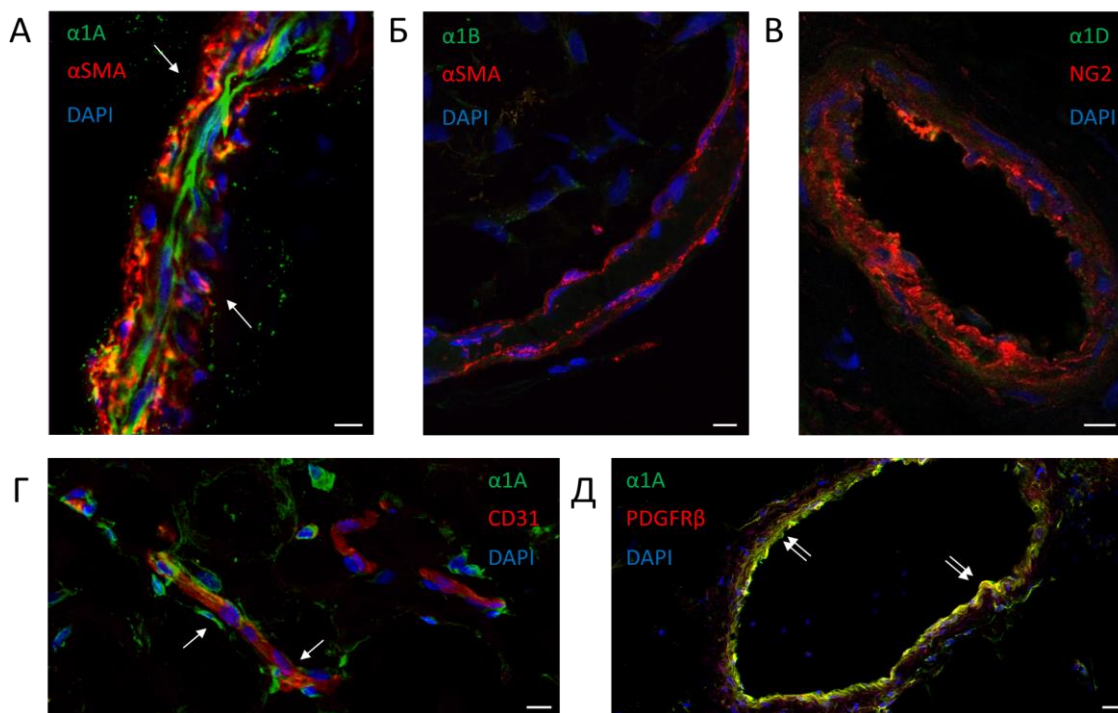


Рисунок 26. Распределение $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки здоровых доноров. А-В. Основными $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки здоровых доноров являлись $\alpha 1A$ -адренорецепторы. А. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани здоровых доноров не экспрессируются α -SMA⁺ гладкомышечными клетками (одиночные стрелки). Г. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани здоровых доноров не экспрессируются CD31⁺ эндотелиальными клетками (одиночные стрелки). Д. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) экспрессируются PDGFR β ⁺ мезенхимными стромальными клетками (двойные стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. $\alpha 1A$ -, $\alpha 1B$ -, $\alpha 1D$ -адренорецепторы (зеленый), CD31 (красный) – молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов тип 1, α -SMA (красный) – α -гладкомышечный актин, PDGFR β (красный) – β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста. Масштабный отрезок 10 мкм.

3.7. МСК пациентов с ожирением, не страдающих артериальной гипертензией, не способны к норадреналин-зависимой сенситизации

Одним из наиболее распространенных заболеваний, ассоциированных с гиперактивацией симпатической нервной системы, является ожирение [49]. Гиперактивация симпатической нервной системы развивается в 95-100% случаев ожирения. При этом, связанное с этим усиление контрактильности сосудов и, следовательно, стабильное повышение артериального давления (АД) наблюдается далеко не у всех пациентов с ожирением и показанной гиперактивацией симпатической нервной системы [87]. Мы предположили, что обнаруженный нами механизм сенситизации МСК к норадреналину является звеном, соединяющим гиперактивацию

симпатической нервной системы и развитие артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Для того чтобы проанализировать наличие связи между способностью МСК к изменению чувствительности к норадреналину в результате моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и уровнем АД, мы набрали 2 группы пациентов, страдающих ожирением. В первую группу мы отобрали 5 пациентов с ожирением и без артериальной гипертензии. Во вторую группу - 5 пациентов с ожирением и установленной артериальной гипертензией. Другими заболеваниями, в том числе аллергическими, данные пациенты не страдали. Основные биохимические показатели (АСТ, АЛТ, уровень гемоглобина, глюкозы, билирубина, креатинина) у данных пациентов были в пределах референсных значений. Основные показатели пациентов представлены в таблице 6. Ожирение определяли по рекомендациям российской ассоциации эндокринологов и общества бариатрических хирургов, как ИМТ > 30 кг/м² [4]. ИМТ – индекс массы тела, равный массе (в килограммах), деленной на квадрат значения роста (в метрах). Артериальную гипертензию определяли по рекомендациям российского кардиологического общества, европейского общества кардиологии и европейского общества гипертензии, как систолическое АД > 140 мм рт.ст. и/или диастолическое АД > 90 мм рт.ст. в покое [5, 206]. Мы выделили МСК из подкожной жировой ткани 5 пациентов из первой группы и 5 пациентов из второй группы и проанализировали их способность к сенситизации в модели гиперактивации симпатической нервной системы. Как показано на Рис. 27 А, клетки пациентов с ожирением и артериальной гипертензией обладали выраженной способностью сенситизироваться к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (в 1.88 раз [1,50, 1,93]). При этом у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии клетки не сенситизировались (в 1.043 раза [0,96, 1,18]). Таким образом, только МСК пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, способны повышать чувствительность к норадреналину после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (в 1,81 раза, $p = 0,008$).

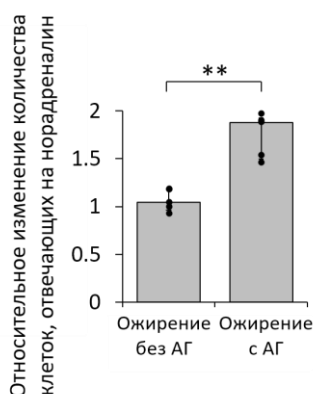


Рисунок 27. Степень сенситизации МСК к норадреналину у пациентов с ожирением с/без артериальной гипертензией. ** $p < 0,01$.

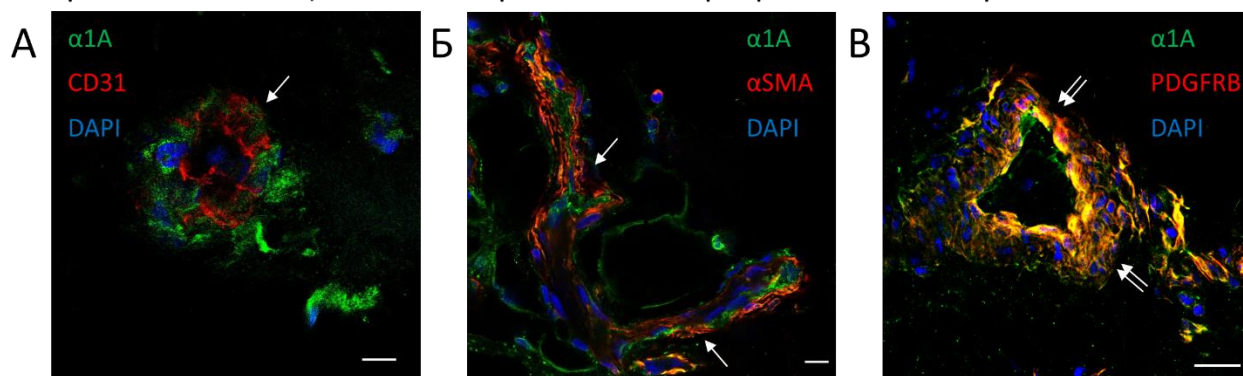
Таблица 6. Основные показатели пациентов, отобранных для исследования связи между уровнем артериального давления и ИМТ у пациентов с ожирением.

