

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич

**Адренергическая регуляция постнатальных мультипотентных
мезенхимных стромальных клеток человека:
сенситизация рецепторов, активация стволовых клеток и
управление их дифференцировкой**

1.5.5. – Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор, академик РАН В.А.Ткачук

Москва – 2024

Оглавление

Список используемых сокращений.....	10
Введение.....	17
Актуальность темы исследования.....	17
Степень разработанности темы.....	18
Цель и задачи	20
Научная новизна исследования.....	21
Теоретическая и практическая значимость исследования	22
Положения, выносимые на защиту.....	23
Методология и методы исследования	24
Степень достоверности данных	24
Личный вклад соискателя	25
Апробация материалов работы	26
Структура и объем диссертационной работы.....	26
1. Обзор литературы.....	27
1.1. Пути осуществления основных функций стволовых клеток.....	28
1.2. Типы стволовых клеток.....	30
1.3. Дифференцировка стволовых клеток.....	38
1.4. Регуляция дифференцировки стволовых клеток	43

1.4.1. Общий обзор механизмов регуляции дифференцировки стволовых клеток.....	43
1.4.2. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток	45
1.4.3. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции дифференцировки стволовых клеток	47
1.4.4. Внутриклеточные механизмы, регулирующие дифференцировку стволовых клеток, но не затрагивающие напрямую процессы в ядре	50
1.4.5. Сигнальная регуляция дифференцировки стволовых клеток.	53
1.4.6. Влияние внеклеточного матрикса на дифференцировку стволовых клеток.....	54
1.5. Ниша стволовой клетки.....	57
1.6. Функциональная гетерогенность стволовых клеток.....	63
1.6.1. Варианты проявления функциональной гетерогенности стволовых клеток.....	64
1.6.2. Механизмы возникновения функциональной гетерогенности стволовых клеток путем регуляции гормональной чувствительности	68
1.6.3. Межклеточная коммуникация как механизм реализации функциональной гетерогенности стволовых клеток.....	75
1.6.4. Другие механизмы возникновения функциональной гетерогенности стволовых клеток	76
1.6.5. Роль гетерогенности стволовых клеток в процессах регенерации.....	77

1.7. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки	80
1.7.1. Общая характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	80
1.7.2. Ключевые функции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	81
1.7.3. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки <i>in vivo</i>	83
1.7.4. Регуляция функциональных свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.....	84
1.7.5. Проблема выбора направления дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.....	87
2. Материалы и методы исследования	89
2.1. Выделение первичной культуры МСК	89
2.2. Культивирование МСК.....	90
2.3. Иммуногистохимический анализ	91
2.4. Кальциевая сигнализация.....	92
2.5. Подготовка библиотек для анализа транскриптома одиночных клеток	94
2.6. Биоинформатический анализ транскриптома одиночных клеток	96
2.7. Контракция МСК-коллагеновых дисков	97
2.8. Иммунофлуоресцентный анализ локализации ПКА в одиночных клетках	99
2.9. Вестерн-блоттинг	100

2.10.	ПЦР в реальном времени	101
2.11.	Лентивирусная трансдукция МСК	104
2.12.	CRISPR/Cas-опосредованный нокаут ADRB2 и ADRB3 в клетках ASC52telo	105
2.13.	Проточная цитометрия и клеточный сортинг	106
2.14.	Адипогенная дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.....	109
2.15.	Наблюдение за адипогенной дифференцировкой в режиме реального времени на уровне единичных клеток.....	110
2.16.	Наблюдение за митотической активностью клеток	112
2.17.	Измерение скорости миграции клеток	112
2.18.	Визуализация активации ПКА для регистрации активности цАМФ-зависимого сигнального каскада.....	113
2.19.	Работа с мышами. Индукция побурения. Локальная симпатэктомия эпидидимального жирового депо	117
2.20.	Определение концентрации норадреналина в парных депо жировой ткани мыши	119
2.21.	Хондрогенная дифференцировка	120
2.22.	Статистический анализ.....	120
3.	Результаты и обсуждение	122
3.1.	Характеризация МСК	122
3.1.1.	Определение МСК.....	122

3.1.2. Гетерогенность МСК по способности к дифференцировке..	124
3.1.3. Гетерогенность МСК по их подвижности	125
3.1.4. Гетерогенность МСК по гормональной чувствительности ..	127
3.2. Инициация МСК.....	134
3.2.1. Поиск функционального состояния МСК, в котором они производят выбор направления дифференцировки.....	135
3.2.2. <i>Дифференцировка МСК сопряжена с образованием универсального инициированного состояния.....</i>	141
3.2.3. Обсуждение. Инициация МСК как выход стволовой клетки из функциональной ниши	144
3.3. Пролиферация МСК как ключевой процесс самообновления ...	146
3.3.1. Инициированное состояние как ключевой этап направления МСК в пролиферацию	146
3.3.2. Ключевые регуляторы пролиферативной активности МСК	148
3.3.3. Обсуждение. В самообновление стромальные клетки направлялись из инициированного состояния по редокс-зависимым механизмам	152
3.4. Механизмы перехода МСК в инициированное состояние	153
3.4.1. Норадреналин как регулятор инициации МСК.....	153
3.4.2. Сигнальные механизмы инициации МСК под действием норадреналина	157
3.4.3. Влияние норадреналина на чувствительность МСК к норадреналину	160

3.4.4. Норадреналин-зависимое повышение чувствительности МСК к норадреналину связано с повышением уровня $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов	162
3.4.5. Механизмы норадреналин-зависимого повышения чувствительности МСК к норадреналину	169
3.4.6. Обсуждение. Сенситизация $\alpha 1A$ -адренорецепторов как возможный механизм инициации МСК.....	177
3.5. Дифференцировка МСК в контрактильный фенотип	180
3.5.1. Локализация $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани.....	181
3.5.2. scRNSseq анализ изменения МСК в направлении контрактильного фенотипа.....	183
3.5.3. Проверка дифференцировки МСК в контрактильные клетки функциональными тестами	190
3.5.4. Выбор модели для изучения регуляции контрактильных свойств МСК под действием норадреналина <i>in vivo</i>	193
3.5.5. Иммунофлуоресцентный анализ распределения $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани.....	196
3.5.6. Способность МСК пациентов, страдающих ожирением, к сенситизации в ответ на моделирование избыточной активации СНС, коррелирует с развитием артериальной гипертензии	200
3.5.7. Обсуждение. Общая схема развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.....	202
3.6. Инструктивные сигналы для выбора направления адипогенной дифференцировки МСК	206

3.6.1. Влияние катехоламинов на адипогенную дифференцировку МСК	206
3.6.2. Активация β -адренорецепторов приводит к подавлению дифференцировки МСК в белые адипоциты.....	213
3.6.3. Регистрация адипогенной дифференцировки МСК в режиме реального времени на уровне единичных клеток	215
3.6.4. Последовательная стимуляция β -адренорецепторов, а затем $\alpha 1$ -адренорецепторов приводила к бежевой дифференцировке МСК	219
3.6.5. Изоляция индивидуальных клеток, отвечающих кальцием на норадреналин, подтвердила коммитирование в бежевую дифференцировку	223
3.6.6. Треккинг дифференцировки МСК непосредственно в UCP1-экспрессирующие бежевые адипоциты	228
3.6.7. Метаболические изменения в дифференцирующихся адипоцитах вследствие их коммитирования в бежевом направлении	232
3.6.8. Обсуждение метаболических изменений в МСК после их инициации и направления в адипогенную дифференцировку	236
3.6.9. Проверка вклада инициации МСК в выбор направления адипогенной дифференцировки <i>in vivo</i>	236
4. Заключение	247
Выводы	250
Список литературы	252
Приложения	276

Приложение 1. Данные о пациентах, жировая ткань из которых использовалась в экспериментах по контрактильной дифференцировке МСК	276
Приложение 2. Данные о пациентах, жировая ткань из которых использовалась в экспериментах по выяснению механизмов инициации МСК и регуляции адипогенной дифференцировки МСК (пропущенные ячейки означают, что эти данные не были предоставлены хирургами).	278
Приложение 3. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня сигнальных каскадов в ответ на PDGF.....	281
Приложение 4. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов	287
Приложение 5. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня экспрессии β -адренорецепторов после нокаута	289
Приложение 6. Срезы жировой ткани, окрашенные на $\alpha 1A$ -адренорецепторы	290
Приложение 7. Экспрессия $\alpha 1B$ - и $\alpha 1D$ -адренорецепторов в жировой ткани.....	302
Приложение 8. Репрезентативный IgG контроль для иммунофлуоресцентной окраски жировой ткани	305

Список используемых сокращений

2-APB – ингибитор ИФЗР

α -SMA – альфа-гладкомышечный актин

α КГ – альфа-кетоглутарат

АД – артериальное давление

АР – адренергические рецепторы

АцКоА – ацетил-кофермент А

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография (ион-парная хроматография) с электрохимической детекцией

ГАФД – D-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа

гРНК – геновая РНК

ГСК – гематопозитическая стволовая клетка

ГТФазы – гуанозинтрифосфат-гидролазы

ИМТ – индекс массы тела

ИФЗ – инозитол-(1,4,5)-трис-фосфат

ИФЗР – рецептор инозитол-(1,4,5)-трис-фосфата

методов анализа транскриптома единичных клеток (scRNAseq)

МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ОПСС – общее сосудистое периферическое сопротивление

ОЦК – объем циркулирующей крови

ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс

ПКА – протеинкиназа А

ПКС – протеинкиназа С

ПТГ – паратиреоидный гормон

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ-каталаза – полиэтиленгликоль модифицированная каталаза,
проникающая в клетку

СВ – сердечный выброс

СК – стволовая клетка

СНС – симпатическая нервная система

ст.ош. – стандартная ошибка среднего

ФАП – фибро-адипогенные предшественники

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ХЕПЕС – буферный агент для культуральных работ, 4-(2-гидроксиэтил)-1-
пиперазинэтансульфоновая кислота (англ. HEPES)

цАМФ – циклический аденозин-монофосфат

ЭСК – эмбриональная стволовая клетка

ABCG1 – ATP-binding cassette sub-family G member 1

ADRA1A – ген $\alpha 1A$ -адренорецептора

ADRB2 – ген $\beta 2$ -адренорецептора

ADRB3 – ген $\beta 3$ -адренорецептора

АКАР – каркасные белки, связывающие ПКА (англ. A-kinase-anchoring
protein)

ВМР – костный морфогенетический белок (англ. bone morphogenetic protein)

С/ЕВР α – ССААТ/энхансер-связывающий белок (англ. ССААТ/enhancer-binding protein)

СССР – митохондриальный разобцитель (англ. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)

CD105 – эндоглин

CD106 – сосудистая молекула адгезии, маркер активированного эндотелия (англ. VCAM, vascular cell adhesion molecule 1)

CD11b – поверхностный маркер макрофагов, интегрин альфа М (Integrin alpha M, ITGAM)

CD13 – поверхностный антиген (англ. Membrane alanyl aminopeptidase, aminopeptidase N)

CD138 – белок синдекан 1

CD14 – поверхностный маркер макрофагов

CD142 – тканевой фактор (англ. Tissue factor, также называется platelet tissue factor, factor III)

CD150 – сигнальная молекула активации лимфоцитов, SLAMF1 (англ. Signaling Lymphocyte Activation Molecule)

CD19 – поверхностный маркер В-лимфоцитов (B-lymphocyte antigen)

CD235a – гликофорин А, поверхностный маркер эритроцитов (англ. Glycophorin A)

CD29 – интегрин бета1 (англ. Integrin beta-1)

CD31 – молекула адгезии тромбоцитов к эндотелию (англ. Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1))

CD34 – трансмембранный фосфогликопротеин, метит гематопозитические стволовые клетки

CD41 – Интегрин альфа2b (англ. Integrin alpha 2b)

CD44 – поверхностный гликопротеин (англ. homing cell adhesion molecule)

CD45 – общий лейкоцитарный антиген (англ. leukocyte common antigen (LCA), Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C)

CD54 – межклеточная молекула адгезии (ICAM, Intercellular Adhesion Molecule 1)

CD73 – экто-5'-нуклеотидаза

CD79alpha – поверхностный маркер В-лимфоцитов

CD90 – Гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок суперсемейства иммуноглобулинов, THY1

CICR – кальций-индуцированный выход кальция

CREB – транскрипционный фактор, связывающийся с цАМФ-зависимыми регуляторными участками на ДНК (англ. cAMP response element-binding protein)

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

DMEM – среда Игла в модификации Дальбекко (англ. Dulbecco's modified Eagle medium)

EGF – эпидермальный фактор роста (англ. epidermal growth factor)

Erk1/2 – митоген-активируемая киназа, другое название p42/44 (англ. extracellular signal-regulated kinase 1/2)

EtOH – этанол

eWAT – эпидидимальных жировых депо

FasL – поверхностный маркер Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (англ. Fas ligand, CD95L, CD178)

FBS – фетальная сыворотка крупного рогатого скота (англ. fetal bovine serum)

FCCP – митохондриальный разобщитель (англ. Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone)

GRK – киназа G-белок-ассоциированных рецепторов

HIF-1 α – индуцируемый гипоксией фактор-1 α (англ. hypoxia-inducible factor-1 α)

HLA-DR – лейкоцитарный антиген человека (англ. MHC class II cell surface receptor)

HTR1 – серотониновые рецепторы 1 типа

IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин (англ. 3-Isobutyl-1-methylxanthine)

ICAM – межклеточная молекула адгезии (Intercellular Adhesion Molecule 1, CD54)

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста (англ. insulin-like growth factor)

IL-3,-6,-10 – интерлейкин

ILK – интегрин-зависимая киназа (англ. Integrin-linked kinase)

LIF – фактор, ингибирующий лейкемию (англ. Leukemia inhibitory factor)

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

mTOR – механистическая (или млекопитающих) мишень рапамицина (англ. mechanistic/mammalian target of rapamycin)

mTORC – сигнальный комплекс, включающий в себя mTOR

MyoD – мастер-регулятор миогенной дифференцировки

MMP-1,-9 – матриксные металлопротеиназы

MP1-MMP – матриксная металлопротеиназа

NHERF – адаптерный белок (англ. Na⁺/H⁺-exchange regulatory cofactor)

NO – монооксид азота

PDE3B – фосфодиэстераза (англ. Phosphodiesterase 3)

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (англ. platelet-derived growth factor)

PDPN – белок подоплатин

PEI – полиэтиленимин (англ. polyethylenimine), трансфицирующий агент

PGE2 – простагландин E2

PI3-киназа – фосфатидилиинозитол-3-киназа

PKA-Spark – биосенсор на активность PKA

PP2A – белковая фосфатаза (англ. Protein phosphatase 2)

PPAR γ – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом γ (англ. peroxisome proliferator-activated receptor- γ)

RPL13A – ген 60S рибосомального белка L13a, в данной работе использовался как ген домашнего хозяйства для ПЦР

SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением (англ. senescence-associated secretory phenotype)

SDC1 – ген белка синдекан 1 (англ. syndecan 1; CD138)

SMAD2,3 – Транскрипционный модулятор (англ. Similar to Mothers Against Decapentaplegic)

SQ22536 – селективный ингибитор аденилат-циклазы

SREBP-1 – белок 1 типа, связывающий стероловый регуляторный элемент (англ. sterol regulatory element-binding protein-1)

TCDD – токсический агент (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin)

TGF- β – трансформирующий фактор роста- β (англ. transforming growth factor- β)

UCP – разобщающий белок митохондрий (англ. uncoupling protein)

VCAM – сосудистая молекула адгезии, маркер активированного эндотелия (англ. vascular cell adhesion molecule 1, CD106)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (англ. Vascular endothelial growth factor)

Введение

Актуальность темы исследования

Практически все органы и ткани организма подвержены обновлению на протяжении всей жизни человека. При этом скорость обновления различных тканей значительно варьирует. Например, клетки эпителия кишечника обновляются за несколько дней, период обновления клеток печени порядка одного года, а скелетная и жировая ткань обновляется в среднем за 10 лет. Новые клетки могут появляться за счет деления дифференцированных клеток, дифференцировки стволовых клеток или транsdифференцировки зрелых клеток. До XX века клеточные биологи знали только первый механизм; важнейшим открытием XX века стало открытие стволовых клеток [1]. А уже в наше время, в XXI веке произошло открытие механизма транsdифференцировки [2].

Диссертация посвящена выяснению механизмов обновления тканей и органов за счет дифференцировки специального пула стволовых клеток, которые на протяжении всей жизни сохраняют, поддерживают и реализуют регенеративные способности организма. Характерной чертой многих тканей является то, что в основе их обновления и регенерации лежат тканеспецифичные стволовые клетки, из которых образуется множество специализированных клеток, формирующих эту ткань. В этом контексте принципиально важно, чтобы при обновлении и восстановлении после повреждения ткани сохранялся клеточный «гомеостаз» ткани (баланс разных типов клеток, соответствующий ее здоровому состоянию). Нарушение процессов тканевого обновления, в первую очередь, влияет на работу быстрообновляющихся тканей, а также высокопластичных тканей, объем которых может значительно изменяться в течение жизни.

Тканью, объем которой больше всего может меняться в течение жизни у взрослого человека, является жировая ткань. В случае нарушения ее

обновления развивается гипертрофия адипоцитов, сопряженная со снижением их метаболической и эндокринной активности. В гипертрофированных адипоцитах снижена чувствительность к инсулину, в результате чего развивается инсулинорезистентность, нарушается профиль секретируемых гормонов жировой ткани адипокинов, что ведет к целому ряду негативных физиологических изменений [3]. Обновление жировой ткани человека осуществляют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) [4, 5]. Именно нарушение регенеративной и регуляторной активности этих клеток приводит к гипертрофии жировой ткани и далее к целому ряду таких значимых заболеваний и патологических состояний, как сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром, существенной части случаев артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Понимание молекулярных механизмов выбора направления дифференцировки МСК между несколькими возможными путями предоставит возможность для создания принципиально новых терапевтических подходов к лечению ряда широко распространенных метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний, нормализации метаболического статуса современного человека, ведущего преимущественно сидячий образ жизни в условиях положительного энергетического баланса.

Степень разработанности темы

Обновление тканей организма человека изучается уже более ста лет, в этом направлении были получены значительные результаты. Так, в 1909 году отечественный медик и физиолог А.А. Максимов впервые в мире описал стволовые клетки: особую группу клеток-предшественников крови гематопозитические стволовые клетки [1]. Позднее другой отечественный физиолог А.Я. Фриденштейн описал группу стволовых клеток, которые лежат в основе обновления жировой, костной, хрящевой тканей, а также формирующих строму для функционирования большинства других тканей

организма человека – это особый подтип мультипотентных стволовых клеток взрослого организма, называемых мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) [6]. МСК выявляются практически во всех тканях организма, формируют строму этих тканей. Понятие стромы в данном случае используется в широком смысле: МСК определяют механические свойства тканей и органов, формируя и поддерживая внеклеточный матрикс; МСК обладают важнейшей сигнальной регуляторной функцией, паракринно регулируя функции клеток ткани. Кроме того, МСК как мультипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, адипоциты, гладкомышечные клетки сосудов и фибробласты, формируя и обновляя соответствующие ткани.

МСК являются типичными мультипотентными стволовыми клетками, способными дифференцироваться в несколько различных типов клеток. К настоящему времени показано, что выбор пути дифференцировки стволовой клетки происходит под влиянием последовательности активирующихся транскрипционных факторов, эпигенетических механизмов, спектра паракринных факторов и микроокружения. К настоящему времени эти механизмы хорошо изучены в эмбриогенезе, однако во взрослом организме про них известно крайне мало. То, какие механизмы и факторы определяют выбор направления дифференцировки мультипотентных стволовых клеток взрослого организма, является темой данной работы. В качестве модельного объекта исследований были выбраны МСК жировой ткани человека.

Цель и задачи

Цель работы: Установить физиологические и молекулярные механизмы адренергической регуляции ранних этапов выбора направления дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека.

Задачи работы:

1. На уровне одиночных клеток охарактеризовать гормональную чувствительность и внутриклеточные сигнальные пути в процессе выбора направления дифференцировки постнатальных стволовых клеток человека на примере МСК.
2. С использованием регистрации экспрессии генов на уровне одиночных клеток установить, на каких этапах активации стволовой клетки происходит выбор направления дифференцировки.
3. Установить молекулярные механизмы регуляции пролиферации и самообновления МСК под действием тромбоцитарного фактора роста.
4. Определить роль адренергической сигнальной системы в процессе перехода клеток в состояние выбора направления пути дифференцировки (инициированное состояние). Охарактеризовать гормональную регуляцию МСК в этом состоянии.
5. Выяснить последовательность гормональных сигналов, которые определяют дифференцировку МСК в направлении гладкомышечных клеток (контрактильный фенотип). Выявленные молекулярные механизмы проверить на моделях заболеваний *in vivo*.
6. Установить гормональные сигналы, регулирующие дифференцировку МСК в направлении белых адипоцитов. Установить роль β - и $\alpha 1$ -зависимой сигнализации в регуляции этого процесса.
7. Выяснить последовательность адренергических сигналов, которые определяют дифференцировку МСК в направлении бежевых адипоцитов. Выявленные молекулярные механизмы проверить на животных с проведением

локальной симпатэктомии и индукцией появления бежевых адипоцитов в белых жировых депо.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые проведено комплексное изучение механизмов гормональной регуляции выбора направления дифференцировки мультипотентных стволовых клеток взрослого организма на примере МСК. Впервые показано и охарактеризовано появление на первых этапах активации МСК особого иницированного состояния, в котором клетки приобретают возможность осуществить выбор направления дифференцировки из нескольких возможных направлений. Впервые показано, что для коммитирования стволовой клетки взрослого человека в одно из направлений дифференцировки требуется не только комбинация, но и определенная последовательность действующих на стволовую клетку гормонов и нейромедиаторов. В работе впервые было показано, что последовательная стимуляция β_3 -адренорецепторов, а затем α_1A -адренорецепторов с интервалом в 6 часов направляет МСК в дифференцировку в контрактильный фенотип. Впервые показана корреляция между этим физиологическим механизмом и развитием артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

Впервые выяснены механизмы выбора направления дифференцировки МСК между белыми и бежевыми адипоцитами. Ранее было известно, что в основе этого выбора лежит адренергическая стимуляция жировых депо, но механизмы этого процесса известны не были. Впервые показано, что для направления МСК в бежевые адипоциты требуется последовательная стимуляция β_3 -адренорецепторов, затем α_1A -адренорецепторов, а уже после этого – воздействие на стволовые клетки адипогенного сигнала, в первую очередь, инсулина.