Пациент	Возраст, лет	ИМТ, кг/м ²	Пол	САД, мм рт.ст.	ДАД, мм рт.ст.	Артериальная гипертензия	Наличие постоянной терапии артериальной гипертензии и других заболеваний	Другие хронические заболевания	Относительное увеличение числа клеток, отвечающих на норадреналин
1	50	32.96	М	130	80	-	-	-	1.04
2	45	34.26	М	120	70	-	-	-	1.18
3	38	30.19	М	130	70	-	-	-	0.92
4	39	33	М	110	60	-	-	-	1.17
5	28	33	М	125	70	-	-	-	1
6	38	30	М	145	70	+	престариум 5 мг/сут	-	1.53
7	56	31.56	М	150	70	+	бисопролол 5 мг/сут, амлодипин 5 мг/сут, эналаприл 40 мг/сут	ХСН с низкой ФВ	1.89
8	62	32.95	М	140	90	+	торасемид 5 мг/сут, спиронолактон 100 мг/сут, кандесартан 16 мг/сут, бисопролол 5 мг/сут	ХСН с низкой ФВ	1.88
9	38	38.51	М	160	90	+	-	-	1.96
10	47	35.32	Ж	140	90	+	-	-	1.46

3.8. Анализ распределения $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих и не страдающих артериальной гипертензией

При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на МСК происходил переход клеток в ГМК-подобный фенотип. А основными $\alpha 1$ -адренорецепторами сосудов жировой ткани человека являются $\alpha 1A$ -адренорецепторы. Мы проанализировали распределение $\alpha 1A$ -адренорецепторов у пациентов с ожирением и артериальной гипертензией, клетки которых сенситизировались к норадреналину, и пациентов с ожирением без артериальной гипертензии, которые не сенситизировались к норадреналину. Используя иммуногистохимическую окраску, мы показали, что у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессировались также только на PDGFR β +МСК (Рис. 28 А-В, Ж). Однако у пациентов с ожирением и повышенным артериальным давлением $\alpha 1A$ -адренорецепторы обнаруживались не только на МСК, но и на 35% α -SMA+клеток ($p = 0,001$) (Рис. 28 Г-Ж). И, в целом, в сосудах пациентов с ожирением и артериальной гипертензией экспрессия $\alpha 1A$ -адренорецепторов была повышена на 24,74% ($p = 0,009$) по сравнению с пациентами, страдающими ожирением без артериальной гипертензии (Рис. 28 З). Вероятно, гиперактивация симпатической нервной системы при ожирении *in vivo* приводит к усилению чувствительности МСК к норадреналину и ассоциированному с этим переходу клеток в ГМК-подобный фенотип.

Жировая ткань пациента с ожирением без артериальной гипертензии



Жировая ткань пациента с ожирением и артериальной гипертензией

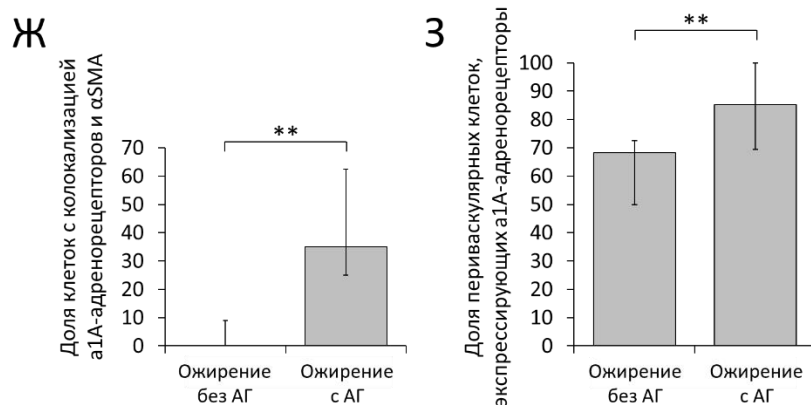
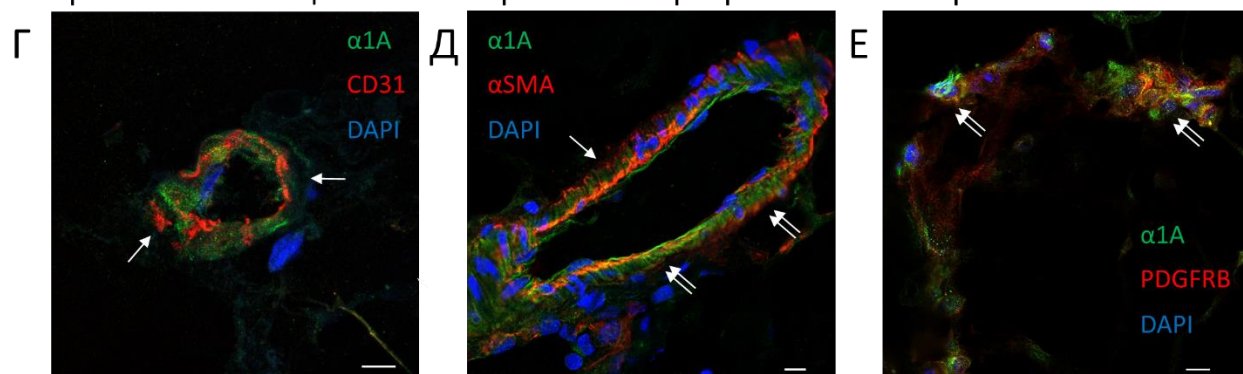


Рисунок 28. Распределение $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатке пациентов с ожирением, страдающих или не страдающих артериальной гипертензией. А-В. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии экспрессируются мезенхимными стромальными клетками (красный - PDGFR β). Г-Е. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии экспрессируются мезенхимными стромальными (красный - PDGFR β) и α -SMA⁺ клетками (красный - α -SMA). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. CD31 (красный) – молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов тип 1, α -SMA (красный) – α -гладкомышечный актин, PDGFR β (красный) – β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста, ТГ – тирозин-гидроксилаза. Масштабный отрезок 10 мкм. Ж-З. Количественная оценка экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в периваскулярных клетках сосудов жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии и пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией. ** $p < 0,01$.

4. Обсуждение

МСК являются ключевыми регуляторами функциональной активности множества тканей организма человека, в частности жировой ткани и ее сосудов. За счет способности дифференцироваться в адипоциты и секретировать множество факторов роста и цитокинов МСК являются ключевыми участниками обновления жировой ткани [80, 157, 187]. При этом функциональная активность этих клеток подвергается строгому нейроэндокринному контролю [71]. Согласно полученным нами данным МСК жировой ткани локализируются в непосредственной близости от волокон симпатической нервной системы. Следовательно активация симпатической нервной системы в первую очередь оказывает эффект на МСК. А периваскулярное положение МСК указывает на то, что системные гормоны в первую очередь также будут действовать на эти клетки.

Ранее в нашей лаборатории был открыт феномен повышения чувствительности МСК к норадреналину через 6 часов после воздействия норадреналина [190]. Однако временные рамки и механизм данного феномена не были изучены. В рамках данной работы мы проанализировали временные рамки, сигнальный каскад и механизмы, ответственные за повышение чувствительности клеток к норадреналину. Нами было показано, что повышение чувствительности клеток к норадреналину имеет транзиторный характер и напрямую зависит от уровня белка $\alpha 1A$ -адренорецептора. Было показано, что временные рамки феномена ограничиваются 12 часами. Действие норадреналина через 6 часов приводило к повышению уровня функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. При этом через 12 часов количество рецепторов и чувствительность $\alpha 1A$ -адренорецепторов возвращалась к базальному уровню. Через 24 часа уровень рецепторов и чувствительность клеток также оставались на базальном уровне. Подобные осцилляторные изменения в чувствительности рецепторов и выбросе норадреналина *in vivo* могут соответствовать циркадным ритмам. Циркадными ритмами называют изменения в активности систем и органов, происходящие с интервалом в 24 часа [44]. Активность симпатической нервной системы также меняется циклично с 24 интервалом [97]. Нами было показано, что волокна симпатической нервной системы в жировой ткани напрямую иннервируют МСК. В связи с этим циркадная активность симпатической нервной системы может влиять на чувствительность клеток к норадреналину *in vivo* по механизму, описанному нами в данной работе.

Также нами было показано, что повторное действие норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на МСК активирует $\alpha 1A$ -адренорецепторы, что приводит к переходу клеток в ГМК-подобный фенотип. Данный эффект активации $\alpha 1A$ -

адренорецепторов опосредован повышением активности транскрипционных факторов, связанных с контрактильностью, а именно MEF2A, NFATC3 и TEAD1. Ранее было показано, что TEAD1 является одним из ключевых регуляторов дифференцировки сосудистых гладкомышечных клеток. TEAD1 может запускать синтез транскрипционных факторов PITX2C и MYOCD. PITX2C и MYOCD совместно с SRF запускает экспрессию генов-маркеров дифференцировки клеток в ГМК, таких как α -гладкомышечный актин, кальпонин и SM22 α [93, 168, 201]. Повышение контрактильности МСК совместно с усилением чувствительности α 1A-адренорецепторов может приводить к усилению общего периферического сосудистого сопротивления. Повышение общего периферического сосудистого сопротивления в свою очередь может приводить к развитию артериальной гипертензии [109]. Эти литературные данные коррелируют с результатами анализа экспрессии α 1A-адренорецепторов у пациентов с и без артериальной гипертензии. У пациентов с артериальной гипертензией α 1A-адренорецепторы экспрессируются в большем количестве периваскулярных клеток, чем у пациентов с нормальным артериальным давлением. Также у пациентов с артериальной гипертензией выше количество α -SMA⁺ клеток, экспрессирующих α 1A-адренорецепторы. Возможно, что действие норадреналина на α 1A-адренорецепторы, уровень которых повышается при гиперактивации симпатической нервной системы, может приводить к переходу МСК в ГМК-подобные клетки, экспрессирующие α 1A-адренорецепторы *in vivo*.

Нами было показано, что повышение чувствительности МСК к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы реализуется путем активации β 3-адренорецепторов, локализующихся в ткани на периваскулярных МСК. В современной литературе традиционно обсуждается участие β 3-адренорецепторов в регуляции метаболизма жировой ткани и работы сердечной мышцы. Так, активация β 3-адренорецепторов на адипоцитах запускает липолиз за счет активации цАМФ-зависимого сигнального каскада [25]. Также, активация β 3-адренорецепторов в жировой ткани способствует образованию бурых/бежевых адипоцитов за счет стимуляции экспрессии термогенина (UCP1) [99, 122]. Данный белок является ключевым в недрожательном термогенезе. Термогенин сбрасывает градиент протонов между матриксом митохондрий и межмембранным пространством, что приводит к генерации тепла. В здоровом сердце β 3-адренорецепторы экспрессируются на низком уровне, порядка 3% от всех β -адренорецепторов. Однако при сердечной недостаточности экспрессия β 3-адренорецепторов увеличивается и снижается способность рецепторов к десенситизации. Совместно с повышением активности сигнального пути гуанилатциклаза/цГМФ/фосфодиэстераза это приводит к ослаблению гиперстимуляции β 1-адренорецепторов, которая происходит при сердечной

недостаточности. Ослабление гиперстимуляции $\beta 1$ -адренорецепторов приводит к кардиопротективному эффекту [42, 115].

Нами также был проанализирован сигнальный каскад $\beta 3$ -адренорецепторов, активация которого приводит к повышению уровня $\alpha 1A$ -адренорецепторов и чувствительности клеток к норадреналину. Мы показали, что $\beta 3$ -адренорецепторы активируют сигнальный каскад аденилатциклаза/цАМФ/протеинкиназа А, что приводит к запуску трансляции белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов, но не транскрипции его мРНК. Этот механизм сам по себе является не стандартным, так как обычно повышение уровня белка ассоциировано с изменением транскрипции его мРНК. Дальнейший анализ этого механизма может выявить новую мишень для разработки терапии артериальной гипертензии, связанной с ожирением. Помимо этого, следует изучить влияние активации $\beta 3$ -адренорецепторов на экспрессию других рецепторов, связанных с контрактной функцией сосудов, например, рецепторов АДГ, ангиотензина 2, эндотелина.

При этом роль данных рецепторов в регуляции тонуса сосудов в литературе не описана. Нами было продемонстрировано, что постоянная активация данных рецепторов норадреналином может приводить к повышению количества функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Такое постоянное действие норадреналина *in vivo* соответствует хронической гиперактивации симпатической нервной системы, которая развивается в ряде патологий, например, хронической болезни почек, сахарном диабете 2 типа и обструктивном апноэ сна. Самым распространенным заболеванием, связанным с повышением активности симпатической нервной системы, является ожирение [21, 39].

Развитие ожирения в начале XXI века приняло характер пандемии. Порядка 39% населения планеты страдает от избыточной массы тела. При этом само ожирение приводит к развитию ряда сопутствующих патологий, ухудшающих качество и продолжительность жизни человека [85, 110]. К таким заболеваниям и патологическим состояниям относят дислипидемию, сахарный диабет и атеросклероз. Одним из наиболее распространенных и медицински значимых заболеваний, связанных с ожирением, является артериальная гипертензия. Порядка 70% случаев первичной артериальной гипертензии связывают с развитием ожирения. При этом гиперактивация симпатической нервной системы обсуждается как один из основных механизмов развития артериальной гипертензии при ожирении [169].

Регуляция артериального давления в организме человека осуществляется координированной работой одновременно множества систем и органов. Одной из основных систем, осуществляющих контроль уровня артериального давления является симпатическая нервная система. Так, симпатическая нервная система регулирует как величину просвета

сосудов, так и уровень активности сердечной мышцы [169]. Также, от уровня активности симпатической нервной системы зависит работа других регуляторов артериального давления. Активация симпатической нервной системы запускает β -адренорецепторы юктагломерулярных клеток почек, что повышает выработку ренина. Ренин в свою очередь запускает синтез ангиотензина 2, являющегося сильнейшим вазоконстриктором [118]. Другим примером влияния симпатической нервной системы на системы, регулирующие уровень артериального давления, является активация иммунных клеток. Активация иммунных клеток связана с ремоделированием сосудов, которая приводит к развитию артериальной гипертензии [6, 62].

В современной литературе развитие артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, связывают именно с нарушением активности симпатической нервной системы. Считается, что ожирение приводит к развитию гиперлептинемии, которая в свою очередь вызывает хроническое повышение активности симпатической нервной системы [78]. Такое состояние называют гиперактивацией симпатической нервной системы, и оно развивается у 95-100% пациентов с ожирением. Однако не у всех пациентов с ожирением развивается артериальная гипертензия. Следовательно, развитие гиперактивации симпатической нервной системы является недостаточным условием для развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Вероятно, имеются дополнительные факторы, связывающие повышение активности симпатической нервной системы и развитие артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. На основании полученных нами данных можно предположить следующий патологический механизм, развивающийся у пациентов с ожирением и приводящий к артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Ожирение индуцирует повышенный уровень активности симпатической нервной системы, что увеличивает уровень норадреналина в жировой ткани. Норадреналин действует на β_3 -адренорецепторы МСК/перицитов сосудов и повышает в них экспрессию α_1A -адренорецепторов. Повышение уровня α_1A -адренорецепторов сопровождается усилением контрактильности МСК и, вероятно, к переходу клеток в ГМК-подобный фенотип. Повышение контрактильности клеток приводит к усилению вазоконстрикции сосудов и повышению общего периферического сосудистого сопротивления, что приводит к развитию артериальной гипертензии у пациентов с ожирением (Рис. 29).