По результатам исследования была предложена новая модель, описывающая механизмы выбора направления дифференцировки МСК из нескольких

возможных. Описана последовательность функциональных состояний стволовой клетки, в которые она последовательно вступает после активации и выхода из покоящегося состояния, а также последовательность стимулов, определяющих выбор направления дифференцировки между контрактильным фенотипом, белыми и бежевыми адипоцитами.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты данной работы имеют как теоретическую и фундаментальную, так и практическую значимость. Теоретическая и фундаментальная значимость данной работы заключается в том, что в ней впервые исследованы и детально описаны молекулярные и физиологические механизмы обновления тканей взрослого человека при участии мультипотентных стволовых клеток. На примере жировой ткани человека, в основе обновления которой лежат мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) показана последовательность функциональных состояний, в которые стволовая клетка переходит в процессе выбора направления дифференцировки. Впервые показано особое инициированное функциональное состояние, в котором стволовая клетка производит выбор направления дифференцировки из нескольких возможных. В практическом плане это инициированное состояние может быть новой терапевтической мишенью при регуляции процесса обновления тканей человека, нарушаемого при целом ряде заболеваний.

Кроме того, показаны комбинации и последовательности гормональных сигналов, которые определяют дифференцировку МСК в направлениях контрактильного фенотипа, связанного с развитием артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, белого и бежевого жира. Обогащение жировых депо бежевыми адипоцитами, которые сжигают жир без побочных продуктов, с образованием лишь тепла, углекислого газа и воды, в последние годы рассматривается крайне перспективным подходом к лечению ожирения.

Положения, выносимые на защиту

1. На начальных этапах активации МСК переходят в состояние, в котором они приобретают способность к выбору направления дифференцировки (инициированное). В этом состоянии МСК обладают свойствами стволовой клетки, описанными в литературе для клеток, вышедших из ниши.
2. Переход МСК в инициированное состояние наблюдается под влиянием катехоламинов за счет стимуляции β_3 -адренорецепторов. При этом происходит повышение чувствительности клеток к норадреналину, сопряженное с экспрессией α_1A -адренорецепторов за счет синтеза цАМФ, активации протеинкиназы А и повышения трансляции, но не транскрипции α_1A -адренорецепторов и не активации цАМФ-зависимых транскрипционных факторов. После повышения уровня α_1A -адренорецепторов МСК приобретают способность к кальциевой сигнализации в ответ на действие катехоламинов.
3. В три различных направления дифференцировки (адипогенное, контрактильное и фиброзное) МСК направляются через одинаковое инициированное состояние, то есть то состояние, в которое они перешли под влиянием стимуляции β_3 -адренорецепторов. Из этого же инициированного состояния МСК переходят к пролиферации и самообновлению, используя редокс-зависимые механизмы.
4. Предложена общая модель ранних этапов выбора направления дифференцировки МСК. Последовательность гормональных сигналов, поочередно изменяющих функциональное состояние МСК, определяет выбор направления дифференцировки МСК между альтернативными путями – контрактильным фенотипом, белыми и бежевыми адипоцитами.

Методология и методы исследования

Работа выполнялась на базе факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. МСК человека, используемые в работе, были выделены из подкожной жировой клетчатки пациентов, полученной в ходе ортопедических и абдоминальных операций. Работа выполнена с привлечением методов молекулярной биологии (клонирование, CRISPR/Cas9-зависимый нокдаун мишеней, ПЦР в реальном времени), микробиологии (культивирование прокариотических микроорганизмов), биохимии (гель-электрофорез и вестерн-блоттинг), клеточной биологии и гистологии (выделение и культивирование первичных культур клеток, адипогенная дифференцировка, регистрация внутриклеточной сигнализации на уровне единичных клеток, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, иммуногистохимическое и иммунофлуоресцентное окрашивание гистологических срезов), физиологии (индукция побурения белой жировой ткани у мышей, локальная симпатэктомия), работа с клиническим материалом (подбор доноров жировой ткани с диагностированной артериальной гипертензией или ее отсутствием на фоне ожирения). Эксперименты выполнены на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, а также в виварии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Степень достоверности данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методов и подходов с использованием достаточного для статистической обработки количества образцов жировой ткани человека и выделенных из нее МСК. Экспериментальные данные проанализированы, оцифрованы и статистически обработаны.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием адекватных, стандартных методов и тестов; эксперименты и

результаты, представленные в работе, воспроизводимы. Результаты исследования представлены для ознакомления научному сообществу и опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах. Публикации, в которых представлены результаты работы, имеют цитирования. В литературном обзоре и разделе, посвящённом обсуждению результатов, используются современные сведения, опубликованные в специализированных научных журналах и изданиях.

Работа была поддержана Стипендией Президента России (2012-2014 г. и 2019-2021 г.), Грантом Президента России (14.W01.17.3167-МК), грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты 18-015-00421, 19-315-80018, 19-315-70037, 20-015-00508 А) и Российского Научного Фонда (Проекты 14-15-00439, 19-75-30007, 21-15-00311). Научная работа соискателя была отмечена Почетной грамотой Министерства науки и высшего образования РФ (2023 г.), Медалью Президиума РАН для молодых ученых (2017 г.), Стипендией Президента России (2012-2014 г. и 2019-2021 г.), Стипендией МГУ имени М.В. Ломоносова для молодых преподавателей и научных сотрудников (2018, 2019 г.), премией «Эврика! Идея» фонда Интеллект (2020 г.).

Личный вклад соискателя

Большинство исследований, вошедших в диссертацию, выполнено непосредственно самим соискателем либо под его руководством. Некоторые этапы работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, однако во всех случаях постановку задач осуществлял соискатель. Соискатель лично определял направления исследований, формулировал гипотезы, планировал и выполнял эксперименты, проводил статистическую обработку данных, написание статей и представление результатов на российских и международных конференциях.

Апробация материалов работы

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 38 статей (из них 25 статей в международных рецензируемых журналах, входящих в базы данных Ядро РИНЦ, Scopus и Web of Science) и 58 тезисов в сборниках докладов всероссийских и международных научных конференций. Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов на российских (Москва, Санкт-Петербург, Пущино, Томск, Сочи, Владикавказ, Казань) и международных конференциях (Швеция, 2011 и 2015, Великобритания, 2018, Чехия, 2019, Сингапур, 2019, Гонконг 2023). Материалы диссертации апробированы на заседании кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета Фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова 27 октября 2023 года.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, трех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 305 страницах и содержит 88 рисунков, 6 таблиц и 253 источника литературы.

1. Обзор литературы

В основе существования любого живого организма лежат процессы развития и поддержания систем организма в рабочем состоянии. Развитие – это образование системы клеток, организованной в целостный организм, из относительно гомогенного материала. Индивидуальное развитие решает две основные задачи: во-первых, порождает клеточное разнообразие и упорядоченность в пределах отдельного организма; во-вторых, обеспечивает непрерывность жизни из поколения в поколение [7]. Поддержание систем организма в рабочем состоянии решается по-разному в разных группах живых существ. У позвоночных ключевыми процессами здесь являются механизмы обновления тканей, а также восстановление после повреждений – регенерация и репарация.

Одним из ключевых вопросов как развития, так и обновления тканей и органов является дифференцировка недифференцированных клеток в работающие структуры, выполняющие определенную функцию в организме. Определения понятия дифференцировка могут несколько варьировать в зависимости от интерпретации этого понятия. Например, в биологии развития понятие дифференцировки трактуется как образование множества различных типов клеток из одной исходной [7]. Во взрослом организме не всегда множество различных типов дифференцированных клеток образуется из одной исходной, бывают случаи недифференцированных клеток с единственным возможным направлением дифференцировки. И, наоборот, в ряде случаев, которые будут обсуждаться ниже, обновление органа осуществляется в результате кооперативной работы целого ряда клеток-предшественников. Поэтому для взрослого организма понятие дифференцировки можно определить как возникновение различий между однородными клетками и тканями организма в ходе развития или, более развернуто, как специализация клетки для выполнения тех или иных функций, приобретение ею черт того или

иногo клеточного типа вследствие включения и выключения определенных генов и возникновения эпигенетических паттернов.

Дифференцировка лежит также в основе регенерации тканей и частей тела организма после их повреждения или удаления. Виды живых существ различаются по способности к регенерации. В целом, прослеживается закономерность: чем сложнее устройство организма вида животного, тем слабее выражены регенеративные свойства организма. В ходе репарации тканей дифференцировка тоже происходит, но образующиеся клетки отличаются меньшей специализацией по сравнению с регенерацией. В основе процессов обновления и регенерации лежит функционирование стволовой клетки – особого типа клеток, которые сохраняют высокую дифференцировочную и регенеративную способность даже во взрослом организме.

1.1. Пути осуществления основных функций стволовых клеток

В процессе морфогенеза стволовые клетки, входящие в эмбрион, претерпевают значительные изменения не только их дифференцировочного потенциала, но также они участвуют в построении формы органов и тканей будущего зародыша. Во взрослом организме, несколько загроуляя, функции стволовых клеток ограничиваются поддержанием гомеостаза ткани путем своевременного обновления ее компонентов и осуществления процессов регенерации и, в случае необходимости, репарации. Стволовые клетки осуществляют ряд действий, которые необходимы для выполнения их функций (классификация дана согласно [7], с изменениями). В случае эмбриона эти действия стволовых клеток необходимы для корректного формирования органов и тканей; в случае стволовых клеток взрослого организма для обновления и регенерации тканей.

- Стволовые клетки делятся, но их деления находятся под строгим контролем. Для правильного формирования эмбриона важно как количество делений

клеток каждого отдела эмбриона, так и направление делений. Эти факторы играют важную роль и в функционировании стволовых клеток взрослого организма.

- Изменение фенотипа клеток. Такие процессы, как закручивание эпителиальных пластов в трубки, лежат в основе формирования нервной системы. Конденсация клеток является ключевым процессом закладки костных зачатков при развитии и регенерации костей [8]. Эпителиально-мезенхимальный переход – это фенотипическое изменение клеток, при котором в значительной степени теряются межклеточные контакты, и клетки начинают действовать, в частности, мигрировать индивидуально. Этот процесс играет ключевую роль в гаструляции эмбриона, а также во взрослом организме во многих процессах репарации и регенерации, а также при метастазировании раковых опухолей [9]. Помимо описанных выше морфологических изменений фенотипа клеток, стволовые клетки способны претерпевать необратимые изменения в процессе своей дифференцировки.

- Миграция клеток. Стволовые клетки в процессе развития эмбриона мигрируют из одних зон эмбриона в другие. Например, клетки нервного гребня мигрируют из него в различные части будущего организма, образуя в том числе надпочечники, узлы симпатической нервной системы и меланоциты. Стволовые клетки взрослого организма обладают свойством хоуминга – перемещения в организме в область, где требуется функциональная активность этих стволовых клеток. Такой областью может быть либо свободная ниша стволовой клетки, либо очаг повреждения [10].

- Изменение размера клеток. В эмбриональном развитии стволовые клетки могут изменять свой размер в процессах морфогенеза. Как в эмбриогенезе, так и во взрослом организме стволовые клетки могут претерпевать асимметричные деления, в результате которых дочерние клетки оказываются разными не только морфологически, но и функционально.

- Программируемая клеточная гибель является, наряду с дифференцировкой, ключевым событием как в эмбриогенезе, так и в здоровом функционировании тканей взрослого организма. Формирование отверстий рта и ануса, исчезновение временных образований в процессе эмбрионального развития происходят за счет программируемой гибели целых групп клеток. Во взрослом организме обновление тканей, и, соответственно, их поддержание в здоровом фенотипе было бы невозможно без программируемой гибели сенесцентных и неправильно работающих клеток и их замещения вновь появляющимися клетками-продуктами деления и дифференцировки стволовых клеток.

Стоит отметить, что для ряда стволовых клеток, например, мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК), показана также возможность паракриной регуляции этими клетками других клеток ткани, о чем будет упомянуто ниже.

1.2. Типы стволовых клеток

Ключевой функцией стволовых клеток является их способность к дифференцировке в определенные специализированные типы клеток. Именно по потенциалу к дифференцировке стволовых клеток производится их первичная классификация. Клетки, способные дифференцироваться во все типы клеток организма и внесзародышевых тканей, осуществлять полную программу развития, то есть, можно сказать, наиболее универсальные стволовые клетки – это зигота и бластомеры после первого деления зиготы. Однако уже после нескольких этапов деления бластомеры морулы млекопитающих теряют способность развиваться в полноценный организм. Далее, в процессе эмбрионального развития, происходит дальнейшее деление, рост и специализация клеточных популяций. Процесс эмбрионального развития подразумевает увеличение числа клеток организма и появление у них новых качеств, необходимых для выполнения задач и функций формирующихся органов, то есть дифференцировку. По мере роста эмбриона, наряду с

формированием разнообразных структур, не существовавших на предыдущих этапах, происходит ограничение возможностей дифференцировки клеток, составляющих эмбрион.

Формирующиеся из зиготы клетки ранней морулы представляют собой тотипотентные клетки – это клетки, которые могут дать начало не только всем типам клеток зародыша, но и внезародышевым органам (Рис. 1.1). Сам зародыш преимущественно развивается из клеток, которые находятся внутри морулы (в случае мышиноного эмбриона – после 4 деления, на 16-клеточной стадии) [11]. В процессе формирования бластоцисты, на стадии 64 клеток в случае мышиноного эмбриона, единая популяция разделяется на клетки внутренней клеточной массы и клетки трофобласта, после чего переход между этими клеточными типами становится невозможен [7]. Во время процесса имплантации бластоцисты в матку из клеток трофобласта развивается хорион, а из клеток внутренней клеточной массы - три зародышевых листка и связанные с ними внезародышевые органы (желточной мешок, аллантаис и амнион). На стадии бластоцисты и имплантации эмбриональные клетки являются плюрипотентными, так как они могут дифференцироваться во все типы клеток организма: в клетки всех трех зародышевых листков и половые клетки. Выделенные в культуру клетки внутренней клеточной массы бластоцисты обозначают как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) (Рис. 1.1). После разделения на зародышевые листки происходит дальнейшее ограничение разнообразия возможностей дифференцировки стволовых клеток зародыша. Клетки каждого из зародышевых листков становятся мультипотентными, поскольку способны дифференцироваться только в границах одного зародышевого листка. Кроме того, в морфологическом плане клетки эмбриона можно разделить на эпителиальные и мезенхимные [12]. Первые сохраняют плотные межклеточные контакты, вследствие чего они отличаются крайне слабым миграторным потенциалом, и, если перемещаются, то только целыми группами клеток, пластами. Вторые клетки, мезенхимного фенотипа, слабо

связаны друг с другом и способны действовать, в том числе и мигрировать поодиночке. Эпителиально-мезенхимальный переход играет ключевую роль в гаструляции многих видов, но и во взрослом организме тоже имеет место быть, например, при метастазировании раковых опухолей.

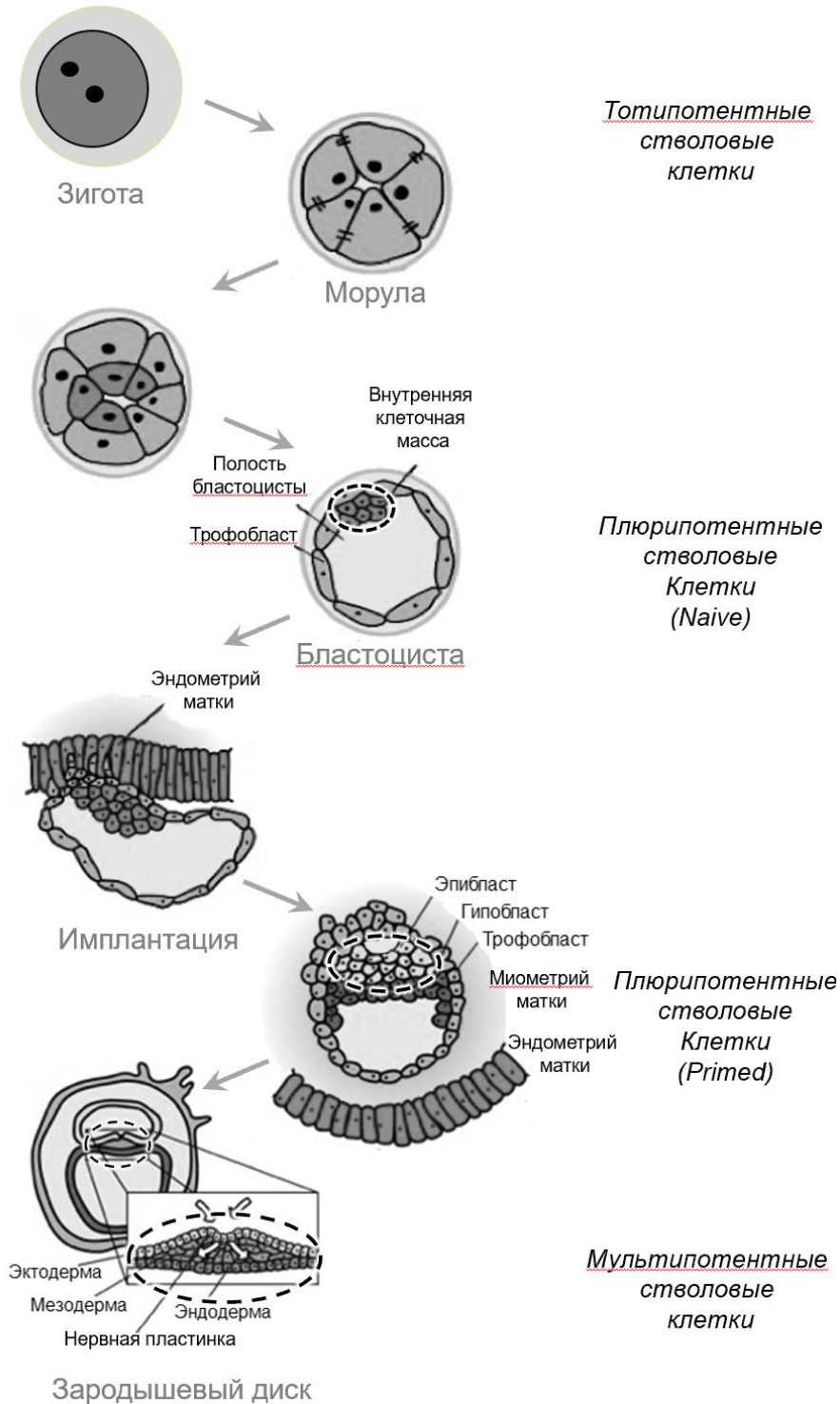


Рис. 1.1. Схематическое изображение начальных этапов эмбрионального развития мышцы. Пунктирными линиями отмечены области эмбриона, из которых выделяют стволовые клетки, характеризующиеся различным потенциалом дифференцировки.

В организме взрослого человека постнатальные стволовые клетки являются мультипотентными или унипотентными. В последнем случае стволовая клетка способна к самообновлению и дифференцировке только в один определенный вид клеток. Несколько упрощая, постнатальные стволовые клетки можно разделить на два типа – тканеспецифичные стволовые клетки и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК, также альтернативно называемые мезенхимными стволовыми клетками). Тканеспецифичные стволовые клетки способны к самообновлению и дифференцируются в один или несколько типов клеток определенной ткани. Например, гематопоетические стволовые клетки (ГСК) дают начало всем клеткам крови, а эпидермальные стволовые клетки в течение всей жизни организма дифференцируются в клетки эпидермиса. МСК выявляются в большинстве тканей организма и ключевыми их функциями является формирование стромы органов и тканей, регуляция тканеспецифичных стволовых клеток и дифференцировка в клетки мезенхимального ряда, такие как кость, жир, хрящ.

В процессе эмбрионального развития стволовые клетки практически не пребывают в покое, они непрерывно и достаточно быстро пролиферируют и дифференцируются, осуществляя морфогенез, а затем и индивидуальное развитие организма. Во взрослом организме стволовые клетки преимущественно находятся в покое, поскольку их ключевой функцией, помимо дифференцировки в нужный момент для обновления и регенерации тканей, является поддержание регенеративного потенциала на протяжении всей жизни организма. Для этого часть стволовых клеток должна не реагировать на поступающие дифференцировочные сигналы, сохраняясь в недифференцированном состоянии на будущее. Такие постнатальные

стволовые клетки лишь изредка выходят из покоящегося состояния для обновления клеток ткани или в случае необходимости репарации и/или регенерации повреждения [13]. В свете этого, для стволовых клеток взрослого организма можно выделить еще одну стадию на пути к функциональным дифференцированным клеткам, это активация стволовой клетки. При этом стволовая клетка выходит из покоящегося состояния, начинает делиться и ее потомки коммитируются в направлении дифференцировки (в случае мультипотентности стволовой клетки также определяются, в каком направлении потомки будут дифференцироваться). Некоторая часть потомков делящейся клетки может вернуться в недифференцированное покоящееся состояние в рамках процесса самообновления.

Для некоторых типов стволовых клеток показано третье функциональное состояние, являющееся промежуточным между покоящимся и активированным. Так, для сателлитных клеток (стволовые клетки скелетных мышц) показано, что при повреждении мышечного волокна, которое сопровождается активацией находящихся около него сателлитных клеток, определенным образом реагируют и сателлитные клетки, расположенные на неповрежденных волокнах, располагающихся на расстоянии. Эти клетки приобретают фенотип, промежуточный по отношению к покоящимся и активированным клеткам. Сателлитные клетки в этом состоянии (авторы статьи назвали его “alert” фенотип) увеличиваются в размерах, активизируют митохондриальное дыхание, подготавливаются к клеточному циклу, но не вступают в него. Это преактивированное состояние регулируется сигнальным комплексом mTORC1, однако более подробно этот механизм прояснен не был [14]. В условиях химического повреждения мышцы токсическим агентом TCDD переход стволовых клеток в состояние “alert” выполняет защитную роль, предотвращая их спонтанную и неконтролируемую активацию [15]. Можно предположить схожую защитную роль этого состояния и в физиологических условиях. Схожее преактивированное состояние в ответ на отдаленное

повреждение мышечного волокна приобретают также мышечные резидентные МСК (в мышцах они называются фибро-адипогенные предшественники, ФАП). В них также активируется mTORC1 и происходят обратимые метаболические изменения [14]. Описанные выше преактивированные состояния сателлитных клеток мышцы и МСК связаны с ответом отдаленных участков ткани на повреждение. Однако намного меньше известно об обратимой преактивации стволовых клеток, в которую бы они вступали на самых ранних этапах выхода из покоящегося состояния. В целом, существует понимание, что активация стволовой клетки является собирательным названием множества различных процессов перехода СК из покоящегося состояния в дифференцировку или пролиферацию. Проходить они могут по разным механизмам в зависимости от типа стволовой клетки. Возможное существование промежуточных стадий, характеризующихся изменением фенотипа или последовательной активацией тех или иных сигнальных путей, относится к специфическим механизмам активации стволовых клеток.