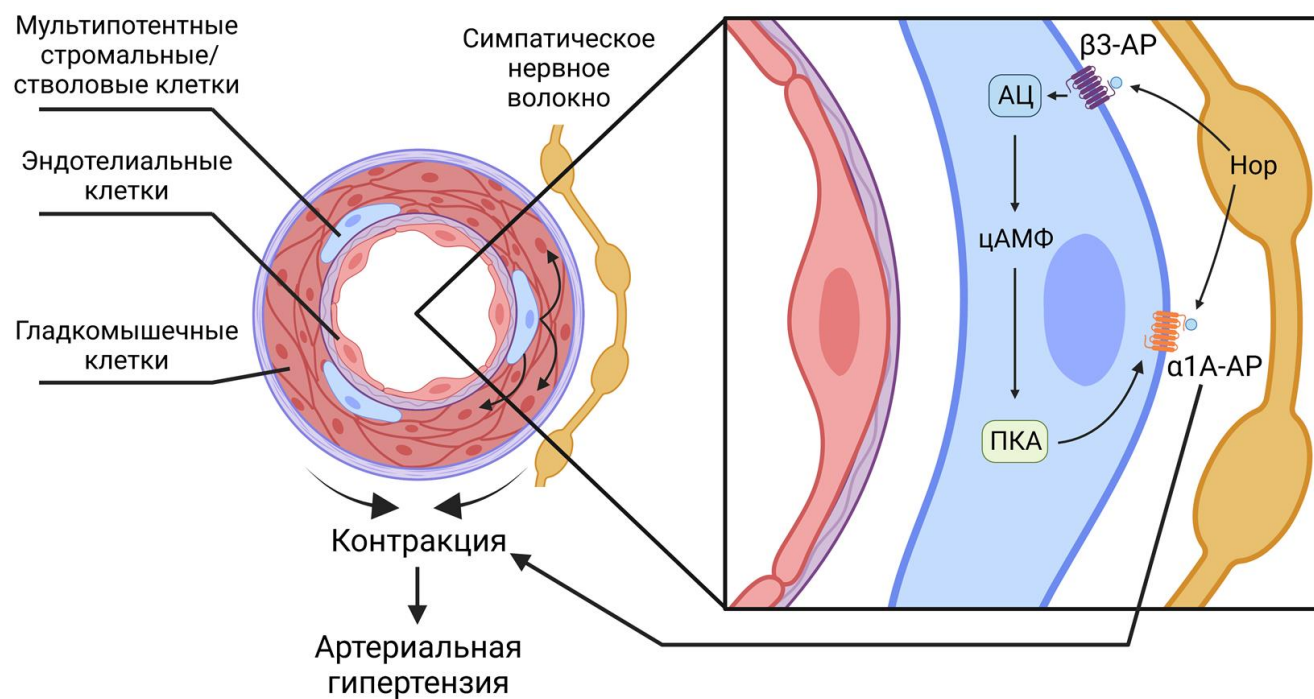


Рисунок 29. Механизм вероятного участия МСК в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. АР – адренорецептор, АЦ – аденилатциклаза, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, ПКА – протеинкиназа А.

5. Выводы

1. Норадреналин повышает количество белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов в 2,22 раза ($p = 3.896 \cdot 10^{-7}$) в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках путем активации сигнального каскада $\beta 3$ -АР/АЦ/цАМФ/ПКА, повышения трансляции молекул рецептора, но не влияет на транскрипцию его мРНК.
2. При воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на уровне одиночных клеток происходит увеличение количества клеток с фенотипом гладкомышечных в 4,0 раза. Также во всей популяции в 1,5-2 раза ($p < 0,01$) усиливается активность транскрипционных факторов, ассоциированных с дифференцировкой мультипотентных стромальных клеток в гладкомышечные клетки.
3. Моделирование гиперактивации симпатической нервной системы приводит к 49,23% усилению ($p < 0,05$) влияния норадреналина на контрактильность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.
4. При моделировании гиперактивации симпатической нервной системы количество отвечающих на норадреналин кальциевой сигнализацией мультипотентных мезенхимных стромальных клеток у пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии, в 1,81 раза ($p = 0,008$) больше, чем у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии.
5. В жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессируются на перицитах (мультипотентных мезенхимных стромальных клетках). У пациентов с ожирением и сопутствующей артериальной гипертензией $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессируются также на 35,0% гладкомышечных клеток ($p = 0,001$).

6. Список литературы

1. Евроген MMLV RT kit / Евроген, 2021. – С.1–8.
2. Кобалова Ж. Д., Конради А. О., Недогода С. В. Меморандум экспертов Российского кардиологического общества по рекомендациям Европейского общества кардиологов/Европейского общества по артериальной гипертензии по лечению артериальной гипертензии 2018 г // Российский кардиологический журнал. – 2018. – Том. 23, N 12. – С.131–142.
3. Майский В.В. Элементарная фармакология / ГЭОТАР-Медиа. – 2008. – С.91–116.
4. Российская ассоциация эндокринологов Клинические рекомендации «Ожирение» // – 2020. – С.1–43.
5. Российское кардиологическое общество Клинические рекомендации «Артериальная гипертензия у взрослых» // – 2020. – С.1–136.
6. Abboud F. M., Singh M. V. Autonomic regulation of the immune system in cardiovascular diseases // Advances in Physiology Education. – 2017. – Vol. 41, N 4. – P.578–593.
7. Aibar S., González-Blas C. B., Moerman T. et al. SCENIC: Single-cell regulatory network inference and clustering // Nature Methods. – 2017. – Vol. 14, N 11. – P.1083–1086.
8. Akhir H. M., Teoh P. L. Collagen type I promotes osteogenic differentiation of amniotic membrane-derived mesenchymal stromal cells in basal and induction media // Bioscience Reports. – 2020. – Vol. 40. N BSR20201325. P. 1–12.
9. Almalki S. G., Agrawal D. K. Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // Differentiation. – 2016. – Vol. 92. – P.41–51.
10. Almalki S. G., Agrawal D. K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells // Stem Cell Research and Therapy. – 2016. – Vol. 7, N 1. – P.1-12.
11. Amable P. R., Vinicius M., Teixeira T. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly // Stem Cell Research & Therapy. – 2014. – Vol. 5, N 2. – P.1–13.
12. Armitage J., Tan D., Troedson R. et al. Mesenchymal stromal cell infusion modulates systemic immunological responses in stable COPD patients: A phase I pilot study // European

Respiratory journal. – 2018. – Vol. 51, N 3. – P.1-11.

13. Arner P. Fat tissue growth and development in humans // Nestle Nutrition Institute Workshop Series. – 2018. – Vol. 89. – P. 37–45.

14. Attar A., Bahmanzadegan Jahromi F., Kavousi S. et al. Mesenchymal stem cell transplantation after acute myocardial infarction: a meta-analysis of clinical trials // Stem Cell Research and Therapy. – 2021. – Vol. 12, N 600. – P. 1–11.

15. Baberg F., Geyh S., Waldera-lupa D. et al. Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells // BBA - Proteins and Proteomics. – 2019. – Vol. 1867, N 4. – P.434–441.

16. Bankir L., Bichet D. G., Morgenthaler N. G. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation // Journal of Internal Medicine. – 2017. – Vol. 282. – P.284–297.

17. Basatemur G. L., Jørgensen H. F., Clarke M. C. H. et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis // Nature Reviews Cardiology. – 2019. – Vol. 16, N 12. – P. 727–744.

18. Benovic J. L., Mayor F., Somers R. L. et al. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by β -adrenergic receptor kinase // Nature. – 1986. – Vol. 321, N 6073. – P.869–872.

19. Bergen V., Lange M., Peidli S. et al. Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling // Nature Biotechnology. – 2020. – Vol. 38, N 12. – P.1408–1414.

20. Bianco P., Robey P. G., Simmons P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays // Cell Stem Cell. – 2008. – Vol. 2, N 4. – P.313–319.

21. Bogaert Y. E., Linas S. The role of obesity in the pathogenesis of hypertension // Nature Clinical Practice Nephrology. – 2009. – Vol. 5, N 2. – P.101–111.

22. Brun J., Lutz K. A., Neumayer K. M. H. et al. Smooth Muscle-Like Cells Generated from Human Mesenchymal Stromal Cells Display Marker Gene Expression and Electrophysiological Competence Comparable to Bladder Smooth Muscle Cells Julianne // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, N 12. – P.1–21.

23. Brunton L. L., Chabner B. A., Knollmann B. C. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics / Brunton, L. L., B. A. Chabner, B. C. Knollmann, 2011. – P.1897.

24. Campbell D. J. The Kallikrein–Kinin System In Humans // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2001. – Vol. 28, N 7. – P.1060–1065.