Самообновление, согласно классическому определению стволовой клетки, является ее ключевой функцией, наряду с потенциалом к дифференцировке. Например, гематопозитические стволовые клетки, в зависимости от условий их микроокружения, могут делиться либо асимметрично, когда одна из дочерних клеток остается стволовой, а вторая идет в дальнейшие деления и дифференцировку, либо симметрично, когда обе дочерние клетки оказываются коммитированными [16]. В то же время имеется пример нейтральных стволовых клеток взрослого организма в гиппокампе. Эти клетки после прохождения достаточно редкого процесса активации далее без значительных пауз претерпевают несколько раундов деления и уже необратимо дифференцируются либо в нейроны, либо в глиальные клетки [17, 18].

Стоит заметить, что и тезис про обязательное нахождение стволовой клетки взрослого организма в покоящемся состоянии в настоящее время подвергается некоторому пересмотру. Для целого ряда типов стволовых клеток покоящиеся

стволовые клетки не были найдены. Например, в ряде очень быстро обновляемых тканей, таких как эпидермис [19] или железы желудка [20], покоящиеся стволовые клетки обнаружены не были. Там выявляется множество постоянно делящихся прогениторных клеток, дающих начало дифференцированным. А те клетки в ткани, которые прежде считались малодифференцированными покоящимися стволовыми клетками, оказались при более детальном исследовании дифференцированными клетками [21, 22]. Эти клетки вышли из клеточного цикла по причине дифференцировки, а не потому, что они являются стволовыми. При этом в случае истощения пула активно делящихся стволовых клеток эти покоящиеся дифференцированные клетки (примеры – пепсиноген-продуцирующие главные клетки желудка или люминальные секреторные клетки легких) могут дедифференцироваться и пополнять пул стволовых [21, 22]. Вышеизложенное привело некоторых исследователей к некоторому изменению в понимании стволовой клетки. Стволовая клетка ткани взрослого организма далеко не всегда представляет из себя индивидуальную покоящуюся мультипотентную клетку, способную к самообновлению (как это имеет место в случае «эталонной» стволовой клетки – ГСК). Во многих тканях стволовость представляет собой свойство целой популяции клеток, которое проявляется только при кооперативном действии множества клеток. Клетки при нормальном функционировании ткани выполняют ограниченный набор функций, но в случае повреждения могут трансдифференцироваться или дедифференцироваться и брать на себя функции других клеток. Группы клеток таких тканей и самообновляются, и обладают мультипотентностью, но только на уровне целой популяции [23].

После активации стволовой клетки и ее коммитирования происходит приобретение этой клеткой специализированных функций, ее дифференцировка. Процесс дифференцировки стволовых клеток включает в себя ряд стадий, в ходе которых происходит определение направления пути развития потомков этой клетки. На первом этапе происходит спецификация

стволовой клетки, процесс, в котором происходит первичное определение будущего направления дифференцировки стволовой клетки. Этот процесс обратим, при помещении клетки в отличающиеся условия, в иное микроокружение, при приложении к клетке определенных механических воздействий или при появлении прочих факторов, способных повлиять на направление дифференцировки, клетка меняет это направление. В дальнейшем клетка претерпевает детерминацию, когда процесс дифференцировки уже становится необратимым, но клетка все еще не приобрела молекулярный и функциональный фенотип дифференцированной клетки. И, наконец, непосредственно терминальное состояние дифференцировки, когда клетка либо замедляет пролиферацию, либо вообще перестает делиться, приобретает полный молекулярный фенотип специализированной клетки и способна полноценно выполнять ее функции [7].

Терминально дифференцированные клетки выполняют свою функцию на протяжении времени жизни клетки. Это время может варьировать в широких пределах: от нескольких дней для эпителия кишечника до десяти лет для адипоцитов и остеоцитов и многих десятилетий для нейронов. Тем не менее, большинство клеток со временем подвергаются клеточному старению. Старение клеток может быть вызвано рядом стрессовых стимулов, например, нерепарируемыми повреждениями ДНК, нарушением функционирования митохондрий, стрессом эндоплазматического ретикулума, различными нарушениями метаболизма и протеостаза, а также рядом эпигенетических факторов. Кроме того, особый тип старения, репликативное старение возникает у активно делящихся клеток вследствие укорочения теломер [24]. При старении клеток происходит арест клеточного цикла, изменение морфологии клеток и снижение эффективности выполняемой функции. Кроме того, клетки изменяют спектр секретируемых паракринных факторов и других молекул, переходя на секреторный фенотип, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP) [25, 26]. Результатом нормального старения клеток

ткани является их элиминация по одному из механизмов программируемой гибели клеток и замена на молодые клетки, происходящие из дифференцирующихся стволовых. Таким образом происходит здоровое обновление тканей и органов, которое позволяет им функционировать в течение периодов времени, существенно превышающих продолжительность жизни индивидуальных клеток.

1.3. Дифференцировка стволовых клеток

Дифференцировка стволовых клеток является основой как индивидуального развития, так и процессов поддержания гомеостаза и обновления тканей взрослого организма. В процессе дифференцировки происходят последовательные эпигенетические и транскрипционные изменения, влияющие на биохимические свойства дифференцирующихся клеток. Как следствие, значительно изменяется функциональная активность клетки, она приобретает специализированную функцию, соответствующую дифференцированному состоянию. В большинстве случаев дифференцировка носит необратимый характер, хотя в некоторых случаях наблюдается клеточная пластичность, которая проявляется в процессах дедифференцировки и трансдифференцировки [27]. Важным моментом является то, что дифференцировка не происходит в условиях изоляции клетки. Напротив, дифференцирующаяся клетка находится в окружении действующих на нее паракринных и гормональных стимулов, а также внеклеточного матрикса. Кроме того, процесс дифференцировки является следствием стохастического прохождения тысяч химических реакций и других процессов взаимодействия молекул, вследствие чего подвержен действию статистических законов и биологической вариабельности; свое влияние также оказывает экспрессионный шум – стохастическая экспрессия генов [28].

Сигнальные молекулы, стимулы внешней для клетки среды, а также в некоторых случаях внутренняя программа развития вызывают

дифференцировку стволовой клетки в одном из возможных для нее направлений. Множество эпигенетических перестроек клетки и изменение профиля активности и экспрессии транскрипционных факторов при дифференцировке в совокупности влекут за собой значительное изменение паттерна экспрессии генов. Координация и регуляция сложного многоэтапного процесса дифференцировки осуществляется небольшим набором транскрипционных факторов, часто называемых «мастер-регуляторы» [29]. Мастер-регуляторы выступают в качестве ранних мишеней дифференцировочных стимулов, которые в дальнейшем активируют множество своих генов-мишеней, опосредуя процесс дифференцировки. На сегодняшний день показан целый ряд различных транскрипционных факторов, выступающих в качестве мастер-регуляторов.

Мастер-регуляторы, будучи транскрипционными факторами, регулируются целым рядом сигнальных процессов, приходящих как извне клетки (гормоны, паракринные факторы, внеклеточные везикулы, внеклеточный матрикс), так и внутриклеточными сигналами (клеточный метаболизм, активность других транскрипционных факторов, фаза клеточного цикла). На примере адипогенной дифференцировки в белом жире разберем, как осуществляется запуск этого направления дифференцировки. Мастер-регулятор адипогенной дифференцировки – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR γ). Было показано, что активация одного этого транскрипционного фактора в мышечных фибробластах способна превратить их в жировые клетки, в значительной степени похожие на зрелые адипоциты [30].

На первом этапе направления стволовой клетки в адипогенную дифференцировку происходит процесс детерминации – подавление мультипотентности и коммитирование клетки в этом направлении. Стоит отметить, что на этом этапе, по-видимому, клетка еще сохраняет способность дифференцироваться в один из нескольких фенотипов адипоцитов – белый

накопительный, синтетический или бежевый термогенный фенотип [31]. На этом этапе МСК конвертируется в преадипоцит, который морфологически практически не отличается от самих МСК, но транскрипционные различия уже выявляются [32]. На втором этапе, в фазе терминальной дифференцировки, дифференцирующаяся клетка приобретает характеристики зрелого адипоцита. Во-первых, в ней синтезируется машинерия, необходимая для синтеза и распада запасных липидов, а также для их хранения; в некоторых типах адипоцитов появляется также машинерия для синтеза жирных кислот. Клетки начинают синтезировать сигнальные белки, характерные для адипоцитов – адипокины. В начале адипогенной дифференцировки у преадипоцитов повышается пролиферативная активность, в результате чего увеличивается число клеток. После этого наступает арест клеточного цикла и непосредственно дифференцировка [33].

Ключевую роль в адипогенной дифференцировке играет функциональное взаимодействие между транскрипционными факторами PPAR γ , а также C/EBP α (ССААТ/энхансер-связывающий белок), причем первый играет ключевую роль в индукции адипогенеза [34]. Если мастер-регулятор адипогенной дифференцировки PPAR γ критически необходим для прохождения всей дифференцировочной программы, то без C/EBP α затруднено приобретение клетками финального фенотипа адипоцитов. В частности, адипоциты, полученные в условиях нокаута этого транскрипционного фактора оказываются инсулин-нечувствительными, у них нарушен также инсулин-зависимый транспорт глюкозы в клетку. Кроме того, C/EBP α поддерживает экспрессию PPAR γ в зрелых адипоцитах [35]. Таким образом, PPAR γ и C/EBP α синергически взаимодействуют друг с другом, реализуя адипогенную дифференцировку. Другие транскрипционные факторы группы C/EBP (C/EBP δ , C/EBP β) регулируют экспрессию и активность PPAR γ и C/EBP α , являясь их трансактиваторами и индукторами.

Запуск адипогенной дифференцировки происходит путем активации PPAR γ внешними сигнальными молекулами. Так, инсулин является ключевым индуктором адипогенной дифференцировки преадипоцитов и МСК. Действие инсулина на PPAR γ реализуется через активируемый его рецептором PI3-киназный сигнальный каскад и протеинкиназу Akt, которая, в свою очередь, действует на ряд ядерных мишеней. Akt фосфорилирует и активирует транскрипционные факторы C/EBP и ингибирует мастер-регулятор остеогенной дифференцировки Runx2 [34, 36]. Во-вторых, Akt фосфорилирует и вызывает деградацию транскрипционного фактора FOXO1, который является одним из основных транскрипционных репрессоров PPAR γ (Рис. 1.2) [37]. При запуске адипогенной дифференцировки *in vitro* также используют неселективный конкурентный ингибитор фосфодиэстераз IBMX, который может быть заменен на активатор аденилатциклазы форсколин. Эти химические агенты имитируют действие метаболических гормонов, действующих на клетку через семидоменные рецепторы, ассоциированные с G α_s -тримерным белком, активирующим аденилатциклазу и ведущих к повышению внутриклеточного уровня цАМФ. Последний, совместно с MAP-киназами, запускаемыми инсулиновым рецептором, активируют транскрипционный фактор CREB. Кроме того, повышение внутриклеточного уровня цАМФ ассоциировано также с другими ключевыми событиями адипогенной дифференцировки, такими как супрессия Wnt10b [38] и индукция C/EBP β (ССАТ/enhancer-binding protein β) [39, 40]. Кроме того, цАМФ принимает участие в регуляции PPAR γ [41]. Глюкокортикоидные рецепторы, активируемые дексаметазоном, активируют экспрессию C/EBP δ и PPAR γ [42]. Таким образом, гормональные регуляторы играют ключевую роль в регуляции и направлении стволовой клетки в дифференцировку.

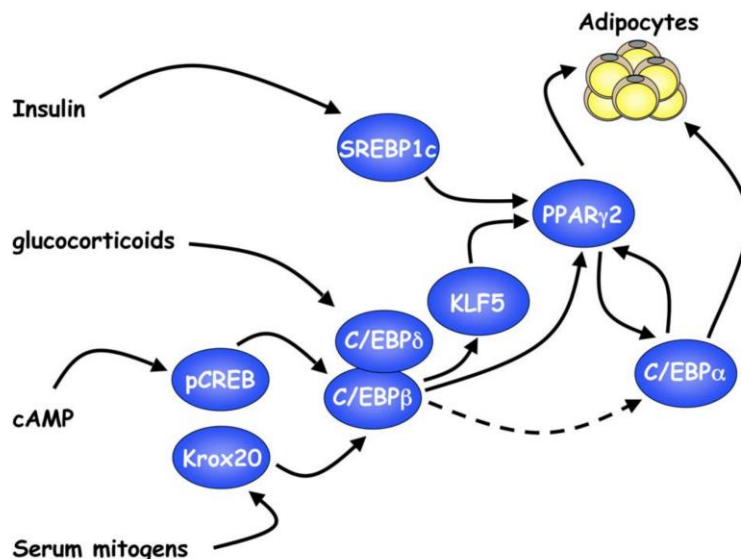


Рис. 1.2. Схема активации транскрипционных факторов в регуляции адипогенной дифференцировки.

В случае дифференцировки мультипотентных стволовых клеток происходит выбор одной из нескольких программ развития. В таком случае, с одной стороны, требуется активация мастер-регулятора, с другой – подавление активности альтернативных путей дифференцировки. Например, для МСК альтернативными являются адипогенная и миогенная, адипогенная и остеогенная дифференцировки [29, 36]. Другие программы дифференцировки, например, хондрогенная и остеогенная, могут запускаться последовательно [43], поэтому между ними нет антагонизма, но есть последовательность активации соответствующих мастер-регуляторов. Механизм функционального антагонизма альтернативных мастер-регуляторов осуществляется либо на уровне взаимного сигнального подавления активности транскрипционных факторов, либо на уровне эпигенетической регуляции. Так, например, альтернативными являются направления миогенной дифференцировки МСК (мастер-регулятор MyoD) и их адипогенной дифференцировки (мастер-регулятор PPAR γ). При их принудительной одновременной стимуляции в популяции МСК одни клетки превращаются в мышечные, другие – в жировые.

Но гибридных клеток, в которых были бы запущены обе программы одновременно, не выявляется. Это связано с тем, что в клетках, в которых запускается адипогенная программа, циклин-зависимые киназы (CDK) вызывают убиквитинилирование и протеасомную деградацию MyoD [29]. В то же время, в клетках, в которых запущена миогенная программа, принудительная экспрессия PPAR γ также не приводит к адипогенной дифференцировке. В данном случае это происходит не за счет деградации альтернативного мастер-регулятора, но за счет ингибирования PPAR γ -зависимого гиперацетилирования гистонов, происходящего на ранних этапах адипогенной дифференцировки [29]. Таким образом, регуляторные сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс могут влиять не только непосредственно на сам процесс коммитирования и дифференцировки стволовых клеток, но и на подавление других направлений специализации для формирования безальтернативности дифференцировочной судьбы стволовой клетки.

1.4. Регуляция дифференцировки стволовых клеток

1.4.1. Общий обзор механизмов регуляции дифференцировки стволовых клеток

Для рассмотрения механизмов коммитирования стволовых клеток в определенный путь дифференцировки вновь обратимся к эмбриогенезу, где реализуются различные механизмы коммитирования стволовых клеток. На одном полюсе спектра механизмов коммитирования располагается автономная спецификация стволовых клеток, когда дифференцировочная судьба клетки закодирована в наборе транскрипционных факторов и эпигенетических детерминант, расположенных внутри этой конкретной клетки. В каких бы условиях ни развивалась клетка, ее дифференцировочная судьба будет одинаковой. Этот механизм в эмбриогенезе встречается достаточно редко, например, у оболочников. На другом полюсе вариантов коммитирования

стволовых клеток располагается механизм условной спецификации, при котором дифференцировочная судьба клетки полностью определяется внешними для клетки условиями: паракринными и гормональными факторами, межклеточными взаимодействиями и механическими сигналами. При этом изменение микроокружения стволовой клетки приводит к изменению ее дифференцировочной программы. В реальности же дифференцировка большинства стволовых клеток определяется соотношением внутренней программы развития и внешними условиями [7, 44].

Еще несколько понятий эмбриологии помогут лучше понимать механизмы регуляции дифференцировки постнатальных стволовых клеток. Внеклеточные химические и физические сигналы, действующие на стволовую клетку, влияют на ее функционирование, могут поддерживать в неактивном состоянии или же активировать ее с последующим коммитированием в одном из дифференцировочных направлений. В то же время, в организме существуют пулы тканеспецифичных стволовых клеток. Так, например, эпидермальная стволовая клетка в норме не превратится в миофибробласт. Индукция – процесс, когда одна клетка регулирует дифференцировку другой посредством паракринных факторов. В паре с этим понятием идет компетенция – способность клетки, принимающей сигналы, воспринять этот сигнал. В простейшем случае это происходит через наличие рецептора к сигналу индуктора на поверхности клетки. Более сложная история, когда рецептор есть, но клетка его не чувствует, потому что в ней не сопряжены сигнальные каскады с этим рецептором. Индуктивные регуляторные сигналы могут носить инструктивный или пермиссивный характер. При инструктивном характере управляющего сигнала паракринный или гормональный сигнал строго необходим для определения направления процесса, без него стволовая клетка не вступит на соответствующий путь дифференцировки [45, 46]. Пермиссивные сигналы не определяют направление дифференцировки стволовой клетки, но делают ее более эффективной или в принципе возможной [47]. Например,

многие направления дифференцировки требуют наличие определенной структуры внеклеточного матрикса, но при этом сам внеклеточный матрикс не управляет дифференцировкой. Перmissive сигнал позволяет проявить либо заранее детерминированные свойства стволовой клетки, либо позволяет реализоваться инструктивному сигналу [7, 48]).

1.4.2. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток

В процессе дифференцировки стволовых клеток происходит существенное, но закономерное изменение их метаболизма. Несколько загроуляя, общей тенденцией изменения метаболизма в процессе дифференцировки стволовых клеток можно назвать переход от гликолиза как основного источника АТФ к окислительному фосфорилированию (Рис. 1.3).

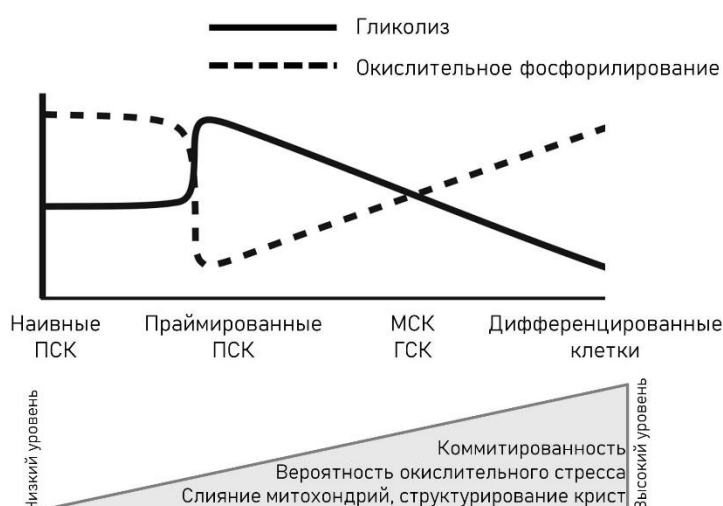


Рис. 1.3. Схематическое изображение закономерностей изменения уровня гликолиза и окислительного фосфорилирования при дифференцировке клеток из плюрипотентного состояния в дифференцированные клетки.

На самых ранних стадиях развития эмбриона до имплантации в эндометрий клетки эмбриона (этапы зигота, морула и ранняя бластоциста) синтезируют АТФ, в основном, за счет потребления питательных веществ из окружающей

для них среды (жидкости полости матки). Основными питательными веществами, потребляемыми ими на этом этапе, являются лактат, пируват, аминокислоты и жирные кислоты. Тотипотентные клетки, составляющие на начальных этапах развития эмбрион, имеют достаточный доступ к кислороду. В связи с вышеописанным, окислительное фосфорилирование в этих клетках играет важную роль в качестве катаболического пути синтеза АТФ [13, 49]. После имплантации до развития плаценты эмбрион попадает в гипоксические условия из-за того, что он теряет прямой контакт с жидкостью полости матки, а кровеносные сосуды плаценты еще не сформировались. Клетки эмбриона при этом переходят на анаэробный метаболизм [50]. В целом, несмотря на разницу в доступности кислорода и вкладе окислительного фосфорилирования в катаболизм, у клеток эмбриона, как до имплантации, так и после нее, гликолитический путь является ключевым путем получения энергии. Плюрипотентные клетки по сравнению с дифференцированными клетками проявляют сниженное количество митохондрий, их слабое развитие, а также сниженный митохондриальный потенциал [51]. По мере развития плаценты доступ кислорода к тканям эмбриона становится достаточным для аэробного дыхания. Клетки развивающегося организма по мере перехода от плюрипотентности к мультипотентности и по мере дальнейшей дифференцировки переходят все в большей степени к окислительному фосфорилированию как основному источнику АТФ. Во взрослом организме постнатальные стволовые клетки могут иметь различающийся доступ к кислороду и питательным веществам из-за их расположения в особом микроокружении в тканях, называемых «нишами» стволовых клеток. Доступность кислорода и питательных веществ в нишах различных постнатальных стволовых клеток может варьировать в широких пределах. Однако, в целом, в большинстве вариантов ниш стволовых клеток доступ кислорода и питательных веществ ограничен [52, 53]. Достаточно общей чертой постнатальных стволовых клеток является высокая роль гликолитического пути синтеза АТФ. Таким образом, дифференцировка стволовых клеток имеет

ряд закономерных тенденций, в частности в изменении клеточного метаболизма, и подвержена регуляции как внеклеточными стимулами, так и внутриклеточными.

1.4.3. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции дифференцировки стволовых клеток

Описанные выше закономерные изменения метаболизма стволовых клеток долгое время рассматривались как пассивный ответ клеточных метаболических систем на изменяющиеся условия функционирования стволовых клеток. Позже стало понятно, что метаболические ферменты и ключевые участники метаболических путей, такие как НАДН или ацетил-КоА, сами по себе играют ключевую роль в регуляции стволовости (поддержания клеток в стволовом состоянии), самообновления и дифференцировки стволовых клеток [54]. Регуляция дифференцировки (и, в некоторых случаях, дедифференцировки) стволовых клеток с участием интермедиатов метаболических процессов может осуществляться посредством нескольких специфических механизмов:

1) Активация определенных транскрипционных факторов при изменении внутриклеточного уровня метаболитов. Например, при накоплении в клетке жирных кислот снижается уровень активности транскрипционного фактора SREBP [55]. Накопление жирных кислот может осуществляться при усилении в клетке преимущественно гликолитического пути получения энергии. SREBP при этом является важным регулятором адипогенной дифференцировки МСК [56].

2) Некоторые ферменты-участники метаболических процессов сами могут выступать в роли транскрипционных факторов. Например, гликолитический фермент глицеральдегид-фосфат дегидрогеназа (ГАФД) участвует в сборке транскрипционного комплекса. Этот комплекс регулирует транскрипцию гена гистона H2B во время синтетической фазы клеточного цикла. Сборка этого

комплекса ингибируется НАДН и усиливается при увеличенном уровне НАД⁺ [57].

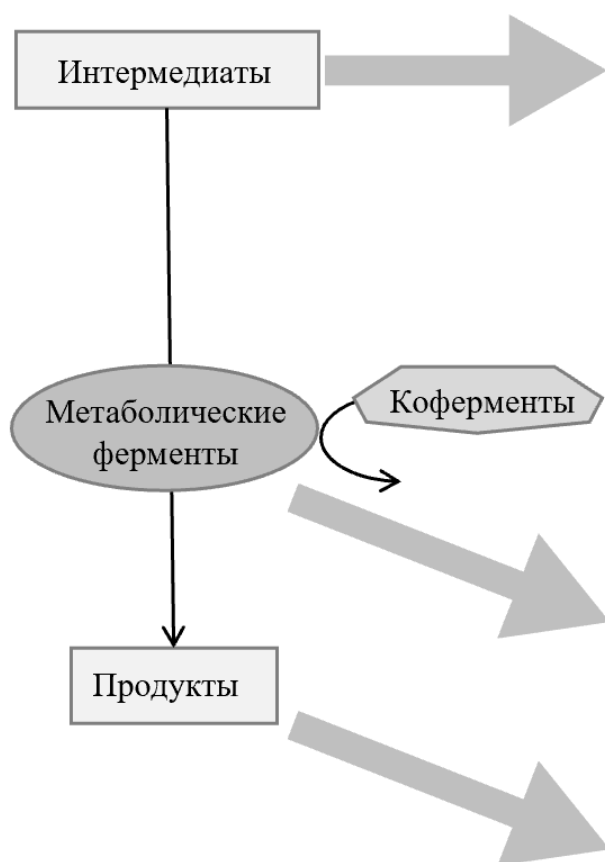
3) Большинство ферментов, производящих ремоделирование хроматина, а также транскрипцию, используют для своей работы метаболические субстраты Ацетил-КоА, АТФ, НАДН и др. Эти соединения, помимо их непосредственной роли в переносе энергии макроэргических связей, восстановительных эквивалентов и ацетильных групп, могут рассматриваться в роли своеобразных метаболических сигнальных молекул, сопрягающих транскрипционную клеточную программу с активацией основных метаболических путей.

Эпигенетическая регуляция стволовых клеток, связанная с метаболизмом, прямо влияет на эффективность и путь дифференцировки (Рис. 1.4). Так, ацетилирование гистонов коррелирует с уровнем гликолиза. Пируват превращается в Ацетил-КоА, который в виде цитрата выходит из матрикса митохондрий, попадает в ядро, где обратно разделяется на Ацетил-КоА и щавелево-уксусную кислоту. Ацетил-КоА является донором ацетильной группы для ацетилаз гистонов [13]. Стоит отметить, что при недостаточном уровне глюкозы, когда основным источником Ацетил-КоА для цикла Кребса являются молекулы жирных кислот, ацетилирования гистонов не происходит [58]. На первый взгляд, это может показаться нелогичным, поскольку при этом в митохондриях так же образуется цитрат, а группы Ацетил-КоА одинаковы независимо от первоисточника их образования. Этот факт можно объяснить тем, что щавелево-уксусная кислота из ядра после высвобождения Ацетил-КоА, вероятно, не возвращается назад в митохондрии. В этом случае, получается, что количество интермедиатов цикла Кребса снижается. В том же случае, если в клетку поступает глюкоза, потерянные молекулы оксалоацетата могут восполняться при помощи анаплеротических реакций пируват-карбоксилазы. При этом в результате карбоксилирования пирувата образуется оксалоацетат. Когда же источником Ацетил-КоА являются жирные кислоты, для пируват-карбоксилазы нет субстрата, цитрат не выходит из митохондрий.

Другим примером эпигенетических модификаций, связанных с метаболизмом стволовых клеток, является деацетилирование гистонов (Рис. 1.4). Оно осуществляется группой ферментов гистон-деацетилаз. Гистон-деацетилазы III класса, сиртуины, используют НАД⁺ в реакции деацетилирования гистонов. Их ферментативная активность зависит от уровня НАД⁺ в ядре, который коррелирует с цитоплазматическим уровнем. При этом сиртуины рассматриваются как внутриклеточные сенсоры, регистрирующие значение потенциала НАД⁺/НАДН в клетке. Изменения в приоритетных путях получения энергии между гликолизом и окислительным фосфорилированием приводит также и к изменению значения потенциала НАД⁺/НАДН. Чем больше интенсивность гликолиза, тем больше в цитоплазме содержится НАДН и меньше – НАД⁺. Увеличение уровня НАД⁺ в цитоплазме при повышении активности окислительного фосфорилирования регистрируется сиртуинами и конвертируется в деацетилирование гистонов и негистоновых белков [13, 59, 60].

Таким образом, метаболические процессы, протекающие в конкретной стволовой клетке, а также доступность глюкозы и кислорода для дыхания могут влиять на эпигенетические процессы регуляции активности генов, как поддерживающих клетку в состоянии стволовости, так и направляющих ее в дифференцировку.

Схематическое изображение
метаболического пути:



Примеры метаболической регуляции
клеточных функций:

* Замедление ЦТК → цитрат в цитоплазме
→ АцКоА в ядре →
ацетилирование гистонов

* α -КГ ↑ → деметилирование
гистонов и ДНК

$\frac{\text{НАД}^+}{\text{НАДН}} \uparrow \rightarrow$ деацетилирование
гистонов

ГАФД – участник транскрипционного
комплекса в S-фазе клеточного цикла

Жирные кислоты ↑ →
транскрипционный фактор SREBP ↓

Рис. 1.4. Участники метаболического пути получения энергии из глюкозы и жирных кислот регулируют активность генов на эпигенетическом и транскрипционном уровнях. Сокращения: α КГ – альфа-кетоглутарат, АцКоА – ацетил-кофермент А, ГАФД – D-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

1.4.4. Внутриклеточные механизмы, регулирующие дифференцировку стволовых клеток, но не затрагивающие напрямую процессы в ядре

Как было сказано выше, стволовые клетки, обладающие различным дифференцировочным потенциалом, проявляют значительно различающиеся преимущественные пути получения энергии и синтеза необходимых соединений. Участники метаболических путей не только регулируют

генетические и эпигенетические механизмы дифференцировки стволовых клеток, но и управляют ключевыми цитоплазматическими процессами.

В ряде случаев показано, что изменение баланса внутриклеточных метаболических путей извне может приводить к появлению у клеток стволового фенотипа. Например, при ангиогенезе мигрирующий эндотелий формирует два типа клеток: вершущую клетку, которая определяет направление прорастания капилляра, и остальные клетки “ствола” прорастающего сосуда, которые формируют его стенки. При этом поддержание этих фенотипов детерминируется метаболическими путями, преобладающими в конкретной клетке. Вершущая клетка использует в основном гликолиз в качестве главного источника энергии. Клетки же ствола получают энергию, в основном, за счёт окислительного фосфорилирования. При этом, если экспериментально повысить активность гликолиза в клетках ствола, то происходит их видоизменение в вершущие клетки. При этом образуются новые точки ветвления капилляров [61]. Таким образом, скорость и преобладающий источник продукции АТФ и других метаболитов оказывает большое влияние на процессы дифференцировки и трансдифференцировки клеток.

На дифференцировочный потенциал плюрипотентных стволовых клеток также оказывает влияние величина электрохимического трансмембранного потенциала митохондрий. Для демонстрации этого мышинные эмбриональные стволовые клетки культивировали в такой среде, в которой клетки находятся в метастабильном состоянии (среда, содержащая LIF, но без ингибиторов сигнальных путей MAPK и Gsk3, которые переводят наивные мышинные эмбриональные стволовые клетки в праймированное состояние). В этих условиях плюрипотентные стволовые клетки проявляют гетерогенность не только по функциональному состоянию, но и по электрохимическому трансмембранному потенциалу митохондрий. При помощи клеточного сортера эти клетки разделили на группы клеток с низким и высоким потенциалом митохондрий. Клетки этих групп не отличаются ни фенотипически, ни по

экспрессии маркеров плюрипотентности, однако различаются функционально. Клетки с высоким электрохимическим трансмембранным потенциалом митохондрий имеют значительно увеличенный уровень метаболизма, так как они больше потребляют кислород и продуцируют лактат. Это свидетельствует об увеличенном уровне гликолиза, и дыхания. Клетки этой группы плохо вступают в мезодермальную дифференцировку, однако при трансплантации *in vivo* способны к образованию тератом, в которых выявляются клетки всех трех зародышевых листков. Клетки с пониженным электрохимическим трансмембранным потенциалом митохондрий эффективно вступают в мезодермальную дифференцировку [62]. Таким образом, можно предположить, что клетки, характеризующиеся высоким электрохимическим трансмембранным потенциалом митохондрий, поддерживаются в состоянии наивных эмбриональных стволовых клеток. При этом клетки с низким потенциалом митохондрий приближены к состоянию праймированных эмбриональных стволовых клеток. Однако стоит отметить, что эти наблюдения носили корреляционный характер. Причинно-следственные связи между мембранным потенциалом и дифференцировочным статусом стволовых клеток были показаны в другом исследовании, где показали, что искусственное воздействие на трансмембранный электрохимический потенциал митохондрий изменяет дифференцировочные характеристики стволовых клеток. Если культивировать эмбриональные стволовые клетки в среде, содержащей митохондриальный разобщитель CCCP, уровень пролиферации стволовых клеток падает, а экспрессия ключевых маркеров и регуляторов плюрипотентности, транскрипционных факторов Nanog, Oct4 и Sox2 возрастает. Этому процессу сопутствует снижение интенсивности дыхания и повышение анаэробного гликолиза, регистрируемого по продукции лактата [63]. Если направить мышинные эмбриональные стволовые клетки в дифференцировку в присутствии разобщителя CCCP, то в популяции сохраняются плюрипотентные клетки, способные к образованию тератом. Подсадка дифференцированных эмбриональных стволовых клеток,

предварительно обработанных СССР, приводила к тому, что существенно выросла частота образования тератом по сравнению с клетками, которые не обрабатывались этим химическим агентом [63].

Таким образом, уровень метаболизма, ключевые метаболические пути, служащие для получения стволовой клеткой энергии и даже величина электрохимического трансмембранного потенциала митохондрий оказывают заметное влияние как на дифференцировочный потенциал стволовых клеток, так и на выбор ими направления дифференцировки при поступлении дифференцировочного сигнала.

1.4.5. Сигнальная регуляция дифференцировки стволовых клеток

Сообщество огромного количества различных специализированных клеток, составляющих организм, требует постоянного информационного сообщения между клетками для интеграции происходящих процессов. В этом свете становится понятным, почему химические переносчики информации – внеклеточные сигнальные молекулы – играют ключевую роль в регуляции функциональной активности стволовых клеток взрослого организма.

В условиях организма на стволовые клетки постоянно действует большое число регуляторных факторов, гормонов и нейромедиаторов. Сложно представить, чтобы действия одного какого-то фактора было достаточно, чтобы активировать стволовую клетку и направить ее в дифференцировку. Если бы это было так, то можно было бы ожидать, что при каждом повышении концентрации гормона-регулятора все или большая часть стволовых клеток рекрутировались бы в дифференцировку, и пул стволовых клеток иссяк бы уже на ранних стадиях развития организма. Поскольку этого не происходит, можно предположить существование более сложных сигнальных механизмов регуляции функциональной активности стволовых клеток. Например, для запуска различных направлений дифференцировки постнатальных стволовых клеток МСК *in vitro* используют всего несколько гормонов, применяемых в

различных комбинациях. Например, для направления МСК в адипогенную дифференцировку клетки недостаточно обработать только гормоном-индуктором адипогенеза инсулином, но необходимо также обработать клетки глюкокортикоидами (дексаметазон) и потенцировать цАМФ-зависимую сигнализацию путем добавления изобутилметилксантина (IBMX) или форсколина. В комплексе с цАМФ-активирующими агентами дексаметазон открывает сайты посадки цАМФ-зависимых транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, запускают экспрессию генов адипогенеза [64]. Для остеогенной дифференцировки МСК используется тот же дексаметазон, но в сочетании с необходимой для созревания коллагена аскорбиновой кислотой и 2-глицерофосфатом как источником фосфата для формирования кальций-фосфатных минеральных отложений [65]. Дексаметазон, действуя сам по себе, активирует сигнальный путь, ассоциированный с WNT/ β -катенином, который, в свою очередь, активирует мастер-ген остеогенной дифференцировки Runx2. Хондрогенная дифференцировка МСК запускается сигнальным фактором TGF β в ассоциации все с тем же дексаметазоном, причем сам по себе TGF β направляет МСК в миофибробласт-подобный фенотип [66]. Заметим, что активируемый дексаметазоном в МСК WNT-зависимый сигнальный путь ингибирует адипогенную дифференцировку, но в комбинации с другими сигнальными молекулами этот глюкокортикоид работает в обратном направлении [67]. Таким образом, МСК не направляются в тот или иной тип дифференцировки за счет действия какого-то одного конкретного гормона или фактора роста, но для выбора клеткой направления дифференцировки требуется комплексный гормональный сигнал.

1.4.6. Влияние внеклеточного матрикса на дифференцировку стволовых клеток

ВКМ является ключевым компонентом локального микроокружения стволовой клетки. ВКМ представляет собой мультифункциональную трехмерную сеть внеклеточных фибриллярных белков (коллаген, эластин,

тенаascin, фибронектин и ряд других), помещенную в ячеистый гель, образованный нефибриллярными коллагенами, ламининами, перлеканом, бигликаном, агрином и другими протеогликанами [68]. ВКМ распределен по всему организму и осуществляет структурную и биохимическую поддержку клеток практически во всех тканях организма. В разных тканях состав и структура ВКМ может существенно различаться, но, в целом, различные типы ВКМ млекопитающих можно разделить на два типа. Первый – интерстициальный матрикс, окружающий клетки мезенхимного типа, состоит преимущественно из фибриллярных белков [69]. Второй тип ВКМ – базальная мембрана. Она представляет собой очень плотный гель, состоящий в основном из нефибриллярных белков [70].

ВКМ регулирует множество клеточных ответов, начиная от динамических, таких как миграция и морфогенез, заканчивая определением дифференцировочной судьбы стволовой клетки [48]. ВКМ регулирует дифференцировку стволовых клеток посредством нескольких механизмов. Во-первых, это прямые контакты клеток с белками ВКМ через специализированные рецепторы, например, интегрины, которые запускают внутриклеточные сигнальные каскады. Во-вторых, это механические воздействия на клетки, которые воспринимаются и интерпретируются через группу специализированных механорецепторов. В-третьих, ВКМ разграничивает пространство размещения стволовых клеток на микроанатомические компартменты. Это позволяет создавать различающийся паракринный фон у близлежащих клеток и управлять доступностью сигнальных молекул для стволовых клеток [71]. И, наконец, в ВКМ заякориваются факторы роста, морфогены и внеклеточные везикулы, которые могут высвобождаться при перестройках ВКМ. Это делает ВКМ значимым резервуаром сигнальных молекул клетки.

Белки ВКМ начинают экспрессироваться на самых ранних стадиях развития эмбриона. Например, гены ламининов экспрессируются уже на двухклеточной

стадии развития эмбриона [72]. 16 различных комбинаций α -, β - и γ -субъединиц ламининов специфически экспрессируются в различных частях эмбриона и подвержены пространственно-временной регуляции на протяжении его развития. Для выделенных в культуру плюрипотентных стволовых клеток ламинины критически необходимы для клонального роста, самообновления этих клеток, а также блокирует апоптоз [73]. Ряд ламининов играют также значимую роль в поддержании постнатальных стволовых клеток. Например, для стволовых клеток волосяного фолликула показано, что изменение состава внеклеточных ламининов, окружающих покоящуюся стволовую клетку, приводит к ее активации и вступлению в дифференцировку. Это происходит при участии связанных с ВКМ интегринов, которые активируют интегрин-зависимую киназу (Integrin-linked kinase, ILK). ILK подавляет TGF β 2 и WNT- β -катенин-зависимые сигнальные пути, ведущие, в свою очередь, к активации стволовой клетки. Изменение состава ВКМ приводит к снижению активности ILK и, следовательно, к активации стволовой клетки. Что интересно, в этой модели и сами стволовые клетки влияют на состав ВКМ. Так, в случае нокаута ILK состав ламининов существенно меняется в сторону паттерна, активирующего стволовые клетки [74]. Таким образом, приведенный пример показывает, что взаимодействие стволовых клеток с ВКМ носит обоюдный характер, когда стволовые клетки в зависимости от своего состояния синтезируют ВКМ различного состава. Последний, в свою очередь, влияет на функциональную активность самих стволовых клеток.

Стволовые клетки обладают выраженной механочувствительностью. Для этой цели они экспрессируют механорецепторы, стабильно ассоциированные с ВКМ и регистрирующие механические изменения матрикса. Например, семидоменные рецепторы клеточной адгезии содержат длинный внеклеточный N-концевой фрагмент, нековалентно связанный с рецептором. Этот фрагмент содержит аминокислотные мотивы, связывающие белки ВКМ. Приложение механического воздействия к ткани приводит к тому, что этот фрагмент

открепляется от своего рецептора. Это приводит к активации сигнализации рецептора. Таким образом, N-концевой фрагмент выступает в роли обратного агониста рецептора, активируя рецептор не связыванием, а откреплением от него. Например, рецептор GPR116 регулирует адипогенную дифференцировку постнатальных стволовых клеток по вышеописанному механизму, обладая перmissiveм действием [75].

Еще одной очень важной ролью ВКМ в управлении функционированием стволовой клеткой является возможность закоривания на нем сигнальных молекул вследствие гликозилирования белков ВКМ [76]. ВКМ регулярно подвергается ремоделированию, при котором матриксные металлопротеиназы расщепляют ряд белков ВКМ, а стромальные клетки синтезируют новые белки стромы. При расщеплении стромальных белков высвобождаются связанные с ними сигнальные молекулы и внеклеточные везикулы, которые при этом получают возможность подействовать на стволовую клетку. Отчасти этим может объясняться тканеспецифичность действия децеллюляризованного ВКМ при заселении его стволовыми клетками.

Таким образом, ВКМ, взаимодействуя со стволовыми клетками, активно влияет на их функциональную активность. При этом и сами стволовые клетки в определенной степени управляют составом окружающих их матриксных белков. ВКМ выступает в роли значимого и, что важно, активного компонента локального микроокружения стволовых клеток, которое именуют нишей стволовой клетки.

1.5. Ниша стволовой клетки

Особенностью стволовых клеток является то, что в организме они располагаются в т.н. клеточной нише. Этот термин описывает особое динамичное микроокружение, необходимое для поддержания жизнеспособности стволовой клетки, а также регуляции её активности в зависимости от потребностей организма [53, 77, 78]. При этом зачастую ниша

стволовой клетки не является какой-то строго отделенной анатомически структурой. Ниша стволовой клетки иногда представляет собой «тканевое микроокружение как континуум условий в строме, в котором при различных сочетаниях факторов появляются гибкие условия для поддержания клеток на разных стадиях дифференцировки и (большую часть времени) в состоянии покоящейся стволовой клетки» [53]. Выход стволовой клетки из ниши не обязательно связан с миграцией клетки в другой компартмент, но может быть следствием изменения спектра действующих факторов или же изменения восприятия стволовой клеткой приходящих на нее сигналов. Регуляция стволовой клетки может осуществляться либо при помощи изменения ее чувствительности к различным гормональным сигналам, либо их доступности для стволовой клетки. Кроме того, компоненты ниши стволовых клеток могут ограничивать доступ кислорода и/или питательных веществ к стволовой клетке. Все это в конечном счете определяет выбор между поддержанием стволовой клетки в состоянии покоя, запуском пролиферации, покиданием ниши и инициацией дифференцировки.

Ниша включает в себя целый ряд факторов микроокружения, которые влияют на функционирование стволовой клетки. В первую очередь, ниша включает в себя клетки, взаимодействующие со стволовой. Их часто называют поддерживающие клетки ниши. Набор клеток, входящих в состав ниши, может достаточно широко варьировать в зависимости от типа ниши и ткани или органа, в которой она локализуется. Подавляющее большинство ниш взрослого организма (в первую очередь, речь идет о млекопитающих) включает в себя клетки мезенхимного происхождения. Это либо мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), либо их производные, такие как остеобласты. МСК могут непосредственно взаимодействовать с тканеспецифичной стволовой клеткой, передавая регуляторные сигналы через гомофильные или гетерофильные взаимодействия с использованием, в

частности, кадгеринов [79-81]. Межклеточные контакты также играют роль в физическом удержании стволовой клетки в нише.

МСК активно секретируют паракринные регуляторные факторы и внеклеточные везикулы, создающие специфический сигнальный фон для стволовой клетки [82, 83]. Среди большого спектра паракринных факторов, действующих в нише стволовой клетки, наиболее типичными являются сигнальные системы групп факторов WNT и BMP. Что интересно, действие сигнальных молекул в нише носит контекст-зависимый характер и может различаться в зависимости от того, к какой именно стволовой клетке эти стимулы приложены. Например, BMP4 подавляет самообновление стволовых клеток, находящихся в нише эпителия кишечника, но при этом поддерживает самообновление гематопоетических стволовых клеток [84, 85]. Сигнальные пути, активируемые WNT, индуцируют самообновление и пролиферацию стволовых клеток эпителия кишечника, а в нейтральных стволовых клетках – наоборот, запускают дифференцировку [86, 87]. Внеклеточные везикулы, секретиромые стромальными клетками ниши, способны нести в себе не только сигнальные молекулы, но и функционирующие белки, мРНК белков, которые могут передавать клетке-реципиенту функцию без активации соответствующего гена [88]. Кроме того, внеклеточные везикулы содержат микроРНК, регулирующие трансляцию в клетках-мишенях [89, 90]. Таким образом, сигнальные молекулы и внеклеточные везикулы, секретиромые клетками стромы ниши, активно регулируют функциональную активность стволовых клеток.

Кроме этого, МСК ремоделируют ВКМ и базальную мембрану, критическая значимость которых для функциональной активности стволовой клетки рассматривалась в предыдущем разделе. Для этого МСК продуцируют стромальные белки и матриксные металлопротеиназы [91]. Стоит отметить также, что не просто структура ВКМ играет важную роль в регуляции стволовых клеток в нише, но и то, по каким направлениям и с какой силой

прикладываются на стволовую клетку механические напряжения. Например, для сателлитных клеток скелетной мышечной ткани важную роль играет эластичность субстрата, а также модуль и вектор приложения механического напряжения [92].

Ключевая роль ниши стволовой клетки в поддержания стволовости замечательно показана в ряде экспериментов по избирательному удалению стволовых клеток из ниши. Опустошенные ниши заселялись коммитированными в дифференцировку клетками, которые при попадании в нишу дедифференцировались и превращались в стволовые [93].