25. Cero C., Lea H. J., Zhu K. Y. et al. β 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis // JCI Insight. – 2021. – Vol. 6, N 11. – P.1–20.
26. Chan W. C. W., Tan Z., To M. K. T., Chan D. Regulation and role of transcription factors in osteogenesis // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, N 11. – P.1–21.
27. Chaudhary D., Trivedi R. N., Kathuria A. et al. In vitro And In vivo Immunomodulating Properties of Mesenchymal Stem Cells // Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery. – 2018. – Vol. 12, N 1. – P.59–68.
28. Chen J. G., Spagnoli A., Torquati A. Adipogenic differentiation of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells: Effect of gastric bypass surgery // Surgical Endoscopy. – 2012. – Vol. 26, N 12. – P. 3449–3456.
29. Ciuffreda M. C., Malpasso G., Musarò P. et al. Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages // Mesenchymal Stem Cells. – 2016. – P. 149–158.
30. Communal C., Singh K., Sawyer D. B., Colucci W. S. Opposing effects of β 1- and β 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis // Circulation. – 1999. – Vol. 100, . – P.2210–2212.
31. Costanzo L. S. Physiology / Costanzo, L. S., 2015. – P.330.
32. Delgado-Enciso I., Paz-Garcia J., Valtierra-Alvarez J. et al. A phase I-II controlled randomized trial using a promising novel cell-free formulation for articular cartilage regeneration as treatment of severe osteoarthritis of the knee // European Journal of Medical Research. – 2018. – Vol. 23, N 1. – P.1–11.
33. DeMarco V. G., Aroor A. R., Sowers J. R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity // Nature Reviews Endocrinology. – 2014. – Vol. 10, N 6. – P.364–376.
34. Derynck R., Piek E., Schneider R. A. et al. TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2018. – Vol. 10, N 5. – P.1–55.
35. Dominici M., Blanc K. Le, Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P.315–317.
36. Durand M. J., Gutterman D. D. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease // Microcirculation. – 2013. – Vol. 20, N 3. – P.239–247.

37. Eom Y. W., Shim K. Y., Baik S. K. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis // *Korean Journal of Internal Medicine*. – 2015. – Vol. 30. N 5. P. 580–589.
38. Fantin F., Giani A., Zoico E. et al. Weight loss and hypertension in obese subjects // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, N 1667. – P.1-13.
39. Fisher J. P., Young C. N., Fadel P. J. Central sympathetic overactivity: Maladies and mechanisms // *Autonomic Neuroscience*. – 2009. – Vol. 148, N 1–2. – P.5–15.
40. Furchgott R. F., Zawadski J. V The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of atrial smooth muscle // *Nature*. – 1980. – Vol. 288. N 11. – P. 373–376.
41. Galderisi U., Peluso G., Bernardo G. Di Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years? // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2022. – Vol. 18. – P.23–36.
42. Gauthier C., Rozec B., Manoury B., Balligand J.-L. Beta-3 Adrenoceptors as New Therapeutic Targets for Cardiovascular Pathologies // *Current Heart Failure Reports*. – 2011. – Vol. 8, N 3. – P.184–192.
43. Ge C., Cawthorn W. P., Li Y. et al. Reciprocal Control of Osteogenic and Adipogenic Differentiation by ERK MAPK // *Journal of Cellular Physiology*. – 2016. – Vol. 231, N 3. – P.587–596.
44. Gherghel D., Hosking S. L., Orgül S. Autonomic nervous system, circadian rhythms, and primary open-angle glaucoma // *Survey of Ophthalmology*. – 2004. – Vol. 49, N 5. – P.491–508.
45. Gjerde C., Mustafa K., Hellem S. et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 9, N 213. – P.1–15.
46. Glennie S., Soeiro I., Dyson P. J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, N 7. – P.2821–2827.
47. Graaf C. de, Nijmeijer S., Steffen W., Ernst O. P. 7TM Domain Structure of Adhesion GPCRs // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2016. – P. 43–66.
48. Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases // *American Journal of Hypertension*. – 2010. – Vol. 23. N 10. – P. 1052–1060.
49. Grassi G., Biffi A., Seravalle G. et al. Sympathetic Neural Overdrive in the Obese and

Overweight State: Meta-Analysis of Published Studies // Hypertension. – 2019. – Vol. 74, N 2. – P.349–358.

50. Grassi G., Dell’Oro R., Facchini A. et al. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives // Journal of Hypertension. – 2004. – Vol. 22, N 12. – P.2363–2369.

51. Grassi G., Quarti-Trevano F., Esler M. D. Sympathetic activation in congestive heart failure: an updated overview // Heart Failure Reviews. – 2021. – Vol. 26, N 1. – P. 173–182.

52. Grigorieva O., Arbatskiy M., Novoseletskaya E. et al. Platelet-derived growth factor induces *sasp*-associated gene expression in human multipotent mesenchymal stromal cells but does not promote cell senescence // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9, N 1290. – P.1-12

53. Gu W., Song L., Li X. et al. Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation and emphysema in COPD through down-regulation of cyclooxygenase-2 via p38 and ERK MAPK pathways // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5, N 8733. – P.1–11.

54. Guneta V., Zhou Z., Tan N. S. et al. Recellularization of decellularized adipose tissue-derived stem cells: Role of the cell-secreted extracellular matrix in cellular differentiation // Biomaterials Science. – 2018. – Vol. 6, N 1. – P.168–178.

55. Guo X., Chen S.-Y. Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation // World Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 3, N 3. – P.41–52.

56. Guo Y., Dai Y., Yu H. et al. Improvements and impacts of GRCh38 human reference on high throughput sequencing data analysis // Genomics. – 2017. – Vol. 109, N 2. – P. 83–90.

57. Gurevich V. V, Gurevich E. V GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–11.

58. Hadcock J. R., Malbon C. C. Down-regulation of β -adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1988. – Vol. 85, N 14. – P. 5021–5025.

59. Hajifathali A., Saba F., Atashi A. et al. The role of catecholamines in mesenchymal stem cell fate // Cell and Tissue Research. – 2014. – Vol. 358, N 3. – P.651–665.

60. Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data // Cell. – 2021. – Vol. 183. – P.3573–3587.

61. Harris D.-A., Park J.-M., Lee K.-S. et al. Label-Free Dynamic Mass Redistribution Reveals Low-Density, Prosurvival $\alpha 1B$ -Adrenergic Receptors in Human SW480 Colon Carcinoma Cells // *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. – 2017. – Vol. 361. – P.219–228.
62. Harrison D. G. The immune system in hypertension // *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. – 2014. – Vol. 125. – P.130–140.
63. Hartmut R. Kirchheim Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes // *Physiological Reviews*. – 1976. – Vol. 56, N 1. – P.100–176.
64. He X., Ai S., Guo W. et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of severe sepsis: a phase 1 clinical trial // *Translational Research*. – 2018. – Vol. 199, N 9. – P.52–61.
65. Hellsten Y., Nyberg M., Jensen L. G., Mortensen S. P. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation // *Journal of Physiology*. – 2012. – Vol. 590, N 24. – P. 6297–6305.
66. Hildreth A. D., Ma F., Wong Y. Y. et al. Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity // *Nature Immunology*. – 2021. – Vol. 22, N 5. – P.639–653.
67. Hsiao S. T.-F., Asgari A., Lokmic Z. et al. Comparative Analysis of Paracrine Factor Expression in Human Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose, and Dermal Tissue // *Stem Cells and Development*. – 2012. – Vol. 21, N 12. – P.2189–2203.
68. Huang L., Zhang C., Gu J. et al. A Randomized , Placebo-Controlled Trial of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Infusion for Children With Cerebral Palsy // *Cell Transplantation*. – 2018. – Vol. 27, N 76. – P.325–334.
69. Huesing C., Qualls-Creekmore E., Lee N. et al. Sympathetic innervation of inguinal white adipose tissue in the mouse // *Journal of Comparative Neurology*. – 2021. – Vol. 529, N 7. – P. 1465–1485.
70. Husted A. S., Trauelsen M., Rudenko O. et al. GPCR-Mediated Signaling of Metabolites // *Cell Metabolism*. – 2017. – Vol. 25. – P.777–796.
71. Isern J., Méndez-ferrer S. Stem Cell Interactions in a Bone Marrow Niche // *Current Osteoporosis Reports*. – 2011. – Vol. 9. – P.210–218.
72. Iván J., Major E., Sipos A. et al. The Short-Chain Fatty Acid Propionate Inhibits Adipogenic

Differentiation of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Free Fatty Acid Receptor 2 // *Stem Cells and Development*. – 2017. – Vol.10, N 3. – P.1–34.

73. James D. E., Stöckli J., Birnbaum M. J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2021. – . Vol. 22. N 11. P. 751–771.

74. Jenei-Lanzl Z., Straub R. H., Dienstknecht T. et al. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling // *Arthritis and Rheumatism*. – 2010. – Vol. 62. N 4. – P. 1088–1096.

75. Jia G., Aroor A. R., DeMarco V. G. et al. Vascular stiffness in insulin resistance and obesity // *Frontiers in Physiology*. – 2015. – Vol. 6, N 231. – P.1-8.