Гематopoэтические стволовые клетки (ГСК) наравне с базальными клетками эпителия и эпидермиса являются наиболее активными тканеспецифичными постнатальными стволовыми клетками. В нише костного мозга доступность кислорода ограничена, ГСК постоянно находятся в гипоксических условиях. Гипоксия приводит к активации экспрессии HIF-1 α , а также к тому, что основным энергетическим метаболическим путем у них является анаэробный гликолиз [94]. В регуляции функциональной активности ГСК ключевую роль играет доступность кислорода. В костном мозге выявляют два типа ниш ГСК: эндостальную и периваскулярную (Рис. 1.5). Эндостальная ниша располагается близко к костной ткани, в ней наименьший уровень кислорода. В качестве важного клеточного компонента эндостальной ниши выступает субпопуляция остеобластов, выстилающих поверхность эндоста и несущих на своей поверхности N-кадгерин [81]. Периваскулярная ниша располагается рядом с сосудами, уровень кислорода в ней достаточно высокий. В этой нише ГСК взаимодействуют с МСК и макрофагами, являющимися основными клеточными компонентами периваскулярной ниши ГСК. В эндостальной и периваскулярной нишах располагаются разные по пролиферативному потенциалу и дифференцировочным свойствам ГСК. В эндостальной нише находятся покоящиеся ГСК. Они медленно делятся, характеризуются высоким уровнем HIF-1 α и преобладающим анаэробным гликолизом. При переходе ГСК

в периваскулярную нишу уровень HIF-1 α снижается, клетки быстрее пролиферируют и дифференцируются. Выделяют 3 типа деления ГСК. Покоящиеся ГСК в эндостальной нише делятся крайне редко. При этом деление, если оно происходит, обычно симметричное, на выходе образуются две стволовые клетки. В этой нише клетки преимущественно самообновляются. ГСК, попадающие в периваскулярную нишу, делятся одним из двух вариантов. Первый вариант – асимметричное деление с образованием одной стволовой клетки и одной коммитированной в дифференцировку. Вторым вариантом – симметричное деление, но, в отличие от эндостальной ниши, на выходе образуются две коммитированные в дифференцировку клетки. Выбор между двумя последними типами деления ГСК зависит, в частности, от энергетического метаболизма делящихся клеток [16]. Если в ГСК активен путь β -окисления жирных кислот, то стволовые клетки подвергаются асимметричному делению с поддержанием самообновления и возвратом одной из дочерних клеток в состояние стволовости в эндостальной нише. Если же этот метаболический путь подавлен физиологическими стимулами (либо ингибирован фармакологически), то стволовая клетка делится симметрично на две коммитированные в дифференцировку клетки [95]. Коммитированные и направленные в дифференцировку ГСК используют для получения энергии окислительное фосфорилирование, и делятся с образованием только более дифференцированных клеток. Любые воздействия, активирующие окислительное фосфорилирование, в покоящихся ГСК приводят к коммитированию и дифференцировке клеток [16]. Таким образом, локальное микроокружение, составляющее нишу ГСК, влияет на протекающие в них процессы самообновления и дифференцировки.

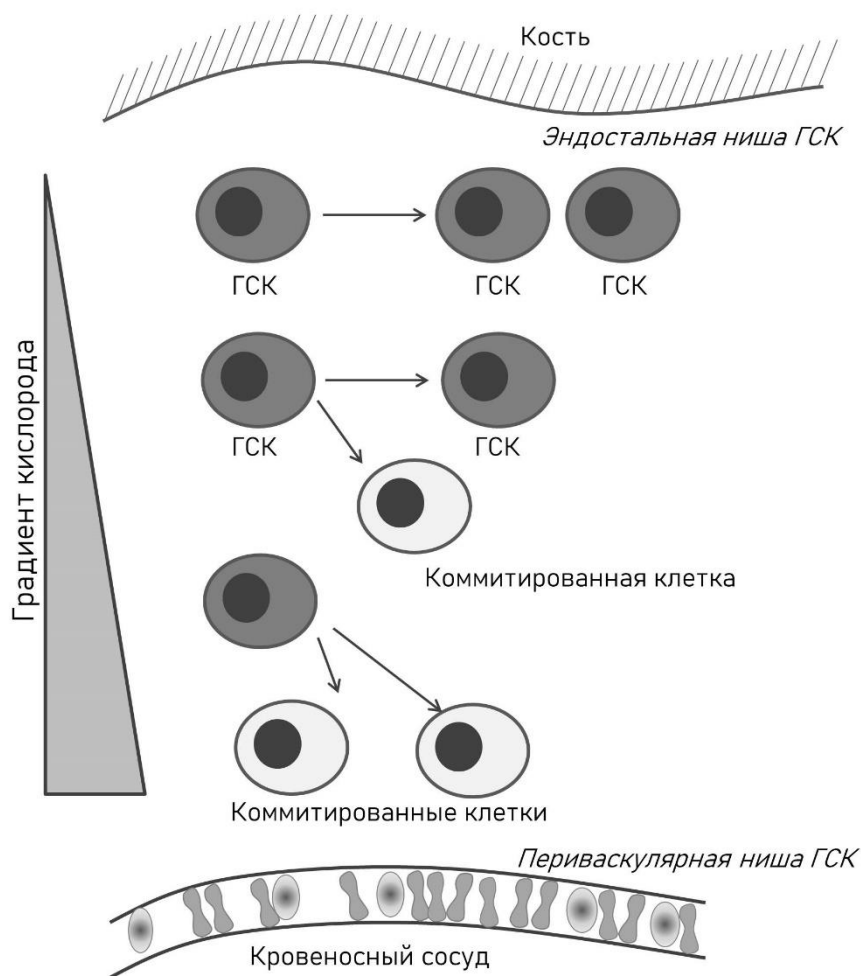


Рис. 1.5. Дифференцировочная судьба гематopoэтической стволовой клетки (ГСК) зависит от доступности кислорода.

Стволовая клетка в нише часто не обладает сигнальной и регуляторной автономностью, ее способность самостоятельно реагировать на сигналы, приходящие из организма, ограничена [96]. Важную роль в нише стволовой клетки играют процессы межклеточной передачи информации, определяющие сопряжение стволовой клетки с расположенными поблизости регуляторными клетками. Задачей регуляторных клеток является первичное восприятие системных сигналов организма и их передача стволовым клеткам, расположенным в нише. Таким образом обеспечивается синхронизация функциональных ответов и тонкая регуляция гормональной чувствительности

покоящихся стволовых клеток. Подобный механизм регуляции хорошо виден на примере взаимодействия МСК и ГСК в нише костного мозга. Симпатическая нервная система играет ключевую роль в регуляции активности ГСК, реализуя свои функции, в основном, через β 3-адренорецепторы. Однако ГСК не иннервируются напрямую симпатическими нервными волокнами. В костном мозге симпатические нервные волокна ассоциированы с сосудами и с периваскулярными МСК, образуя т.н. нейро-ретикулярный комплекс [83]. Симпатические нейроны образуют множественные варикозы, из которых могут высвобождаться нейромедиаторы в непосредственной близости от периваскулярных МСК [97]. В этой системе сигналы от симпатических нейронов действуют на специализированные рецепторные МСК, которые транслируют этот сигнал тканеспецифичным стволовым клеткам, регулируя их активацию и чувствительность к гормональным сигналам. В костном мозге регуляторные МСК могут быть детектированы по экспрессии в них белка промежуточных филаментов нейрональных предшественников нестина. В случае специфической деплеции нестин-экспрессирующих МСК вся симпатическая регуляция костного мозга исчезает [83]. Таким образом, регуляторные клетки ниши стволовой клетки выступают сигнальными посредниками между системно и паракринно действующими стимулами и покоящейся стволовой клеткой в нише. Регуляторная и посредническая функция клеток, составляющих нишу стволовой клетки, а также взаимодействие клеток, обладающих различающейся функциональной активностью, обеспечивает баланс между процессами активации стволовой клетки и долговременным сохранением ее в нативном состоянии, необходимом для поддержания регенеративного потенциала ткани.

1.6. Функциональная гетерогенность стволовых клеток

Регуляция функциональной активности стволовых клеток крайне важна для их скоординированного действия в процессах репарации и регенерации ткани и поддержания ее гомеостаза. Большое разнообразие механизмов и форм

регуляции гормональной чувствительности стволовых клеток обеспечивает гармоничное взаимодействие между организмом, тканью и самими стволовыми клетками, тонко подстраивая их функционирование под динамически изменяющиеся потребности ткани. Необходимость поддержания функциональной гетерогенности пула стволовых клеток диктуется особенностями их функционирования - необходимостью поддерживать некоторое количество стволовых клеток в недифференцированном состоянии в качестве регенеративного резерва жировой ткани.

1.6.1. Варианты проявления функциональной гетерогенности стволовых клеток

Классически считалось, что ГСК представляют собой в высокой степени гомогенную популяцию стволовых клеток, функциональное состояние которых определяется ее нишей и рядом внешних факторов, определяемых нишей. Однако в ряде работ по получению клонов-потомков одиночных ГСК, а также в экспериментах по пересадке одиночных ГСК в организм-реципиент было продемонстрировано, что единичные стволовые клетки отличаются по своей склонности к дифференцировке в лимфоидном и миелоидном направлениях [98, 99]. Эти подтипы ГСК различаются также по ряду фенотипических признаков. В них по-разному экспрессируются ДНК-метилтрансферазы [100], а также ряд поверхностных маркеров: CD150, CD41, $\alpha 2$ -интегрин. Подтипы ГСК различаются по своей чувствительности к TGF β , по пропорции клеток, находящихся в покоем состоянии [101]. Стоит отметить, что наблюдаемые фенотипические различия не являются строгой специализацией или коммитированием ГСК, поскольку клетки, потомки которых преимущественно дифференцируются в миелоидном направлении, могут давать лимфоидных потомков и наоборот. При этом в норме *in vivo* ГСК проявляют достаточно низкую пластичность: трейсинг потомков одиночных клеток в организме показал, что склонность к выбору определенного направления дифференцировки поддерживается среди потомков отдельных клеток, а также

при серии трансплантаций их потомков [102]. При этом, в случае помещения ГСК в нехарактерные условия, например, когда после полного удаления ГСК производится трансплантация единственной клетки, она ведет себя как полноценная мультипотентная стволовая клетка. В такой ситуации трансплантированная ГСК дает все возможные направления дифференцировки несмотря на склонность к определенному направлению дифференцировки, которую она проявляла, будучи в составе гетерогенной популяции костного мозга [103]. Из этого можно сделать предположение, что в составе целостной ткани ГСК проявляют функциональную гетерогенность, которая проявляется в виде некоей обратимой специализации, которая, по-видимому, еще не является коммитированием стволовой клетки, поскольку легко обратима. Таким образом, в составе костного мозга ГСК проявляют свойства мультипотентности в качестве сообщества клеток с неким распределением ролей в виде повышенной склонности к дифференцировке по тому или иному конкретному пути. При этом индивидуальные клетки сохраняют свойства мультипотентности, но в норме не реализуют их.

Схожая ситуация в отношении функциональной гетерогенности наблюдается в случае стволовых клеток кожи. Так, результаты линейного трейсинга потомков отдельных стволовых клеток показали, что в волосяном фолликуле выявляется несколько отдельных субпопуляций стволовых клеток, которые обладают различающимися преимущественными направлениями регенерации таких структур как волосяная луковица, сальная железа или межфолликулярный эпителий (обзор различных типов стволовых клеток кожи см. в [101]). Как и в случае костного мозга, в нормальных физиологических условиях можно говорить о частичной специализации стволовых клеток кожи по выполняемым функциям по обновлению составных частей кожи. В то же время, в случае повреждения, например, вызванного удалением определенной субпопуляции стволовых клеток при помощи лазера, клетки проявляют очень высокую пластичность и могут трансдифференцироваться в стволовые клетки

другой субпопуляции [104]. Кроме того, эксперименты по трансплантации стволовых клеток, принадлежащих к разным субпопуляциям волосяной луковицы, показали, что эти клетки обладают мультипотентностью и могут дифференцироваться во все типы эпителиальных клеток кожи. Эти данные являются дополнительным подтверждением того факта, что на спектр доступных для стволовой клетки направлений дифференцировки решающее влияние оказывает ниша стволовой клетки. При трансплантации стволовой клетки происходит ее удаление из физиологического микроокружения, что дает возможность стволовой клетке реализовать все возможные для нее направления дифференцировки. В то же время, удаление стволовой клетки из ниши может приводить к лишению ее характеристики мультипотентности. Стоит отметить, что в состав эпидермальной ниши стволовых клеток входят как производные МСК, такие как адипоциты, так и производные самих стволовых клеток эпидермиса. Например, клетки, экспрессирующие кератин 6, ($K6^+$ -клетки) являются потомками стволовых клеток волосяной луковицы и секретируют паракринные факторы, поддерживающие стволовую клетку в покое состоянии [105].

Другим проявлением функциональной гетерогенности стволовых клеток можно назвать существование стволовых клеток на разных этапах подготовки к входу в дифференцировку. Так, для многих стволовых клеток характерно покое состояние. У некоторых стволовых клеток в этом состоянии преобладает гликолитический метаболизм (например, ГСК) [16], у других, напротив – хорошо развитая сеть митохондрий и окислительное фосфорилирование жиров (сателлитные клетки мышц) [106]. Перед вступлением стволовых клеток в дифференцировку они переходят в метаболически и фенотипически отличное от покое состояние активированное состояние. Как было сказано выше, для сателлитных клеток и МСК мышц показано особое промежуточное “alert” состояние, в которое клетки могут переходить на начальном этапе активации [14]. В некоторых тканях, где

стволовые клетки имеют эпителиальный фенотип, клетки, находящиеся в разных функциональных состояниях, имеют и различающуюся локализацию. Покоящиеся стволовые клетки обычно прилегают к базальной мембране, тогда как потеря этой связи обычно свидетельствует об активации стволовой клетки.

В жировой ткани существенный прогресс в изучении функциональной гетерогенности стволовых клеток произошел с появлением и совершенствованием методов анализа транскриптома единичных клеток (scRNAseq). Комплексный биоинформатический анализ массивов стромально-васкулярной фракции жировой ткани мыши и человека [107] показал, что в популяции МСК можно выделить три обособленных группы клеток, отличающихся по функциональным свойствам и по чувствительности к регуляторным стимулам. Во-первых, это стволовые клетки жировой ткани, которые обладают высоким уровнем пролиферации *in vitro*, ограниченной чувствительностью к адипогенным стимулам и мультипотентностью (способны дифференцироваться в остеобласты). Вторая группа МСК — это преадипоциты. Они пролиферируют чуть слабее, чем стволовые клетки, могут направляться а адипогенную дифференцировку под действием одного инсулина и не обладают мультипотентностью. Третья особая группа регуляторных клеток, которые подавляют дифференцировку других стволовых клеток этой ткани (A-reg), постоянно поддерживая пул малодифференцированных стволовых клеток [107, 108]. Скоординированное взаимодействие нескольких типов стволовых клеток позволяет ткани функционировать как единое целое.

Стволовые клетки внутри одной популяции различаются по своей способности к хоумингу. Так, на экспериментах с культурами МСК и нейрональными стволовыми клетками было показано, что определенная фракция стволовых клеток обладает повышенными миграторными свойствами (модель трансвелла). Эти клетки характеризуются значительно повышенной экспрессией белка подопланина (PDPN), оверэкспрессия которого в других клетках повышает их способность к миграции и хоумингу, а подавление -

наоборот. Выделенная субпопуляция быстро мигрирующих клеток намного более эффективно локализуется в очагах повреждения и оказывает терапевтический эффект в моделях нейродегенеративных заболеваний при интраназальном и хирургическом введении [109].

Еще одним проявлением функциональной гетерогенности стволовых клеток является различающаяся между отдельными клетками чувствительность к гормонам-регуляторам. При этом гормональная чувствительность стволовых клеток может активно регулироваться как внешними для клетки факторами, так и внутренними механизмами. Помимо обычных для большинства дифференцированных клеток механизмов регуляции гормональной чувствительности, в стволовых клетках можно встретить уникальные формы регуляции.

1.6.2. Механизмы возникновения функциональной гетерогенности стволовых клеток путем регуляции гормональной чувствительности

Стволовые клетки воспринимают информацию, поступающую из внешней для этих клеток среды путем регистрации гормонального фона организма, а также через сигналы, передаваемые по нервным волокнам. Сигналы регистрируются специфическими рецепторами, расположенными на поверхности, либо внутри клеток. Кроме доступности специфического рецептора для связывания с гормоном, в стволовых клетках обнаружен еще целый ряд механизмов регуляции гормональной чувствительности, многие из которых уникальны среди других соматических клеток. Функциональный ответ стволовых клеток на гормональный сигнал определяется рядом факторов, действующих на различных уровнях функционирования рецептора и внутриклеточного проведения сигнала. Во-первых, на молекулярном уровне рецепторы подвергаются регуляции путем модификаций как самих рецепторов, так и участников их сигнальных каскадов. Например, это хорошо известное фосфорилирование семидоменных рецепторов, классически приводящее к

десенситизации рецепторов и привлекающее β -аррестин. Связывающийся с рецепторами β -аррестин индуцирует интернализацию рецептора, после чего рецептор либо рециклизуется, либо деградирует. Во-вторых, на клеточном уровне в индивидуальных клетках может изменяться содержание, изоформный состав и в принципе наличие тех или иных рецепторов, что изменяет функциональный ответ конкретной клетки на действующий стимул. В-третьих, на ряде стволовых клеток показан новый уровень организации и регуляции гормональной чувствительности и дифференцировочного потенциала - тканевой. В его основе лежит наличие функциональной гетерогенности между клетками, которые реализуют функции стволовости только в совокупности. Например, имеется ряд свидетельств о существовании в тканях особого пула клеток-сенсоров гормональных сигналов [83, 108, 110]. В то время как большинство клеток ткани остаются нечувствительными к действующим стимулам, эти клетки-сенсоры воспринимают появляющиеся гормоны и передают другим клеткам информацию в виде паракринных стимулов, что служит для координации гормонального ответа целой ткани.

Стволовые клетки активно используют различные механизмы изменения чувствительности индивидуальных клеток к действующим гормонам. Например, хорошо изученным механизмом регуляции сродства GPCR к их лигандам является фосфорилирование их С-концевого цитоплазматического домена. Лиганд-связанный рецептор активирует тримерный G-белок, результатом чего является запуск либо фосфоинозитидного обмена, кальциевой сигнализации и протеинкиназы С (ПКС), либо аденилатциклазы и циклического аденозин-монофосфата (цАМФ), который активирует протеинкиназу А (ПКА). ПКС и ПКА могут фосфорилировать цитоплазматический С-концевой домен семидоменных рецепторов, что приводит к снижению сродства рецептора к тримерному G-белку и, соответственно, уменьшению интенсивности активируемых сигнальных каскадов при неизменной концентрации гормона. Поскольку ПКС и ПКА могут

активировать как гормон-связанные молекулы рецептора, так и свободные от гормона, этот тип десенситизации называют “non-agonist-specific desensitization”. Кроме того, этот тип десенситизации часто относят к типу гетерологической десенситизации, поскольку активированные протеинкиназы могут фосфорилировать не только ту молекулу рецептора, которая привела к их активации, но и другие семидоменные рецепторы [111, 112]. Альтернативным путем фосфорилирования активного рецептора является путь гомологической десенситизации, или “agonist-specific desensitization”. При этом активный лиганд-связанный рецептор привлекает киназу G-белок-ассоциированных рецепторов (GRK), которая фосфорилирует только гормон-связанные молекулы рецептора, снижая их сродство к G-белку [111, 112].

После прохождения десенситизации молекулы рецепторов могут вернуться в исходное состояние путем дефосфорилирования. Протеинфосфатазы (PP), осуществляющие дефосфорилирование рецепторов, могут находиться как в растворимой форме, так и входить в состав сигнальных суперкомплексов, собирающихся на каркасных белках для проведения сигнала от рецептора. Например, каркасные белки AKAP, связывающие цАМФ-зависимую PKA, содержат также и PP2A, дефосфорилирующую рецепторы [113]. Таким образом, процессы фосфорилирования и дефосфорилирования рецептора осуществляются в связке для тонкой настройки чувствительности рецептора и интенсивности проведения сигнального каскада адекватно изменяющимся внешним условиям.

Интернализация рецепторов не всегда приводит к снижению чувствительности клеток к действующему гормону (десенситизации). Так, в ряде случаев, интернализация рецептора является необходимым условием для повышения его активности. Например, для рецептора паратиреоидного гормона (ПТГ) показано, что интернализация гормон-рецепторного комплекса приводит к значительному усилению амплитуды и продолжительности продукции цАМФ [114, 115]. В классическом случае продолжительная стимуляция

семидоменного рецептора приводит к его фосфорилированию и связыванию β -аррестина, и, как следствие, к ограничению взаимодействия G-белка и рецептора, десенситизации рецептора [116]. В случае же рецептора ПТГ 1 типа Gs-белок сохраняет свое взаимодействие с рецептором даже после ассоциации β -аррестина и интернализации гормон-рецепторного комплекса. Если использовать аналоги ПТГ, которые необратимо связываются с рецептором, то продолжительный цАМФ-зависимый сигнал наблюдается только в случае интернализации рецептора. Ингибирование интернализации ведет к формированию транзиторного ответа даже в присутствии связанного с рецептором гормона [114]. Более того, оверэкспрессия β -аррестина в случае β -адренорецепторов приводит к ускорению терминации цАМФ-зависимого сигнала, а в случае рецептора ПТГ - к усилению цАМФ-зависимого сигнала [117]. ПТГ является основным регулятором кальциевого гомеостаза, и основной его мишенью являются кости и почки. Тем не менее, нарушения чувствительности МСК жировой ткани к ПТГ приводят к развитию аномальной дифференцировки этих клеток - появлению очагов эктопической оссификации в жировых депо [118].

Функциональная активность стволовых клеток регулируется не только избирательным включением и выключением рецепторов гормонов, но и переключением активируемых гормоном сигнальных каскадов. Так, существует несколько вариантов, при которых один и тот же гормон, действуя на разные стволовые клетки одной популяции, содержащие одинаковый набор поверхностных рецепторов, может активировать разные функциональные клеточные ответы.

Первым примером может служить изменение сродства рецептора к тому или иному сигнальному каскаду в результате посттрансляционных модификаций рецептора или активируемых им сигнальных молекул. Фосфорилирование семидоменных рецепторов исторически считается ассоциированным с быстрой десенситизацией. Тем не менее, показан ряд механизмов, ассоциированных с

фосфорилированием этих рецепторов, которые приводят не к подавлению, а к переключению внутриклеточного пути передачи сигнала. В норме β -адренорецепторы ассоциированы с тримерным Gs-белком и активируют сигнальный каскад аденилат-циклаза/цАМФ/ПКА. Однако в ряде клеток было показано, что избыточная стимуляция β -адренорецепторов и длительная активация ПКА приводит к фосфорилированию рецептора. Фосфорилированные β -адренорецепторы проявляют повышенное сродство к тримерному Gi-белку [119], что ведет к ингибированию цАМФ-зависимого сигнального каскада, то есть эффекту, противоположному обычному клеточному ответу на стимуляцию β -адренорецепторов. Несмотря на то, что эти механизмы были показаны в первую очередь на кардиомиоцитах, появляются данные, свидетельствующие о возможности прохождения такого механизма и в стволовых клетках [120].

Имеются данные также о возможности ингибирования проведения рецепторного сигнала за счет модификации участников сигнального каскада рецептора. Рецепторы не могут передать внутриклеточный сигнал из-за нарушения работы участников сигнального каскада. Например, инсулин при действии на адипоциты активирует PDE3B, которая снижает уровень цАМФ в клетках. Снижение цАМФ блокирует проведение сигнала от Gs-белка к ПКА, которая не может фосфорилировать свои мишени в адипоцитах [121].

Вторым примером переключения рецептор-ассоциированного сигнального каскада является участие адаптерных белков в проведении сигнала. Например, рецептор ПТГ, в норме сопрягается с Gs тримерным белком и запускает цАМФ-зависимую сигнализацию. В случае же связывания рецептора с адаптерным белком NHERF (Na⁺/H⁺-exchange regulatory cofactor) активируемая этим рецептором внутриклеточная сигнализация меняется. NHERF повышает сродство рецептора к тримерному Gq белку, который запускает фосфоинозитидный обмен и кальциевую сигнализацию. Кроме того, изоформа NHERF2 также может активировать Gi белок, который дополнительно

ингибирует аденилат-циклазу и цАМФ-зависимую сигнализацию [122, 123]. Таким образом, адаптерные белки, ассоциированные с рецепторами, способны переключать внутриклеточную сигнализацию, запускаемую в разных клетках одним и тем же гормоном и его рецептором.

Третьим примером индуктора переключения внутриклеточной сигнализации рецептора между разными сигнальными каскадами служит β -аррестин (Рис. 1.6). Помимо осуществления десенситизации рецептора и индукции его интернализации, β -аррестин сам является каркасным белком. Он собирает на себе компоненты сигнальных каскадов, считающихся неканоническими для семидоменных рецепторов. Например, β -аррестин связывает протеинкиназу Raf-1 и другие компоненты MAP-киназного сигнального каскада, активируя их. В результате происходит переключение сигнализации с классических для семидоменных рецепторов Ca^{2+} -зависимого и цАМФ-зависимого сигнальных каскадов на MAP-киназный, который более характерен для рецепторов факторов роста и часто активирует митотическую активность клеток [124, 125]. Кроме того, β -аррестин может связывать и активировать ряд других сигнальных молекул, таких как Src киназу, некоторые изоформы фосфодиэстераз, фосфатидил-инозитол-3-киназу (PI3K) [126, 127]. То, какой именно сигнальный каскад будет запускаться конкретным рецептором с участием β -аррестина, зависит от других участников сигнального комплекса, собирающегося на рецепторе. Особенностью внутриклеточной сигнализации, активируемой на эндосомах с участием β -аррестина, является то, что эти сигналы обычно имеют более низкую амплитуду, но большую длительность по сравнению с G-белок-зависимыми сигналами от рецептора [128]. Таким образом, доступность β -аррестина и его партнеров по взаимодействию в конкретной клетке может существенно изменить сигнальные каскады и вызываемые ими функциональные ответы, активируемые при связывании лиганда со своим рецептором.

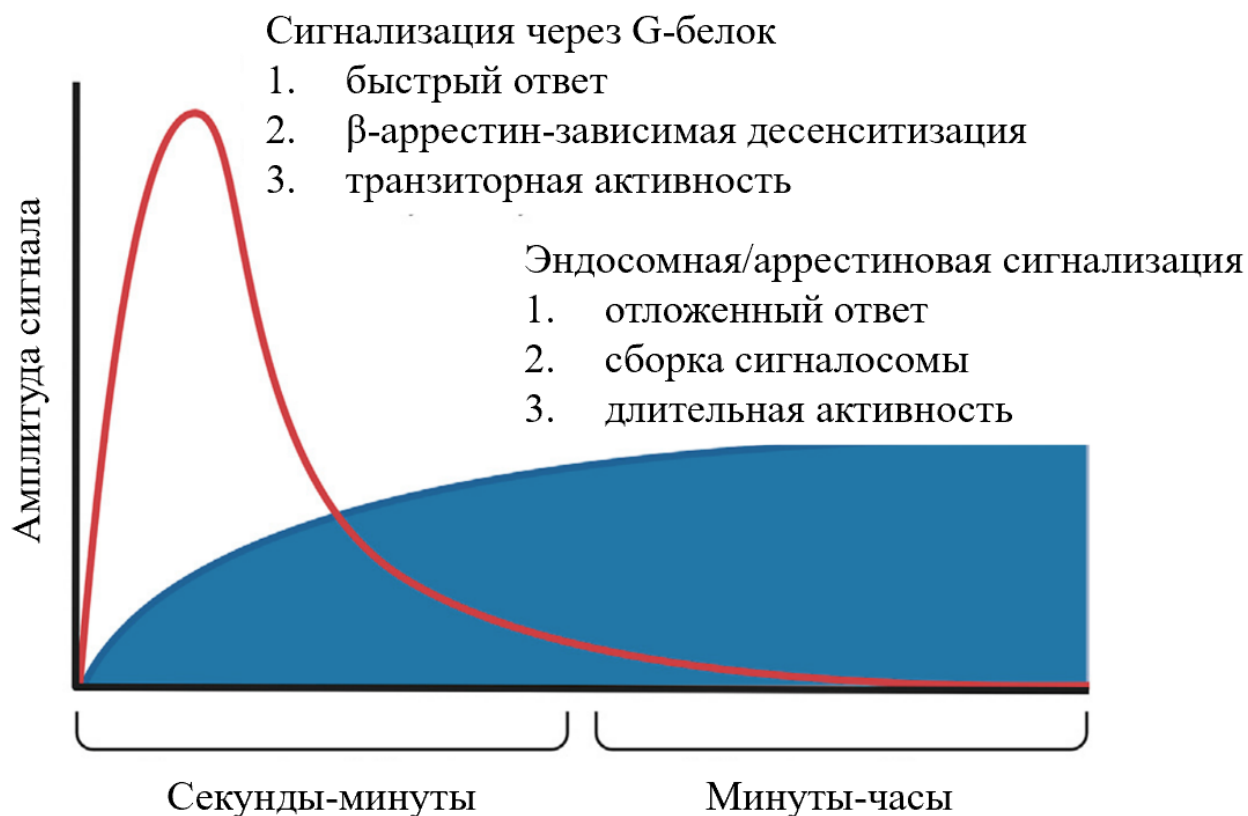


Рис. 1.6. Сигнализация в эндосомах и, в частности β -аррестин зависимая запускается после десенситизации рецептора и терминации G-белок- зависимого сигнала. Этот сигнал чаще всего обладает более низкой амплитудой, но более продолжительный. В некоторых случаях (например, рецептор ПТГ 1 типа) β -аррестин не вытесняет G-белок, а стабилизирует его комплекс с рецептором, усиливая и продлевая G-белок-зависимый сигнал.

Гормоны, стимулируя свои рецепторы на поверхности клеток, способны сенситизировать клетку к действию других гормонов и паракринных факторов. В качестве примера перmissive действия гормонов могут служить внутриклеточные рецепторы глюкокортикоидов, которые ведут к повышению чувствительности клеток к агонистам адренорецепторов. Эстрогены повышают экспрессию β 1- и β 3-адренорецепторов на клетках эндотелия, что приводит к более выраженной вазодилатации при действии норадреналина [129].

Другим вариантом перmissive действия одних сигнальных молекул на другие является активация молчащих рецепторов. Молчащими рецепторами считаются такие рецепторы, которые могут взаимодействовать с лигандом, но

не могут запускать сигнальный каскад, потому что не сопряжены с ним. Сопряжение таких рецепторов с их сигнальными каскадами под действием другого лиганда может резко увеличивать чувствительность клеток к гормонам или нейромедиаторам. Так, на кровеносных сосудах показано, что стимуляция гистамином приводит к выходу серотониновых рецепторов 1 типа (HTR1) из молчащего состояния и, соответственно, к повышению чувствительности клеток к серотонину [130].

1.6.3. Межклеточная коммуникация как механизм реализации функциональной гетерогенности стволовых клеток

В функционировании ниши костного мозга важную роль играет сигнальное взаимодействие разных типов стволовых клеток. Выше был описан механизм сигнального взаимодействия нестин-экспрессирующих МСК и ГСК в нише костного мозга [83, 131]. В отличие от ниши костного мозга, в жировой ткани набор резидентных стволовых клеток ограничен, поэтому и не осуществляется взаимодействие между их разными типами. В то же время, в популяции МСК жировой ткани выявляются субпопуляции МСК, различающиеся в функциональном плане. В жировой ткани обнаруживается субпопуляция клеток-регуляторов, способная снижать чувствительность других МСК к проадипогенным гормональным стимулам и подавлять адипогенную дифференцировку преадипоцитов. Такие ингибирующие регуляторные клетки исходно были описаны в популяции МСК жировой ткани мыши. В ее составе обнаруживается малая субпопуляция клеток, несущая поверхностные маркеры CD142 и ABCG1. Эти клетки, названные A-reg, оказались способны снижать чувствительность МСК к проадипогенным гормональным стимулам и подавлять адипогенную дифференцировку преадипоцитов [107, 108]. Таким образом, межклеточное сигнальное взаимодействие различных субпопуляций стволовых клеток лежит в основе регуляции их функциональной активности, а также тонкой настройки процессов дифференцировки стволовых клеток в ткани.

1.6.4. Другие механизмы возникновения функциональной гетерогенности стволовых клеток

На плюрипотентных стволовых клетках показан возможный механизм возникновения функциональной гетерогенности, связанный с нахождением индивидуальных клеток в различных фазах клеточного цикла. Так, показано, что гены развития (developmental genes) при появлении стимулов, активирующих плюрипотентные стволовые клетки, активируются только в G1-фазе клеточного цикла. Индивидуальные клетки популяции плюрипотентных стволовых клеток тем с большей задержкой переходят в активированное состояние, чем дальше они находятся от G1-фазы. Задержка перехода индивидуальных клеток в дифференцировку напрямую связана с временем перехода этой клетки в G1-фазу [132]. Таким образом, при поступлении дифференцировочного сигнала среди популяции плюрипотентных стволовых клеток гены развития активируются только в тех клетках, которые в данный момент времени находятся в G1-фазе клеточного цикла. Если дифференцировочный сигнал действует достаточно долго, то с задержкой из режима самообновления перейти в дифференцировку могут и другие клетки популяции по достижении ими G1-фазы [133].

Предполагается, что данный механизм связан с тем, что в G1-фазе клеточного цикла происходит целая серия событий, открывающих «окно возможностей» для реализации генов развития и переключения плюрипотентных стволовых клеток из режима самообновления в режим дифференцировки. Во-первых, это процесс финальной сборки ядра после прохождения митоза. В ядре формируются зоны эуроматина и гетерохроматина, происходит локализация отдельных зон повышенной и пониженной транскрипционной активности. Зоны хроматина, оказывающиеся расположенными ближе к ядерной оболочке, обладают повышенным потенциалом к активации [134, 135]. Во-вторых, в эту фазу происходят активные эпигенетические модификации хроматина и гистонов, которым подвергаются в том числе и гены развития [136]. В-третьих,

ряд регуляторов транскрипции, ассоциированных с генами развития, оказываются локализованными в ядре и, соответственно, доступными для связывания со своими партнерами по регуляции, только в G1-фазе. Транскрипционный модулятор SMAD2,3 оказывается в ядре во время G1, но по завершению этой фазы транслоцируется обратно в цитоплазму по циклин D-зависимому механизму [132]. Что интересно, основная экспрессия генов развития происходит в S-фазе клеточного цикла. Это объясняют тем, что сборка транскрипционных комплексов, соответствующие эпигенетические модификации и первичная активация транскрипции этих генов происходит во время «окна возможностей», открывающегося в G1, а основная экспрессия – уже в более продолжительной для плюрипотентных стволовых клеток S-фазе [136].

Имеются данные о схожем механизме связи G1-фазы клеточного цикла и выбора дифференцировочной судьбы нейтральных стволовых клеток. Так, во время нейрогенеза в вентрикулярной зоне мозга ранний регулятор нейрогенеза нейрогенин 2 активируется специфически во время G1-фазы клеточного цикла [137]. Таким образом, G1-фаза клеточного цикла в ряде типов стволовых клеток выступает в качестве момента выбора дальнейшей дифференцировочной судьбы. Дифференцировочные стимулы, подействовавшие на стволовую клетку именно в этот момент, оказывают наибольшее влияние на выбор направления дальнейшей судьбы индивидуальной клетки.

1.6.5. Роль гетерогенности стволовых клеток в процессах регенерации

Важным вопросом, встающим при анализе функциональной гетерогенности стволовых клеток, является вопрос механизмов ее появления. Одним вариантом может быть детерминация нескольких пулов стволовых клеток в процессе эмбрионального или раннего постнатального развития органа или ткани. И эта детерминация поддерживается на протяжении всей жизни индивидуума. Полярным вариантом является пластичность стволовых клеток, которая

позволяет им при появлении необходимости переходить из одного функционального фенотипа в другой для поддержания полноценного комплекса клеток с разными свойствами, необходимыми для функционирования ткани.

Субпопуляции, относящиеся к разным группам стволовых клеток, например, ГСК и костномозговые МСК, разделяются в эмбриональном развитии и далее функционируют совместно, но как различные субпопуляции клеток [138]. С другой стороны, внутри отдельных групп стволовых клеток, например, среди МСК выявляются различные функциональные субтипы клеток. Как было описано в предыдущем разделе, стволовые клетки в нормальных условиях функционирования взрослого организма в достаточно высокой степени специализированы на выполнении узкого спектра функций. Спектр функций стволовой клетки ограничивается ее локальным микроокружением, нишей. Тем не менее, при возникновении каких-то нарушений, например травмы, стволовые клетки проявляют мультипотентность. Отсюда можно заключить, что стволовым клеткам присуща функциональная пластичность в определенных пределах.

Далее возникает вопрос, какова функциональная значимость такой пластичности стволовых клеток. Нужна ли она для нормального функционирования ткани или же является лишь проявлением слабой дифференцированности стволовых клеток. Нарушения функциональной гетерогенности МСК приводят к значительному ухудшению ответа ткани на стрессорные воздействия, такие как механические нагрузки или гипоксия, а также на анаболические стимулы, активирующие рост ткани [138-140]. Процессы регенерации для большинства тканей являются сложными комплексными процессами, в которых принимает участие множество различных подтипов стволовых клеток с различающимися функциями в процессе регенерации. Так, например, перелом кости приводит к активации множества функциональных субпопуляций костномозговых МСК, обладающих

высокой клоногенной способностью и мультипотентностью [141]. При этом разные функциональные субпопуляции МСК проявляют в ограниченных пределах специализацию по выполняемым функциям в процессе регенерации. На примере повреждения кости, костномозговые МСК и МСК надкостницы, характеризующиеся экспрессией маркеров $Grem1^+$ и $LepR^+$, активно пролиферируют сразу после наступления перелома [142, 143]. МСК надкостницы, экспрессирующие периостин, по-видимому, являются регуляторами процесса заживления, поскольку нокаут этого белка или деплеция этой субпопуляции МСК приводит к тяжелым и комплексным нарушениям процесса регенерации [141]. Osx^+ -костномозговые МСК играют ключевую роль в ангиогенезе регенерирующей кости за счет экспрессии VEGFA [144]. С другой стороны, в комплексном процессе регенерации присутствуют и негативные регуляторы. Так, субпопуляция Osx^+ -МСК надкостницы, которая дополнительно экспрессирует белок SDC1, функционирующий как антагонист BMP, замедляет формирование костной мозоли в месте будущей регенерации, а нокаут гена этого белка в экспериментальных животных существенно ускоряет образование костной мозоли [145]. Таким образом, процесс регенерации является комплексным и вовлекает в себя целый ряд функциональных субпопуляций стволовых клеток, которые проявляют специализацию по выполняемым функциям.

Гетерогенность популяции, выполняющей в организме определенную функцию, в особенности если эта функция связана с динамическими процессами регенерации и обновления ткани, выглядит имеющей принципиальное значение для надежности и стабильности этих процессов. Более того, стволовые клетки проявляют пластичность, будучи способными заменять функции друг друга при необходимости. В экологии показано, что гетерогенная популяция какого-то экологического сообщества имеет жизнеспособность на несколько порядков более высокую, чем более гомогенные группы организмов [146, 147]. В случае изменения внешних

условий или же возникновения чрезвычайного происшествия в гетерогенной популяции находятся организмы, проявляющие наибольшую приспособленность к изменившимся условиям среды, позволяя популяции как целому продолжать существование. Таким образом, можно предположить, что и в случае популяций стволовых клеток функциональная гетерогенность лежит в основе устойчивости ответа организма на изменяющиеся условия среды.

1.7. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

1.7.1. Общая характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) — это постнатальные стволовые клетки, которые выявляются в подавляющем большинстве тканей организма. Они обладают мультипотентностью и могут дифференцироваться в клетки мезенхимного направления, такие как адипоциты, остеобласты и хондробласты. При этом, по-видимому, *in vivo* МСК дифференцируются достаточно редко, выполняя функции обновления стромы тканей на протяжении всей жизни организма [148, 149]. Ключевой функцией МСК, как следует из их названия, является организация стромы тканей. При этом понятие «stroma» в данном случае употребляется в широком смысле слова: это совокупность всех регуляторных факторов (специфических для данной ткани белков внеклеточного матрикса, паракринных факторов и внеклеточных везикул). Белки ВКМ задают условия функционирования тканеспецифичных клеток, от жесткости локального микроокружения до заряда и иммобилизованных на ВКМ сигнальных молекул. Сигнальный фон, составляемый синтезируемыми МСК паракринными факторами и внеклеточными везикулами, влияет на само функционирование тканеспецифичных клеток. Например, МСК являются обязательными посредниками в регуляции гомеостаза симпатической нервной системой [83].

Во-вторых, МСК, синтезируя паракринные сигнальные молекулы, поддерживают гомеостаз ткани. МСК регулируют ангиогенез, нейрогенез, иммунные реакции в ткани своего пребывания [148, 150]. Более того, МСК способны в широких пределах изменять профиль выделяемых факторов и наполнение внеклеточных везикул в зависимости от поступающих к ним входящих сигналов [151].

МСК были впервые открыты как колониеобразующие единицы-фибробласты А.Я. Фриденштейном с функцией формирования стромы костномозговой ткани [152]. Классическое определение МСК включает в себя несколько критериев: 1) адгезивность к пластику в стандартных условиях культивирования; 2) экспрессия специфических поверхностных маркёров CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) и CD90 (THY1) более чем 95% клеток и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79alpha или CD19 и HLA-DR; 3) способность клеток дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro* [153]. Точный набор поверхностных маркеров МСК варьирует в зависимости от биологического вида и ткани-источника. Например, положительными маркерами МСК жировой ткани человека могут дополнительно выступать CD13, CD29 и CD44, а негативными - CD31, CD45 и CD235a [154].

1.7.2. Ключевые функции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Помимо критериев, входящих в определение понятия МСК, эти клетки выполняют ряд важных для поддержания гомеостаза ткани функций:

1. В процессе выполнения *регуляторной функции* МСК осуществляют поддержание гомеостаза тканей организма на сигнальном уровне и регулируют ниши тканеспецифичных стволовых клеток за счет секреции паракринных факторов, например, VEGF, EGF, TGF- β , PGE₂, IL-3,-6,-10, IGF-1, внеклеточных везикул, а также за счет контактных межклеточных

взаимодействий [82, 155]. Кроме того, синтезируя компоненты внеклеточного матрикса (коллагены различного типа, ламинины и фибронектин), МСК создают и поддерживают каркас для специализированных клеток ткани.

2. *Иммунomodулирующая функция.* МСК обладают значительными иммуносупрессивными свойствами, для выполнения которых способны ингибировать активацию и пролиферацию иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов и натуральных киллеров), а также секретируют ряд цитокинов и регуляторных молекул (IL-6,-10, TGF- β , NO и других), а также молекул клеточной адгезии (VCAM, ICAM, FasL и др). При чрезмерном развитии воспаления иммуносупрессивный ответ проявляется сильнее. С другой стороны, при недостаточном уровне развития воспаления в ответ на нарушение функционирования ткани МСК могут даже активировать иммунную реакцию [156, 157].

3. Как и большинство других стволовых клеток, МСК проявляют высокий пролиферативный потенциал как *in vivo*, так и *in vitro*, осуществляя самообновление, то есть выполняя *пролиферативную функцию* [158].

4. Как было сказано выше, МСК являются *мультипотентными* стволовыми клетками. МСК и *in vitro*, и *in vivo* могут дифференцироваться в адипоциты, хондробласты и остеобласты, а также в ряд других типов клеток соединительной ткани. Имеются данные о возможности превращения МСК *in vitro* в ряд клеток не-мезенхимного происхождения (кардиомиоциты, эндотелиальные, нейроноподобные клетки [159, 160]. Однако функциональность полученных таким образом клеток вызывает серьезные вопросы. Также стоит отметить, что в условиях здорового организма *in vivo* МСК, находясь в какой-то определенной нише, реализуют ограниченное число вариантов дифференцировки, которые соответствуют этой нише. Например, МСК жировой ткани в норме не дифференцируются в остеогенном и хондрогенном направлениях несмотря на то, что сохраняют мультипотентность.

5. *Миграция (хоуминг)*. МСК способны выходить из ткани в кровь, перемещаться на большие расстояния и мигрировать в поврежденные ткани [161]. Для миграции и хоуминга МСК используют целый ряд экспрессируемых ими адгезивных молекул (интегрины $\alpha 1-5$, $\beta 1$), металлопротеиназ (МР1-ММР, ММР-1,-9), хемокиновых рецепторов (CXCR-4, -5, -6, CCR-2, -7, -10) и ингибиторов протеаз (ТИМР-1, -2, -4) [162].

Исходя из определения, можно предположить, что МСК – это в значительной степени культуральное понятие, поскольку первым критерием этой группы клеток является их адгезия на культуральный пластик. Одно время некоторые авторы даже предполагали, что такой группы клеток в тканях не существует [163, 164]. Однако современные данные клеточного трейсинга в совокупности с анализом транскриптома единичных клеток с высокой степенью достоверности показали, что группа клеток, соответствующая МСК, действительно существует *in vivo*, выполняя особые функции. Кроме того, в настоящее время значительно прояснилось, какие группы клеток, выявляемые *in vivo*, составляют популяцию МСК [32, 83].