76. Joseph A., Baiju I., Bhat I. A. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing // *Journal of Cellular Physiology*. – 2020. – . Vol. 235, N 7–8. – P.5555–5569.

77. Kahn B. B., McGraw T. E. Rosiglitazone, PPAR γ , and Type 2 Diabetes // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363, N 27. – P.2667–2669.

78. Kalil G. Z., Haynes W. G. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: Mechanisms and clinical implications // *Hypertension Research*. – 2012. – Vol. 35, N 1. – P.4–16.

79. Kalinina N. I. I., Sysoeva V. Y. Y., Rubina K. A. A. et al. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Growth and Repair // *Acta Naturae*. – 2011. – Vol. 3, N 4. – P.30–37.

80. Kalinina N. I., Sysoeva V. Y., Rubina K. A. et al. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Growth and Repair // *Acta Naturae*. – 2011. – Vol. 4, N 11. – P.30–38.

81. Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M. et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2015. – Vol. 6, N 1. – P.1–12.

82. Karemaker J. M. An introduction into autonomic nervous function // *Physiological Measurement*. – 2017. – Vol. 38, N 5. – P.R89–R118.

83. Karlsson C., Lindell K., Ottosson M. et al. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 1998. – Vol. 83, N 11. – P. 3925–3929.

84. Katsara O., Mahaira L. G., Iliopoulou E. G. et al. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells and Development*. – 2011. – Vol. 20, N 9. – P. 1549–1561.
85. Kinlen D., Cody D., O'Shea D. Complications of obesity // *QJM: An International Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 111, N 7. – P.437–443.
86. Kitamura T., Kitamura Y., Kuroda S. et al. Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19, N 9. – P. 6286–6296.
87. Kotchen T. A. Obesity-Related Hypertension: Epidemiology, Pathophysiology and Clinical Management // *American Journal of Hypertension*. – 2010. – Vol. 23. – P.1170–1178.
88. Kotova P. D., Bystrova M. F., Rogachevskaja O. A. et al. Coupling of P2Y receptors to Ca²⁺ mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue // *Cell Calcium*. – 2018. – Vol. 71. – P.1–14.
89. Kotova P. D., Sysoeva V. Y., Rogachevskaja O. A. et al. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. – 2014. – Vol. 1843, N 9. – P.1899–1908.
90. Kou M., Huang L., Yang J. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration // *Cell Death and Disease*. – 2022. – Vol. 13, N 580. – P.1–16.
91. Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C. Pathologic basis of disease / Kumar, V., A. K. Abbas, J. C. Aster, 2015. – P.1392.
92. Kuroda M., Sakaue H. Adipocyte death and chronic inflammation in obesity // *Journal of Medical Investigation*. – 2017. – Vol. 64, N 3–4. – P. 193–196.
93. Lacolley P., Li Z., Challande P., Regnault V. SRF/myocardin: A novel molecular axis regulating vascular smooth muscle cell stiffening in hypertension // *Cardiovascular Research*. – 2017. – Vol. 113, N 2. – P.120–122.
94. Lamo-Espinosa J. M., Mora G., Blanco J. F. et al. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: Long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II)

// Journal of Translational Medicine. – 2018. – Vol. 16, N 1. – P.1–5.

95. Laurindo F. R. M., Liberman M., Fernandes D. C., Leite P. F. Endothelium-Dependent Vasodilation: Nitric Oxide and Other Mediators // Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes. – 2018. – P. 97–113.

96. Le T., Bhusan V., Sochat M., Chavda Y. First Aid for the USMLE Step 1 / Le, T., V. Bhusan, M. Sochat, Y. Chavda, 2023. – P.849.

97. Leach S., Suzuki K. Adrenergic Signaling in Circadian Control of Immunity // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11, N 1235. – P.1–14.

98. Lee J., Chang W. H., Chung J. W. et al. Efficacy of Intravenous Mesenchymal Stem Cells for Motor Recovery after Ischemic Stroke: A Neuroimaging Study // Stroke. – 2022. – Vol. 53, N 1. – P. 20–28.

99. Lee Y. H., Petkova A. P., Mottillo E. P., Granneman J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding // Cell Metabolism. – 2012. – Vol. 15, N 4. – P.480–491.

100. Li S., Wang D. Z., Wang Z. et al. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development // PNAS. – 2003. – Vol. 100, N 16. – P.9366–9370.

101. Lin F., Wang H. Y., Malbon C. C. Gravin-mediated formation of signaling complexes in β 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, N 25. – P. 19025–19034.

102. Liu C. F., Samsa W. E., Zhou G., Lefebvre V. Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2017. – Vol. 62. – P.34–49.

103. Longo P. A., Kavran J. M., Kim M. S., Leahy D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI) // Methods in Enzymology. – 2013. – Vol. 529. – P.227–240.

104. Louwen F., Ritter A., Kreis N. N., Yuan J. Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells // Obesity Reviews. – 2018. – Vol. 19, N 7. – P. 888–904.

105. Lozito T. P., Jackson W. M., Nesti L. J., Tuan R. S. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs

// Matrix Biology. – 2014. – Vol. 34. – P. 132–143.

106. Luttrell L. M., Roudabush F. L., Choy E. W. et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98, N 5. – P. 2449–2454.

107. Mack C. P. Signaling Mechanisms That Regulate Smooth Muscle Cell Differentiation // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2011. – Vol. 31, N 7. – P.1495–1505.

108. Madeddu P., Emanuelli C., El-Dahr S. Mechanisms of Disease: The tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling // Nature Clinical Practice Nephrology. – 2007. – Vol. 3, N 4. – P. 208–221.

109. Mahajan S., Gu J., Lu Y. et al. Hemodynamic Phenotypes of Hypertension Based on Cardiac Output and Systemic Vascular Resistance // The American Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 133, N 4. – P.1–35.

110. Malnick S. D. H., Knobler H. The medical complications of obesity // QJM: An International Journal of Medicine. – 2006. – Vol. 99, N 9. – P.565–579.

111. Manno G. La, Soldatov R., Zeisel A. et al. RNA velocity of single cells // Nature. – 2018. – Vol. 560. – P.494–516.

112. Matsushita K., Wu Y., Okamoto Y. et al. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes // Hypertension. – 2006. – Vol. 48, N 6. – P.1095–1102.

113. Mello W. C. De, Frohlich E. D. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications // Peptides. – 2011. – Vol. 32, N 8. – P.1774–1779.

114. Méndez-Ferrer S., Michurina T. V., Ferraro F. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche // Nature. – 2010. – Vol. 466, N 7308. – P.829–834.

115. Michel L. Y. M., Farah C., Balligand J.-L. The Beta3 Adrenergic Receptor in Healthy and Pathological Cardiovascular Tissues // Cells. – 2020. – Vol. 9, N 2584. – P.1–22.

116. Mieczkowska A., Schumacher A., Filipowicz N. et al. Immunophenotyping and transcriptional profiling of in vitro cultured human adipose tissue derived stem cells // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, N 11339. – P.1-13

117. Mills S. J., Cowin A. J., Kaur P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process // *Cells*. – 2013. – Vol. 2. N 3. P. 621–634.
118. Mirabito Colafella K. M., Bovée D. M., Danser A. H. J. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets // *Experimental Eye Research*. – 2019. – Vol. 186, N 107680. – P.1–7.
119. Mo I. F. Y., Yip K. H. K., Chan W. K. et al. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors // *BMC Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9, N 52. – P.1–21.
120. Moreau M. E., Garbacki N., Molinaro G. et al. The kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2005. – Vol. 99. N 1. – P. 6–38.
121. Moustaine D. El, Granier S., Doumazane E. et al. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling // *PNAS*. – 2012. – Vol. 109, N 40. – P.16342–16347.
122. Mund R. A., Frishman W. H. Brown adipose tissue thermogenesis: $\beta 3$ adrenoreceptors as a potential target for the treatment of obesity in humans // *Cardiology in Review*. – 2013. – Vol. 21, N 6. – P.265–269.
123. Mushahary D., Spittler A., Kasper C. et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells // *Cytometry Part A*. – 2018. – Vol. 93, N 1. – P.19–31.
124. Naji A., Eitoku M., Favier B. et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – Vol. 5. – P.1–26.
125. Ngo P., Ramalingam P., Phillips J. A., Furuta G. T. Collagen gel contraction assay. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2006. – Vol. 341. – P.103–109.
126. Nie T., Hui X., Gao X. et al. Adipose tissue deletion of Gpr116 impairs insulin sensitivity through modulation of adipose function // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586. N 20. – P. 3618–3625.
127. Ohnishi S., Ohgushi H., Kitamura S. Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Heart Failure // *International Journal of HEMATOLOGY*. – 2007. – Vol. 86. – P.17–21.
128. Olaniru O. E., Persaud S. J. Adhesion G-protein coupled receptors. Implications for metabolic function.pdf // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2019. – Vol. 198. – P.123–134.