1.7.3. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки *in vivo*

Поскольку строма является неотъемлемой частью практически всех тканей организма, клетки, организующие строму, достаточно схожи в разных тканях. Именно эти клетки, после того как осуществляется их перевод в культуру клеток, получают название МСК. В различных тканях предшественники МСК преимущественно локализируются периваскулярно. Периваскулярная локализация мультипотентных стромальных клеток, обладающих функцией поддержания гомеостаза ткани и индукции процессов репарации и регенерации показана в костном мозге [83], жировой ткани [165], зубной пульпе [166], мышечной ткани [167] и множестве других. Морфологически МСК в тканях описываются как перициты, то есть клетки, располагающиеся периваскулярно в стенке малых сосудов, но не являющиеся ни эндотелиальными, ни

гладкомышечными [168-170]. Проявление перицитами свойств МСК *in vivo* было показано при помощи целого ряда различных подходов, среди которых изоляция сосудов без прилежащей ткани, из которых выделяются МСК-подобные мультипотентные клетки, генетический трејсинг дифференцировочной судьбы клеток в мышцах [167, 171]. Мультипотентные свойства также проявляют стромальные клетки, выделяемые из адвентиции крупных артерий и вен [172]. Однако стоит отметить, что, помимо непосредственно мультипотентных стволовых клеток стромы, происходящих, по-видимому, преимущественно из перицитов и клеток адвентиции артерий и вен, в культуру МСК *in vitro* попадает также целый ряд других клеток, способных адгезировать на пластик. Например, в популяции МСК при помощи методов анализа транскриптома единичных клеток выявляются также фенотипически дедифференцировавшиеся потомки гладкомышечных клеток, фибробласты и коммитированные предшественники мезенхимных тканей, такие как преадипоциты или преостеобласты. Тем не менее, в культуре на протяжении нескольких пассажей МСК поддерживают свой мультипотентный фенотип, что позволяет проводить параллели между исследованиями популяций МСК *in vitro* и процессами, происходящими *in vivo*.

1.7.4. Регуляция функциональных свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Как и в случае других типов стволовых клеток, в регуляции функциональных свойств МСК важную роль играет их метаболизм (см. Раздел 1.4.2). В отличие от большинства дифференцированных клеток, а также тканеспецифичных стволовых клеток, таких как ГСК, МСК проявляют крайне высокую пластичность в их способности переходить из аэробного способа получения энергии путем окислительного фосфорилирования и анаэробным гликолитическим путем. В условиях нормоксии в МСК функционируют и окислительное фосфорилирование, и гликолиз. Некоторые авторы оценивают вклад окислительного фосфорилирования в производство АТФ в культуре МСК

в районе 30%, а остальные 70% АТФ происходят за счет аэробного гликолиза (чисто гликолитического пути получения энергии АТФ без перехода пирувата в митохондрии несмотря на достаточность кислорода) [173]. Одним из путей длительного поддержания МСК с высоким потенциалом стволовости является их перевод в 3D-культуру. МСК при этом самоорганизуются в так называемые мезенсферы [83]. Показано, что в МСК после их перехода в 3D-культуру значительно снижается как уровень метаболизма в целом, так и продукция лактата, свидетельствующая о прохождении аэробного гликолиза, так и потребление кислорода, свидетельствующее о прохождении окислительного фосфорилирования [173]. Эти эксперименты могут свидетельствовать о высокой метаболической пластичности МСК, которая, вероятно, в тканях позволяет им быть устойчивыми к гипоксии, возникающей при различных повреждениях. При этом метаболический переход носит обратимый характер, а МСК сохраняют свои дифференцировочные способности [174].

В базальном состоянии МСК полагаются на преимущественно гликолитический метаболизм. При этом он поддерживается даже при достаточном поступлении кислорода и играет важную роль в поддержании самообновления клеток, их секреторной функции и для сохранения мультипотентности при выборе направления дифференцировки [175]. В условиях гипоксии активируется HIF-1 α , это ведет к повышенной экспрессии гликолитических ферментов и подавлению окислительного фосфорилирования за счет снижения активности ПДК [176]. В то же время, и при нормоксии МСК поддерживают высокий уровень аэробного гликолиза за счет поддержания экспрессии HIF-1 α . Это оказывается крайне важно для поддержания синтетической регуляторной активности клеток. Кроме того, с этим ассоциирован высокий уровень производства антиоксидантов для защиты от оксидативного стресса. Невысокая активность митохондрий в этих условиях также снижает вероятность образования активных форм кислорода [175, 177]. При этом для МСК показана крайне высокая устойчивость к индукторам

апоптоза, что может быть объяснено мощной антиоксидантной защитой и сниженным уровнем производства активных форм кислорода [178].

При направлении МСК в дифференцировку изменяется и их преимущественный метаболизм. Активация МСК и их направление в дифференцировку приводит к их переключению на преимущественно окислительное фосфорилирование. При этом процессе снижается продукция молочной кислоты и повышается дыхание. Кроме того, значительно повышается экспрессия митохондриальных белков-разобщителей дыхательной цепи, UCP1, UCP2 и UCP3 [179]. Такие изменения дыхательной цепи могут свидетельствовать о том, что цикл Кребса в этих условиях работает не только для синтеза энергии, но и для обеспечения дифференцирующихся клеток необходимыми для активных синтезов интермедиатами цикла Кребса в анаэробных реакциях (Рис. 1.4). При подавлении дыхательной цепи или создании условий гипоксии происходит снижение эффективности дифференцировки МСК [179]. Интересно, что при остеогенной дифференцировке изменение метаболизма МСК происходит нелинейно. На первых этапах дифференцировки клетки активно пролиферируют, в них доминирует гликолитический путь получения энергии, который, как было сказано выше, регулирует пролиферацию МСК. Далее, когда клетки приступают непосредственно к дифференцировке, они переходят преимущественно на аэробный метаболизм с повышенным уровнем потребления кислорода [180, 181]. Таким образом, МСК проявляют метаболическую пластичность, которая является важным фактором как поддержания МСК в базальном состоянии, так и их перехода к активации и далее в дифференцировку.

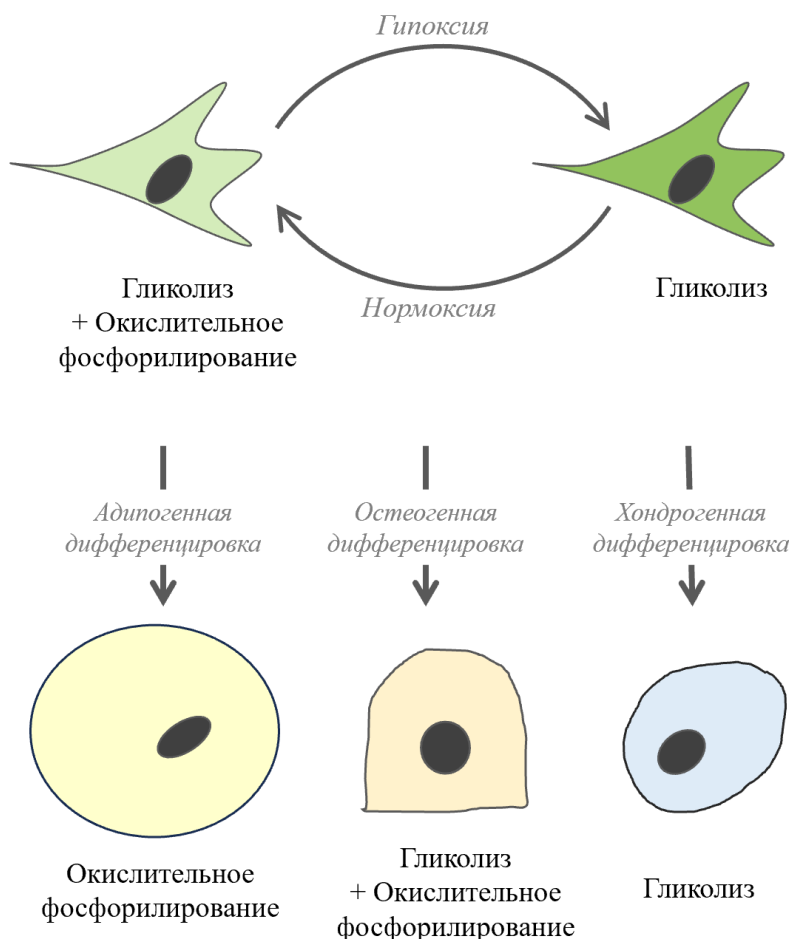


Рис. 1.7. МСК проявляют высокую пластичность в выборе преимущественного пути получения энергии АТФ между анаэробным гликолизом и окислительным фосфорилированием, зависящем от кислорода. При направлении МСК в дифференцировку определяется преимущественный путь получения энергии.

1.7.5. Проблема выбора направления дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

МСК являются типичными мультипотентными стволовыми клетками, способными дифференцироваться в несколько различных типов клеток. К настоящему времени показано, что выбор пути дифференцировки стволовой клетки происходит под влиянием последовательности активирующихся транскрипционных факторов, эпигенетических механизмов, спектра паракринных факторов и микроокружения. К настоящему времени эти механизмы хорошо изучены в эмбриогенезе, однако во взрослом организме про них известно крайне мало. Более того, остается открытым вопрос о том, каким

образом мультипотентная стволовая клетка взрослого организма выбирает один из нескольких возможных путей дифференцировки. В случае здорового функционирования ткани стволовая клетка должна поддерживать клеточный «гомеостаз» - баланс разных типов клеток, соответствующий здоровому состоянию ткани и адекватный условиям внешней среды. С другой стороны, при прохождении процессов регенерации стволовая клетка восстанавливает множество различных типов клеток ткани, опять же в определенных соотношениях между ними. То, какие механизмы и факторы определяют выбор конкретного направления дифференцировки мультипотентных стволовых клеток взрослого организма, является темой данной работы.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Выделение первичной культуры МСК

МСК выявляются в большинстве тканей организма, но наиболее удобными источниками этих клеток на сегодняшний день являются костный мозг и подкожная жировая клетчатка. В данной работе мы выделяли МСК из подкожной жировой ткани человека, которую получали, чаще всего, из области живота при проведении травматологических операций в госпитале Бурденко (Москва), а также бариатрических операций, проводимых в медицинском научно-образовательном центре МГУ имени М.В. Ломоносова [182]. От каждого донора было получено добровольное информированное согласие. Данные о пациентах, жировая ткань которых была использована в данной работе, представлены в Приложениях 1 и 2. 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. Для выделения МСК из жира на первом этапе разрушали межклеточные контакты и внеклеточный матрикс при помощи коллагеназы и диспазы. Порядок действий:

1. приготовить солевой раствор Хэнкса с добавленными диспазой (2 мг/мл), коллагеназой (400 ЕД/мл) и смесью антибиотиков пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл), а также противогрибкового препарата амфотерицина Б (0,5 мкг/мл);
2. механически измельчить жир до состояния мелкодисперсной кашицы (размер кусочков в районе 1 мм);
3. добавить раствор ферментов в растворе Хэнкса к измельченному жиру (1:1 по объему);
4. инкубировать смесь в течение 0,5-1 часа при 37°C;
5. центрифугированием (200g, 10 мин) смесь разделяется на 4 слоя. Верхние 2 слоя – это вытекший из клеток жир и сохранившиеся белые

адипоциты, 3 слой – раствор коллагеназы, 4 слой - остальные клетки. Верхние три слоя удаляются;

6. добавить от 3 до 20 мл (в зависимости от количества материала жировой ткани) полной среды роста МСК (AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media (HyClone, Logan, UT, USA), содержащая 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, Logan, UT, USA) и 1% раствора антибиотиков пенициллина и стрептомицина (HyClone, Logan, UT, USA)), суспендировать полученную смесь;

7. перенести суспензию на одну или несколько пластиковых чашек Петри для адгезионных культур для прикрепления МСК к пластику. На этом этапе происходит дополнительное разделение МСК и других клеток, поскольку МСК хорошо адгезируют к пластику в отличие от иммунных клеток, эритроцитов и адипоцитов.

В данных условиях среды и культивирования МСК хорошо адгезировали и далее пролиферировали. Эндотелий и некоторые иммунные клетки также хорошо адгезировали, но в этой среде роста не пролиферировали. Таким образом, через несколько дней в чашке Петри находилась практически чистая культура МСК.

2.2. *Культивирование МСК*

Клеточные культуры МСК культивировали на чашках Петри для адгезионных культур в полной среде роста в инкубаторе при 37°C и с 5% CO₂. МСК пассировали с помощью растворов Версена и трипсина (Кат. №: П034, ПанЭко, Россия). При достижении конфлюэнтного монослоя клетки отмывали от среды при помощи раствора Версена, затем открепляли от чашек при помощи раствора трипсина. Далее добавляли полную среду роста, суспендировали и необходимое количество клеток переносили на новую чашку Петри. Первичную культуру МСК культивировали и использовали в экспериментах в течение 8-9 пассажей, затем утилизировали. Часть клеточных

культур замораживали для возможности повторной работы с этой же культуры в дальнейшем при необходимости.

2.3. Иммуногистохимический анализ

Подкожную жировую ткань человека использовали ту же, что и для выделения первичных культур МСК (полученную из области живота при проведении травматологических операций в госпитале Бурденко (Москва), а также бариатрических операций, проводимых в медицинском научно-образовательном центре МГУ имени М.В. Ломоносова). Образец подкожной жировой ткани человека помещали в реагент tissue-tek otc compound (Sakura Inc., Токио, Япония) и замораживали в жидком азоте. Далее нарезали срезы толщиной 10 μM при помощи криотома. Срезы фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 мин. Промывали ФСБ и инкубировали в 0,1% бычьим сывороточном альбумине (БСА), содержащем 10% ослиной сыворотки (normal donkey serum), для блокирования неспецифического связывания. Затем инкубировали со специфическими первичными антителами в течение одного часа и промывали в ФСБ. Адренорецепторы визуализировали в ткани путем иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов с использованием антител к $\alpha 1\text{A}$ - (ab137123, Abcam, 1:250) и $\beta 3$ -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 и/или антител к маркерам эндотелиальных клеток (CD31, IR610, Dako), или гладкомышечных клеток (αSMA , M0851, Dako), или мультипотентных стромальных клеток (PDGFR β , P7679, Sigma-Aldrich), или постганглионарных симпатических волокон (тирозингидроксилаза, AB152, Sigma-Aldrich). Ядра клеток окрашивали DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) и срезы заключали в Aqua Poly/Mount (Cat#18606, Polysciences Inc). В качестве отрицательного контроля использовали мышинные или кроличьи неспецифические IgG в соответствующей концентрации. Срезы

окрашивали вторичными конъюгированными с Alexa594 ослиными антителами против IgG кролика (A-21207, Thermo Fisher Scientific) и с конъюгированными с Alexa488 козьими антителами, специфичными к мышиным IgG (A-11001, Thermo Fisher Scientific). Изображения получали при помощи конфокального микроскопа LSM 780 с программным обеспечением ZEN2010 (Zeiss) и ImageJ (NIH).

2.4. Кальциевая сигнализация

Функциональные ответы МСК на гормоны регистрировали на уровне одиночных клеток.

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.

2. Активацию α -адренорецепторов определяли по изменению концентрации кальция в клетках. Для этого клетки окрашивали с помощью проникающего через мембрану красителя Fluo-8 AM, который после отщепления ацетометилловых 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 Fluo-8 AM в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л в растворе Хэнкса с 20 мМ ХЕПЕС. ХЕПЕС добавляли для поддержания уровня pH 7.4 вне инкубатора. Клетки окрашивали в течение 1 часа в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

3. Для активации α -адренорецепторов использовали норадреналин (Abcam, Кембридж, Великобритания, ab120717) в концентрации 1 μ M, так как он является нейромедиатором постганглионарных симпатических волокон. Норадреналин разводили в растворе Хэнкса с ХЕПЕС 20 мМ непосредственно перед добавлением к МСК. В случае использования антагонистов адренорецепторов клетки стимулировали норадреналином в присутствии либо α 1-антагониста празозина (Abcam, ab120238, 10 μ M), либо α 2-антагониста атипамезола (Abcam, ab120785, 100 μ M).

4. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Токио, Япония) и sCMOS камерой Photometrics Kinetix (Teledyne Photometrics, Калифорния, США). 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 раствор гормона в 2 \times 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 детектировали индивидуально в каждой клетке по изменению интенсивности флуоресценции Fluo-8 относительно состояния той же клетки перед добавлением гормона 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 в концентрации 1 μM 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 раствора 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.

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 конфлюентного монослоя. В случае подготовки препарата клеток после обработки МСК норадреналином клетки анализировали через 12 и 48 часов после двукратной обработки норадреналином (каждая обработка в течение 1 часа с интервалом в 6 часов). В качестве контроля использовали клетки, обработанные пустой средой без норадреналина. Кроме того, был подготовлен образец клеток, направленных в

адипогенную дифференцировку. Для этого клетки были высажены в плотности 90% от конфлюентного монослоя и направлены в адипогенную дифференцировку при помощи редуцированного дифференцировочного коктейля для адипогенной дифференцировки МСК – смеси инсулина (10 нг/мл), ингибитора фосфодиэстеразы изобутиметилксантина (ИБМХ, 0,5 мМ) и глюкокортикоида дексаметазона (1 μ М) (см. [Раздел 2.13](#)). Через 4 дня клетки суспендировали при помощи раствора трипсина и направили на анализ транскриптома единичных клеток. Для анализа МСК, направленных в фиброзную дифференцировку мы воспользовались массивом, полученным на тех же клетках, опубликованном в работе коллег [183]. Клетки открепляли с помощью 0,25% раствора трипсина после 3-кратной промывки раствором Версена, как при пересадке. Для ингибирования трипсина добавляли 5 мл полной среды роста МСК, 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 μ М. Для подсчета количества клеток использовали автоматический счетчик Countess (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) 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 PBS с добавлением 0,04% бычьего сывороточного альбумина из расчета 1000 клеток/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-А участки мРНК. Поскольку 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, где каждая молекула соотнесена с определенной клеткой. Образцы обрабатывали с использованием набора для баркодирования Library & Gel Bead Kit v3.1 (10x Genomics, США). Сравнимые образцы (контроль, обработка норадреналином, адипогенная дифференцировка и фиброзная дифференцировка) 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 CellRanger 6.1.2 (10x Genomics, США) в Linux. 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 критерии обусловлены рекомендациями производителя. 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 [184]. 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 [185]. 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 [186]. Чтобы выполнить анализ тенденций изменения транскрипции мРНК, мы оценили количество несплайсированных и сплайсированных форм мРНК, используя velocity 0.17.16 [187]. 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 [188]. 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 [189] с использованием наиболее оптимального для наших данных метода Paga-tree [190]. 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 [191]. 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) растворяли в уксусной кислоте до концентрации 3 мг/мл в 0,1% уксусной кислоте (Imtek), он только так остаётся жидким. А

затем, в процессе формирования дисков, pH доводили примерно до требуемого значения pH7,4 при помощи 1М NaOH (значение pH определяли при помощи содержащегося в среде индикатора фенолового красного). 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 MCK оставляли при комнатной температуре на 30 минут, чтобы произошла полимеризация. Для того чтобы открепить MCK-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 мМ. Через 1 ч диски промывали DMEM с низкой глюкозой (1 г/л) 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. 2.1](#). Процент сокращения MCK-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, S₀ - площадь диска до второго добавления норадреналина [192].

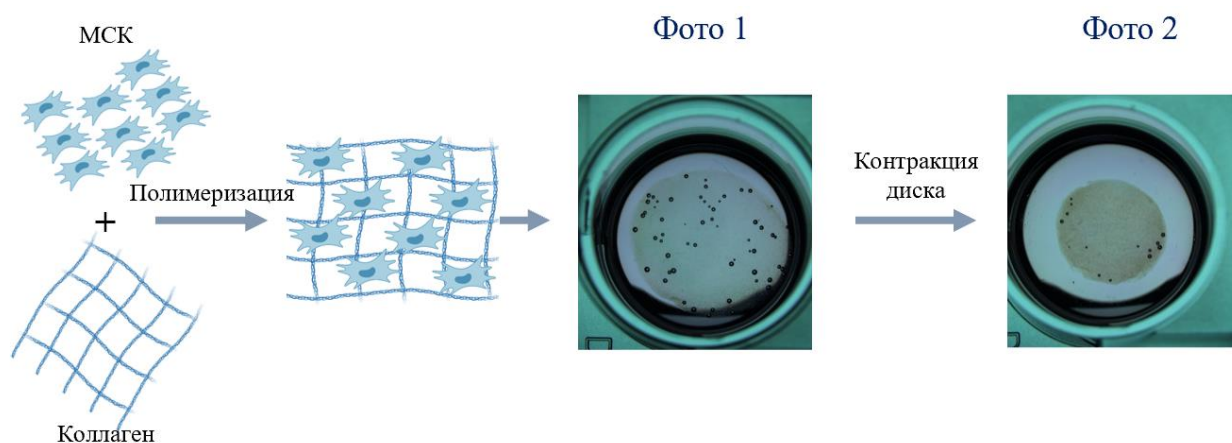


Рисунок 3.1. Схема образования и контракции дисков, полученных сополимеризацией мезенхимных стромальных клеток и коллагена.

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 ПКА МСК инкубировали 30 минут с норадреналином (Abscam, ab120717, Кембридж, Великобритания), растворенном в полной среде роста МСК в концентрации 1 μM . 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 в 0,1% бычьим 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 IgG (A-11001, Thermo Fisher Scientific). Ядра клеток контрастировали с использованием DAPI (D9542, Sigma-Aldrich), затем клетки 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 за 30 мин до стимуляции гормонами добавляли ингибитор CREB (666-15) в среде или в качестве контроля в среду без ингибитора. Клетки стимулировали раствором норадреналина 1 μM в течение 1 часа для моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, далее чашки трижды промывали раствором Хэнкса и оставляли в питательной среде. Через 1, 3, 6, 12 и 24 часов после стимуляции среду удаляли, чашки переносили на лед и промывали ледяным фосфатным буфером (5,2 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4 и 150 мМ 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 95⁰C с последующим охлаждением на льду. Подготовку проб ASC52telo после нокаута осуществляли по аналогичной методике без стимуляции норадреналином (см. [Раздел 2.11](#)).

Белки разделяли с помощью коммерческих предзалитых полиакриламидных 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 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3, BioRad, США). Перенос белков осуществляли на 0,45 μM поливинилиденфторидные (PVDF)

мембраны (Amersham, США) в течение 1 ч при 350 мА в буфере для переноса, содержащем 25 мМ Трис, 0,192 М глицина, рН 8,3, 10% этанола и 0,02% лаурилсульфата натрия. Мембраны блокировали в течение 50 минут в 5% обезжиренном молоке, растворенном в TBST (25 мМ Трис/HCl, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин 20). Мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами в течение ночи при температуре 4°C в разведении, рекомендованном поставщиком. Далее мембраны промывали 3 раза раствором TBST и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, в течение 1 часа при комнатной температуре. Инкубирование с антителами проводили в TBST с добавлением 5% сухого обезжиренного молока. Детекцию белковых полос осуществляли с помощью ChemiDoc Imaging System (BioRad, США) после инкубации в растворе для хемилюминесценции (Clarity Western ECL, BioRad, США). Количественный анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения ChemiDoc Imaging System (BioRad, США).