129. Pandey K. N. Biology of natriuretic peptides and their receptors // *Peptides*. – 2005. – Vol. 26, N 6. – P.901–932.
130. Paschos G. K., FitzGerald G. A. Circadian Clocks and Vascular Function // *Circulation Research*. – 2010. – Vol. 106. – P.833–841.
131. Payab M., Goodarzi P., Foroughi Heravani N. et al. Stem cell and obesity: Current state and future perspective // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2018. – Vol. 1089. – P. 1–22.
132. Pelttari K., Steck E., Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis // *Injury*. – 2008. – Vol. 39, N 1. – P.58–65.
133. Peters J. Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland // *Peptides*. – 2012. – . Vol. 34, N 2. – P. 427–432.
134. Phinney D. G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2012. – Vol. 113, N 9. – P. 2806–2812.
135. Phinney D. G., Kopen G., Richter W. et al. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 1999. – Vol. 75, N 3. – P.424–436.
136. Piccirillo G., Vetta F., Viola E. et al. Heart rate and blood pressure variability in obese normotensive subjects // *International Journal of Obesity*. – 1998. – Vol. 22, N 8. – P.741–750.
137. Podzolkov V. I., Nebieridze N. N., Safronova T. A. Transforming Growth Factor- β 1, Arterial Stiffness and Vascular Age in Patients With Uncontrolled Arterial Hypertension // *Heart Lung and Circulation*. – 2021. – Vol. 30, N 11. – P. 1769–1777.
138. Pongratz G., Straub R. H. The sympathetic nervous response in inflammation // *Arthritis Research & Therapy*. – 2014. – Vol. 16, N 504. – P. 1–12.
139. Pönicke K., Gröner F., Heinroth-Hoffmann I., Brodde O. E. Agonist-specific activation of the β 2-adrenoceptor/Gs-protein and β 2-adrenoceptor/Gi-protein pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – Vol. 147, N 7. – P. 714–719.
140. Port J. D., Bristow M. R. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2001. – Vol. 33, N 5. – P. 887–905.

141. Pozzobon T., Goldoni G., Viola A., Molon B. CXCR4 signaling in health and disease // Immunology Letters. – 2016. – Vol. 177. – P.6–15.
142. PromoCell Osteogenic Differentiation an Analysis of MSC // Application Note. – 2015. – P. 1–5.
143. Prossnitz E. R., Arterburn J. B., Sklar L. A. Gpr30: a G protein-coupled receptor for estrogen // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2006. – Vol. 2, N 505. – P.138–142.
144. Psaltis P. J., Simari R. D. Vascular wall progenitor cells in health and disease // Circulation Research. – 2015. – Vol. 116. N 8. P. 1392–1412.
145. Pusztaszeri M. P., Seelentag W., Bosman F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 2006. – Vol. 54. N 4. P. 385–395.
146. Qiagen RNeasy Mini Handbook / Qiagen, 2012. – P. 80.
147. Quarti Trevano F., Dell'Oro R., Biffi A. et al. Sympathetic overdrive in the metabolic syndrome: meta-analysis of published studies // Journal of hypertension. – 2020. – Vol. 38, N 4. – P. 565–572.
148. Ragni E., Vigano M., Rebulli P. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation // Journal Cell. Mol. Med. – 2012. – Vol. 17. – P.168–180.
149. Rangwala S. M., Lazar M. A. Transcriptional control of adipogenesis // Annual Review of Nutrition. – 2000. – Vol. 20. – P.535–559.
150. Raudvere U., Kolberg L., Kuzmin I. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – P.191–198.
151. Razik M. A., Lee K., Price R. R. et al. Transcriptional Regulation of the Human $\alpha 1a$ -Adrenergic Receptor Gene // The Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272, N 45. – P.28237–28246.
152. Rehman J., Traktuev D., Li J. et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P.1292–1298.
153. Robidoux J., Kumar N., Daniel K. W. et al. Maximal $\beta 3$ -adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation // Journal of Biological

Chemistry. – 2006. – Vol. 281, N 49. – P. 37794–37802.

154. Rockman H. A., Koch W. J., Lefkowitz R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function // *Nature*. – 2002. – Vol. 415, N 6868. – P. 206–212.

155. Rodríguez-Fuentes D. E., Fernández-Garza L. E., Samia-Meza J. A. et al. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review // *Archives of Medical Research*. – 2021. – Vol. 52, N 1. – P. 93–101.

156. Saelens W., Cannoodt R., Todorov H., Saeys Y. A comparison of single-cell trajectory inference methods // *Nature Biotechnology*. – 2019. – Vol. 37, N 5. – P.547–554.

157. Sagaradze G. D., Basalova N. A., Efimenko A. Y., Tkachuk V. A. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P.1–13.

158. Sakaue M., Hoffman B. B. Glucocorticoids induce transcription and expression of the $\alpha 1B$ adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells // *Journal of Clinical Investigation*. – 1991. – Vol. 88, N 2. – P. 385–389.

159. Sala L. La, Tagliabue E., Vieira E. et al. High plasma renin activity associates with obesity-related diabetes and arterial hypertension, and predicts persistent hypertension after bariatric surgery // *Cardiovascular Diabetology*. – 2021. – Vol. 20, N 118. – P.1–12.

160. Samsonraj R. M., Raghunath M., Nurcombe V. et al. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 6, N 12. – P.2173–2185.

161. Schiffrin E. L., Franks D. J., Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 1985. – Vol. 63, N 12. – P. 1522–1527.

162. Schiffrin E. L., Gutkowska J., Genest J. Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 1984. – Vol. 15, N 4. – P.608–614.

163. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9, N 7. – P.676–682.

164. Schneider R. H., Salerno J., Brook R. D. 2020 International Society of Hypertension global

hypertension practice guidelines - lifestyle modification // Journal of hypertension. – 2020. – Vol. 38, N 11. – P. 2340–2341.

165. Schwalie P. C., Dong H., Zachara M. et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots // Nature. – 2018. – Vol. 559, N 7712. – P.103–108.

166. Scott M. A., Nguyen V. T., Levi B., James A. W. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells // Stem Cells and Development. – 2011. – Vol. 20, N 10. – P. 1793–1804.

167. Selle M., Koch J. D., Ongsiek A. et al. Influence of age on stem cells depends on the sex of the bone marrow donor // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2022. – Vol. 26, N 5. – P. 1594–1605.

168. Shang Y., Yoshida T., Amendt B. A. et al. Pitx2 is functionally important in the early stages of vascular smooth muscle cell differentiation // Journal of Cell Biology. – 2008. – Vol. 181, N 3. – P.461–473.

169. Shariq O. A., Mckenzie T. J. Obesity-related hypertension: A review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery // Gland Surgery. – 2020. – Vol. 9, N 1. – P.80–93.

170. Sharma V., Berkelhamer S., Satyan Lakshminrusimha Persistent pulmonary hypertension of the newborn // Maternal Health, Neonatology, and Perinatology. – 2015. – Vol. 1, N 14. – P.1–18.

171. Sheng Y., Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. // International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology. – 2018. – Vol. 10, N 1. – P. 17–28.

172. Shizukuda Y., Buttrick P. M. Subtype specific roles of β -adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2002. – Vol. 34, N 7. – P.823–831.

173. Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U. et al. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells // BMC Medicine. – 2013. – Vol. 11, N 1. – P.1-20.

174. Siersbæk R., Nielsen R., Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2012. – Vol. 23, N 2. – P.56–64.

175. Sinha K. M., Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation // Journal of Cellular Biochemistry. – 2013. – Vol. 114, N 5. – P.975–984.

176. Slavin B. G., Ballard K. W. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue // The Anatomical Record. – 1978. – Vol. 191, N 3. – P. 377–389.

177. Stassen F. R. M., Maas R. G. H. T., Schiffers P. M. H. et al. A Positive and Reversible Relationship Between Adrenergic Nerves and α_1A -AR in Rat arteries // The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics. – 1998. – Vol. 284, N 1. – P.399–405.

178. Storgaard J. H., Madsen K. L., Løkken N. et al. Impaired lipolysis in propionic acidemia: A new metabolic myopathy? // JIMD Reports. – 2020. – Vol. 53, N 1. – P. 16–21.

179. Sysoeva V. Y., Ageeva L. V., Tyurin-Kuzmin P. A. et al. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem Cell Research. – 2017. – Vol. 25. – P. 115–122.

180. Tamer M. K. El, Reis R. L., Tamer M. K. El, Reis R. L. Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2009. – Vol. 3. N 5. – P. 327–337.

181. Teixeira F. G., Carvalho M. M., Sousa N., Salgado A. J. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2013. – Vol. 70. – P.3871–3882.

182. Thatcher S., Yiannikouris F., Gupte M., Cassis L. The adipose renin-angiotensin system: Role in cardiovascular disease // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2009. – Vol. 302. N 2. – P. 111–117.

183. Tomaschitz A., Pilz S., Ritz E. et al. Aldosterone and arterial hypertension // Nature Reviews Endocrinology. – 2010. – Vol. 6. – P.83–93.

184. Touyz R. M., Alves-Lopes R., Rios F. J. et al. Vascular smooth muscle contraction in Hypertension // Cardiovascular Research. – 2018. – Vol. 114, N 4. – P.529–539.

185. Treschan T. A., Peters J. The vasopressin system: Physiology and clinical Strategies // Anesthesiology. – 2006. – Vol. 105, N 3. – P.599–612.

186. Tripathi A., Vana P. G., Chavan T. S. et al. Heteromerization of chemokine (C-X-C motif) receptor 4 with α_1A/B -adrenergic receptors controls α_1 -adrenergic receptor function // PNAS. – 2015.

– Vol. 112, N 13. – P.1659–1668.

187. Tsuji W., Rubin J. P., Marra K. G. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration // *World Journal of Stem Cells*. – 2014. – Vol. 6, N 3. – P.312–321.

188. Tyurin-Kuzmin P. A., Balatskiy A. V., Kalinina N. I. et al. Angiotensin receptor subtypes regulate adipose tissue renewal and remodelling // *The FEBS Journal*. – 2020. – Vol. 287. – P.1076–1087.

189. Tyurin-Kuzmin P. A., Dyikanov D. T., Fadeeva J. I. et al. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // *Scientific Data*. – 2018. – Vol. 5, N 2. – P.1–8.

190. Tyurin-Kuzmin P. A., Fadeeva J. I., Kanareikina M. A. et al. Activation of β -adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P.1–9.

191. Tyurin-Kuzmin P., Karagyaour M., Kulebyakin K. et al. Functional heterogeneity of protein kinase A activation in multipotent stromal cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, N 12. – P.1–14.

192. Uth K., Trifonov D. Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview // *World Journal of Stem Cells*. – 2014. – Vol. 6, N 5. – P.629–636.

193. Valiunas V., Doronin S., Valiuniene L. et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions // *Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 555, N 3. – P. 617–626.

194. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O. et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P.1–14.

195. Waltman L., Eck N. J. Van A smart local moving algorithm for large-scale modularity-based community detection // *European Physical Journal B*. – 2013. – Vol. 86, N 11. – P.1–33.

196. Wang H., Pang B., Li Y. et al. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells // *Cytotherapy*. – 2012. – Vol. 14, N 4. – P. 423–430.

197. Wang W., Han Z. C. Heterogeneity of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells 2019. – P. 165–177.

198. Wang W., Seale P. Control of brown and beige fat development // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – Vol. 17, N 11. – P. 691–702.
199. Wang Z., Chai C., Wang R. et al. Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity // *Clinical and Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 11. N 12. – P. 1–24.
200. Weiss A. R. R., Dahlke M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs Andreas // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10, N 1191. – P.1–10.
201. Wen T., Liu J., He X. et al. Transcription factor TEAD1 is essential for vascular development by promoting vascular smooth muscle differentiation // *Cell Death and Differentiation*. – 2019. – Vol. 26, N 12. – P.2790–2806.
202. Wenzel U. O., Benndorf R., Lange S. Treatment of Arterial Hypertension in Obese Patients // *Seminars in Nephrology*. – 2013. – Vol. 33. N 1. – P. 66–74.
203. Westerhof N., Stergiopulos N., Noble M. I. M., Westerhof B. E. Snapshots of Hemodynamics / Westerhof, N., N. Stergiopulos, M. I. M. Noble, B. E. Westerhof, 2019. – P.306.
204. Wharton S., Lau D. C. W., Vallis M. et al. Obesity in adults: a clinical practice guideline // *CMAJ*. – 2020. – Vol. 192, N 31. – P.875–891.
205. White J. H., Wise A., Main M. J. et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_A receptor // *Nature*. – 1998. – Vol. 396, N 12. – P.679–682.
206. Williams B., Mancia G., Spiering W., Rosei E. A. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension // *European Heart Journal*. – 2018. – Vol. 39. – P.3021–3104.
207. Wolf F. A., Hamey F. K., Plass M. et al. PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells // *Genome Biology*. – 2019. – Vol. 20, N 1. – P.1–9.
208. Wright J. W., Harding J. W. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. – 2013. – Vol. 465. N 1. – P. 133–151.
209. Yang X., Meng Y., Han Z. et al. Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: full of chances and challenges // *Cell and Bioscience*. – 2020. – Vol. 10. N 123. – P. 1–18.

210. Young L., Sung J., Masters J. R. Detection of mycoplasma in cell cultures // *Nature Protocols*. – 2010. – Vol. 5, N 5. – P.929–934.
211. Zaim M., Karaman S., Cetin G., Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Annals of Hematology*. – 2012. – Vol. 91, N 8. – P. 1175–1186.
212. Zang Y., Kahsai A. W., Pakharukova N. et al. The GPCR- β -arrestin complex allosterically activates C-Raf by binding its amino terminus // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297. N 6. – P. 1–7.
213. Zaugg M., Xu W., Lucchinetti E. et al. β -adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102. – P.344–350.
214. Zhang G.-Z., Sun H.-C., Zheng L.-B. et al. In vivo hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived MSCs.pdf // *World Journal of Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 23, N 46. – P.8152–8168.
215. Zhu M., Heydarkhan-hagvall S., Hedrick M. et al. Manual Isolation of Adipose-derived Stem Cells from Human Lipoaspirates // *Journal of Visualized Experiments*. – 2013. – Vol. 79, N e50585. – P.1–10.
216. Zois N. E., Bartels E. D., Hunter I. et al. Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease // *Nature Reviews Cardiology*. – 2014. – Vol. 11. N 7. – P. 403–412.
217. Interpreting Cell Ranger Web Summary Files for Single Cell Expression Assay // – 2020. – P. 7.

7. Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах SCOPUS, WOS, RSCI

1. Тюрин-Кузьмин П. А., Молчанов А. Ю., Чечехин В. И. и др. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток млекопитающих // Биохимия. – 2020. – Том 85. № 3. С. 307–323.
2. Хозяинова А. А., Валяева А. А., Арбатский М. С. и др. Возможности комплексного анализа данных секвенирования РНК единичных клеток // Биохимия. – 2023. – Том 88, № 2. – С.171–198.
3. Чечехин В. И., Кулебякин К. Ю., Тюрин-Кузьмин П. А. Особенности регуляции гормональной чувствительности стволовых клеток // Онтогенез. – 2022. – Том 53, № 3. – С.163–172.
4. Arbatsky M., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K. et al. Points of Significance: Principal Component Analysis for Biocentric Data Visualization // BioNanoScience. – 2022. – Vol. 12. – P.1366–1380.
5. Chechekhin V., Ivanova A., Kulebyakin K. et al. Alpha1A-and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. – 2023. – Vol. 12, N 585. – P.1–14.
6. Chechekhin V., Kulebyakin K., Kokaev R., Tyurin-Kuzmin P. GPCRs in the regulation of the functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Vol. 10. – P.953374.
7. Tyurin-Kuzmin P., Chechekhin V., Ivanova A. et al. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, N 12. – P.3712.
8. Tyurin-Kuzmin P., Karagyaur M., Kulebyakin K. et al. Functional heterogeneity of protein kinase a activation in multipotent stromal cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, N 12. – P.4442.