Список антител, использованных для вестерн-блоттинга $\alpha 1A$ -, $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторов: Моноклональные антитела кролика к $\alpha 1A$ -адренорецепторам (разведение 1:1000, Abcam, ab137123), Моноклональные антитела кролика к $\beta 2$ -адренорецепторам (разведение 1:1000, Abcam, ab182136), Поликлональные антитела мыши к $\beta 3$ -адренорецепторам (разведение 1:1000, Abnova, H00000155-B01P). Антитела на фосфо-Akt (Ser-473), фосфо-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), ГАФД, а также вторичные антитела были производства Cell Signaling (США), разведение 1:1000.

2.10. ПЦР в реальном времени

Для получения проб МСК ранних пассажей от трех доноров 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 норадrenalин в концентрации 1 μ М - 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 промывали 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 клетки в паре чашек от каждого донора – контрольной и инкубированной с норадреналином. 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 для клеточных культур. 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 оптиковолоконного 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. 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 1](#), 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* [193]. 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Оценка эффективности праймеров производилась анализом кривой плавления или электрофорезом на отсутствие побочных продуктов. При этом подбор оптимальной температуры реакции осуществляется при помощи постановки реакции в диапазоне температур, с последующим анализом продуктов реакции по кривым плавления и методом электрофореза.

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

Ген	Последовательность нуклеотидов	Длина продукта, п.о.
<i>RPL13A</i>	Прямой 5'- СТСААGGTCGTGCGTCTGAA-3'	185
	Обратный 5'- АСGTTCTTCTCGGCCTGTTT-3'	
<i>ADRA1A</i>	Прямой 5'- TGCCAGATCAACGAGGAGC-3'	198
	Обратный 5'- GGCGTTTTTCCGATGGATGC-3'	

2.11. Лентивирусная трансдукция МСК

Лентивирусная трансдукция МСК использовалась для введения генетического материала в клетки для экспрессии в них биосенсора к ПКА PKA-Spark и для осуществления нокаута генов *ADRB2/ADRB3* (β 2- и β 3-адренорецептор соответственно). Чтобы доставить биосенсор PKA-Spark в МСК, его клонировали из pcDNA3-PKA-SPARK (#106920, Addgene, Watertown, MA, USA) в лентивирусный вектор переноса LeGO-iG2 (#27341, Addgene, Watertown, MA, USA) с помощью эндонуклеаз рестрикции MluI и EcoRI. Операции, произведенные с плазмидами для нокаута генов *ADRB2/ADRB3*, описаны детально в Разделе 2.12.

Лентивирусные частицы собирали в клетках HEK293T с использованием стандартного протокола трансфекции PEI [194]. Кондиционированную среду, содержащую лентивирусные частицы, собирали через 48-72 ч после трансфекции и отделяли от клеточного дебриса центрифугированием при $4000 \times g$ $4^\circ C$ в течение 15 мин. Для повышения эффективности трансдукции в среду, содержащую лентивирусные частицы, добавляли сульфат протамина (50 мкг/мл). Для трансдукции использовали МСК ранних (<3) пассажей. Клетки, культивируемые в 24-луночных планшетах, инкубировали в среде, содержащей лентивирусные частицы, и подвергали центрифугированию при $800 \times g$ RT в течение 1,5 ч для облегчения проникновения вируса. После центрифугирования среду меняли на стандартную культуральную среду и инкубировали клетки в течение ~8 ч. Процедуру трансдукции повторяли 2 раза. Между трансдукциями запас вируса хранился при $+4^\circ C$.

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

Для нокаута генов *ADRB2/ADRB3* (β 2- и β 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. Собирали лентивирусные частицы (LVP), кодирующие компоненты системы редактирования генома CRISPR/Cas9, и обрабатывали ими линейные МСК *ASC52telo*. Для подтверждения нокаута *ADRB2* или *ADRB3* ДНК выделяли из популяций линейные МСК *ASC52telo* и амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в [Таблице 2](#). Полученные ампликоны секвенировали по Сэнгеру. Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Австралия).

[Таблица 2](#). Праймеры, использованные для амплификации участков генов *ADRB2* и *ADRB3* ДНК *ASC52telo*.

Праймер	Последовательность	Длина ампликона, пн	Температура, °C
hADRB2-прямой	GCAACTTCTGGTGCGAGTT T	415	59,5

hADRB2- обратный	AAGCGGCCCTCAGATTTGT C		
hADRB3-прямой	GCAGTAGATGAGCGGGTT GAA	830	60
hADRB3- обратный	ACGTGTTTCGTGACTTCGCT		

2.13. Проточная цитометрия и клеточный сортинг

Иммунофенотип МСК и долю клеток, экспрессирующих адренергические рецепторы, анализировали с помощью проточной цитометрии. После сбора среды клетки снимали с культуральных чашек с помощью раствора Версена и окрашивали антителами против CD45 (BD Pharmingen, кат. № 557748), CD73 (BD Pharmingen, кат. № 550257), CD90 (BD Pharmingen, кат. № 555597) и CD105 (BD Pharmingen, кат. №560819). Адренергические рецепторы выявляли с помощью специфических антител α 1A (Abcam ab137123, разведение 1:250), α 1B (Abcam ab169523, 1:100), α 2A (Abcam ab65833, 1:100), α 2B (Abcam ab151727, 1:100), β 1 (Abcam ab3442, 1:100), β 2 (Abcam ab61778, 1:100), β 3 (Acris, H00000155-B01P, 1:100), после которых добавляли вторичные антитела AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch, 711-606-152, 1:500).) и AlexaFluor 594 (JacksonImmunoResearch, 111-586-045, 1:500) или антимышиные антитела, конъюгированные с красителем Dy Light549 Affinipure Goat Anti Mouse IgG(H+L) (JacksonImmunoResearch, 115-505-146) на фиксированных формалином непрмеабелизованных клетках. Нормальный кроличий IgG (10500C, Invitrogen, 1:300), нормальный мышинный IgG1 (Dako X0931, 1:20), PE-Cy5 mouseIgG1 IsotypeControl (560819, BD, 1:100) и мышинный IgG1/RPE IsotypeReagent (X0928, Dako, 1) :25) использовали в качестве отрицательных

контролей. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa Special Order Product (BD Pharmingen, США). Для анализа экспрессии каждого антигена было проанализировано 20000–40000 событий. Полученные данные анализировали и визуализировали при помощи программного обеспечения FlowJo V10. Изменение уровня экспрессии белка после преинкубации клеток с норадреналином определяли как разность между интенсивностью флуоресценции в обработанных норадреналином и контрольных клетках.

Для выяснения дифференцировочного потенциала клеток, отвечающих кальцием на норадреналин, мы разработали методику сортировки клеток по их чувствительности к норадреналину. Схема эксперимента была следующая: клетки предварительно обрабатывали норадреналином (1 μM) в течение 1 часа, отмывали от гормона и инкубировали дополнительно 4 часа в полной среде роста. Далее клетки окрашивали кальций-зависимым флуоресцентным красителем Fluo-8 AM в течение 1 часа и готовили для проведения клеточного сортирования. Повторная гормональная стимуляция, необходимая для реализации эффекта $\alpha_1\text{A}$ -адренорецепторов, появляющихся при гетерологической сенситизации, производилась непосредственно в сортере. Клетки сортировали по яркости флуоресценции кальциевого красителя (Рис. 2.2).

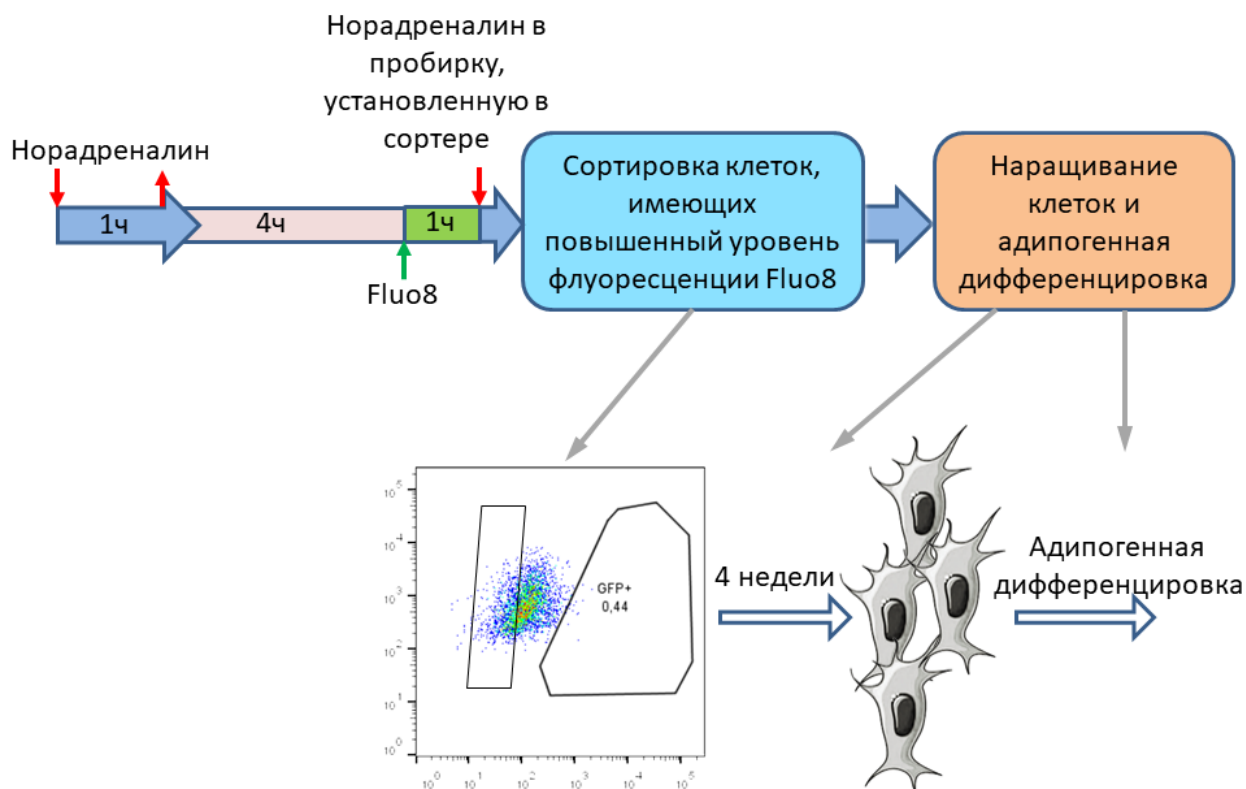


Рис. 2.2. Схема эксперимента по сортировке клеток, отвечающих на норадреналин повышением цитоплазматического кальция.

Клетки сортировались на две группы: клетки, обладающие высоким уровнем флуоресценции и клетки из нижнего квартиля гистограммы распределения флуоресценции по яркости (Рис. 2.2). В контрольную группу брались клетки низкой яркости из тех соображений, что там вероятность встречи клеток, ответивших на норадреналин, но оставшихся в пределах облака распределения, наименьшая. Доля клеток, попадающих в число сортируемых в данном протоколе была низкая, что может быть связано с несинхронностью ответов клеток на норадреналин и с различной базальной яркостью клеток перед стимуляцией их норадреналином в сортере. Далее мы вырастили клетки до достижения ими монослоя и направили в адипогенную дифференцировку.

2.14. Адипогенная дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Клетки направляли в адипогенную дифференцировку при помощи редуцированного дифференцировочного коктейля для адипогенной дифференцировки МСК – смеси инсулина (10 нг/мл), ингибитора фосфодиэстераз изобутиметилксантина (ИБМХ, 0,5 мМ) и синтетического глюкокортикоида дексаметазона (1 μ М). Мы намеренно исключили из дифференцировочного коктейля индометацин (100 μ М), который обычно входит в стандартный коктейль адипогенной дифференцировки, поскольку он является прямым активатором мастер-гена адипогенной дифференцировки PPAR γ . Мы его не добавляли в дифференцировочный коктейль, поскольку, по нашим данным, индометацин, активируя напрямую PPAR γ , в обход инсулин-зависимых сигнальных путей, нивелирует тонкую настройку процесса адипогенной дифференцировки, обусловленную гормональной регуляцией МСК.

Оценку влияния норадреналина или его агонистов на адипогенную дифференцировку производили следующим образом. Обработку МСК норадреналином мы осуществляли в двух вариантах: однократная обработка клеток гормоном и обработка с предварительной инициацией гетерологической сенситизации клеток. Во втором случае клетки за 6 часов до постановки на адипогенную дифференцировку предобработывали норадреналином в течение 1 часа с последующей тщательной отмывкой от гормона. Непосредственно перед запуском адипогенной дифференцировки в обоих случаях клетки обрабатывали норадреналином в течение 1 часа. Далее клетки отмывали и помещали в коктейль для адипогенной дифференцировки. Коктейль меняли на свежий каждые три-четыре дня (два раза в неделю). Таким образом, норадреналин действовал на клетки только в течение короткого периода времени перед запуском дифференцировки.

Выяснение того, как активация $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов при поочередной стимуляции в различных комбинациях влияли на адипогенную дифференцировку МСК, производили следующим образом. Клетки стимулировали агонистом $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином (100 μM), либо агонистом β -адренорецепторов добутамином (1 μM). В случае ингибиторного анализа клетки обрабатывали норадреналином в присутствии SQ22536 (1 μM), селективного ингибитора ключевого сигнального фермента, активируемого β -адренорецепторами аденилат-циклазы либо норадреналином в присутствии 2-АРВ (50 μM), ингибитора рецептора инозитол-(1,4,5)трис-фосфата (ИФ₃Р), ключевого вторичного посредника сигнала от рецепторов, сопряженных с Gq-белком, кальциевой сигнализации (в случае совместной с норадреналином стимуляции ингибируется сигнализация от $\alpha 1$ -адренорецепторов). Чтобы ингибиторы достоверно подействовали, их добавляли за 30 минут до стимуляции клеток норадреналином. Первая стимуляция агонистами рецепторов и ингибиторами длилась 1 час, после чего клетки тщательно отмывали трехкратной заменой среды и помещали в полную среду роста. Через 5 часов клетки повторно стимулировали селективными агонистами адренорецепторов или норадреналином в присутствии ингибиторов, также в течение 1 часа. Для выяснения участия катехоламин-зависимой сенситизации в регуляции дифференцировки МСК в бежевые адипоциты мы измеряли уровень экспрессии мРНК разобщающего белка митохондрий, UCP1. Сбрасывая трансмембранный электрохимический потенциал протонов на внутренней мембране митохондрий, в результате чего выделяется тепло, этот белок является специфическим маркером адипоцитов бурой жировой ткани и образующихся бежевых адипоцитов белой жировой ткани.

2.15. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой в режиме реального времени на уровне единичных клеток

Для прямого наблюдения за дифференцировочной судьбой клеток, подвергшихся гетерологической сенситизации, а также для независимой

проверки данных о дифференцировочном потенциале этих клеток мы провели дифференцировку клеток в режиме реального времени под микроскопом после наблюдения за кальциевыми ответами на норадреналин. Для этого на первом этапе мы подобрали условия для анализа адипогенной дифференцировки МСК в режиме реального времени на уровне одиночных клеток. Клетки высаживали на культуральные планшеты в плотности, близкой к конфлюентному монослою. Клетки красили кальций-чувствительным красителем Fluo-8 AM (4 μ M) в течение 1 часа и после этого под микроскопом стимулировали клетки норадреналином и регистрировали кальциевые ответы на уровне одиночных клеток. После приблизительно 1 часа инкубации с норадреналином клетки отмывали и переводили в среду для адипогенной дифференцировки. После этого планшет был возвращен под микроскоп, оснащенный инкубатором с увлажнением и подводом газовой смеси, необходимой для культивирования клеток. Планшет был позиционирован так, чтобы он вернулся точно на ту же позицию, в которой проводилась съемка кальциевой сигнализации. После этого планшет находился под микроскопом в течение двух недель. При этом каждые 3-4 дня фильм останавливали, под ламинаром заменяли среду на новую адипогенную и ставили планшет обратно под микроскоп. Фотографии клеток делали с интервалом 1 час. Этот интервал был выбран таким, чтобы отдельные клетки не успевали далеко уползти или изменить форму так, что их было бы невозможно идентифицировать. После окончания съемки фильма мы проследили за дифференцировочной судьбой клеток, ответивших на норадреналин кальцием.

Чтобы напрямую проверить, превращались ли МСК, подверженные гетерологической сенситизации, в бежевые адипоциты, мы усложнили описанный выше эксперимент. Перед регистрацией кальциевой сигнализации под микроскопом, мы предварительно индуцировали в клетках гетерологическую сенситизацию за 6 часов до повторной стимуляции. Повторную стимуляцию клеток мы проводили уже под микроскопом с

регистрацией внутриклеточных кальциевых событий при помощи красителя Fluo-8 AM. После завершения адипогенной дифференцировки, которая длилась 14 суток, мы сразу зафиксировали клетки и окрасили их иммуоцитохимически на наличие маркера адипогенной дифференцировки и маркера бежевых адипоцитов UCP1.

2.16. Наблюдение за митотической активностью клеток

Мезенхимные клетки (линейные фибробласты NIH-3T3) высевали на 12-луночные планшеты в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (HyClone, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, США) и культивировали до 10-20% от конфлюентного монослоя. Затем клетки депривировали в течение 12-16 часов в среде DMEM с добавлением 0.5% FBS. Соответствующие ингибиторы к клеткам добавляли за 30 минут до стимуляции клеток PDGF-BB (10 нг/мл). Проводили серийную съемку с помощью микроскопа Nikon Ti (Nikon, Япония) и охлаждаемой CCD камеры. Живые клетки и их деления считали вручную с помощью программного обеспечения ImageJ. Подсчет митотической активности фибробластов проводили по ранее описанной методике [195]. Для этого определяли отношение количества делений клеток, произошедших на протяжении 24 часов наблюдения, к общему числу клеток в начальный момент времени эксперимента. Мы обнаружили, что митотическая активность клеток крайне сильно зависит от конфлюентности и варьирует между опытами, поэтому митотическую активность, рассчитанную по методике, описанной выше, нормировали на значение митотической активности депривированных клеток, культивируемых без ингибиторов, в каждом конкретном эксперименте.

2.17. Измерение скорости миграции клеток

МСК выращивали до конфлюентного монослоя в 12-луночных планшетах в полной среде роста. Затем клетки депривировали в DMEM с 0,1% FBS в течение 6-8 часов. Затем МСК поместили в среду роста без добавления FBS на 24 часа.

В монослое клеток прочерчивали экспериментальную рану кончиком пипетки объемом 1 мл за 30 минут до стимуляции PDGF-BB (конечная концентрация 10 нг/мл) или EGF (конечная концентрация 20 нг/мл), промывали средой и добавляли DMEM, содержащую 0,1% FBS. Ингибиторы или растворитель добавляли за 30 минут до стимуляции до конечных концентраций 2 мМ для апоцинина (ингибитор НАДФН-оксидаз) и 40 ед./мл для ПЭГ-конъюгированной каталазы (проницаемой через плазматическую мембрану). Затем культуральные чашки переносили на микроскопический столик моторизованного инвертированного микроскопа Nikon Ti (Nikon, Япония), оснащенного 4-кратным объективом, культуральным боксом на столике, регулятором температуры, установленным на 37°C, и блоком непрерывного введения CO₂. Кадры цейтраферной съемки снимались каждые 10 минут в течение 24 часов с использованием охлаждаемой ПЗС-камеры (Nikon, Япония) и приложения «Mark and Find» в NIS Elements (Nikon, Япония) для достижения одновременного получения изображений во всех 12 лунках планшета. Фильмы анализировались путем ручного отслеживания всех клеток на краях экспериментальных ран и измерения их скорости в двух случайно выбранных положениях раневых участков с использованием программного обеспечения ImageJ. Обычно для каждой точки данных в одном из шести независимых экспериментов отслеживали 50-60 клеток, что в общей сложности составляло более 300 клеток на точку.

2.18. Визуализация активации ПКА для регистрации активности цАМФ-зависимого сигнального каскада

Для регистрации активации ПКА с помощью биосенсора РКА-Spark мы выращивали трансдуцированные биосенсором клетки в 24- или 48-луночных планшетах при низкой плотности, чтобы предотвратить межклеточные коммуникации во время визуализации сигналинга. Перед началом эксперимента ростовую среду меняли на сбалансированный солевой раствор Хенкса (ПанЭко, Москва, Россия) с 20 мМ ХЕПЕС (HyClone, Logan, UT, США).

Для анализа функциональной активности клетки обрабатывали 1 μ M норадреналина (Abscam, Кембридж, Великобритания) после регистрации базальной активности клеток. Активацию ПКА измеряли в отдельных клетках с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Токио, Япония) и цифровой охлаждаемой монохромной CCD-камерой Nikon DS-Qi1 (Nikon, Токио, Япония). Для увеличения количества анализируемых клеток использовали одновременное измерение 6 \times 6 полей зрения в режиме Large Image. Видеозаписи анализировали с помощью программ NIS-Elements (Nikon) и ImageJ (НИН, Bethesda, MD, USA).

Для оптимизации обнаружения локальной активации ПКА с помощью биосенсора РКА-Spark мы использовали клеточную линию HeLa-Kyoto. Эти клетки были трансфицированы плазмидой, кодирующей РКА-Spark, с помощью реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega, Logan, UT, США) в соответствии с инструкцией производителя. Через 24 часа после трансфекции мы стимулировали эти клетки серотонином и регистрировали образование флуоресцентных агрегатов в цитоплазме, что соответствовало активации Gs/аденилат-циклаза/ПКА-зависимой сигнализации. Важно отметить, что только клетки с высоким уровнем экспрессии РКА-Spark демонстрировали образование агрегатов в ответ на гормон (Рис. 2.3 А-Б). Ответ остальных клеток можно было зарегистрировать только через 1-2 дня, когда экспрессия РКА-Spark достаточно возростала. Таким образом, анализу подлежат только клетки с достаточным уровнем экспрессии биосенсора. Для дальнейшего анализа ответов МСК мы сначала определили пороговый уровень экспрессии биосенсора, позволяющий обнаружить образование флуоресцентных агрегатов в цитоплазме, и в анализ брали только клетки с экспрессией РКА-Spark, превышающей установленный порог. Чтобы оптимизировать количественную оценку образования флуоресцентных агрегатов, мы сравнили 3 альтернативных подхода: (1) сигнал РКА-Spark определяли как сумму интенсивности пикселей

флуоресцентных капель, деленную на сумму интенсивности пикселей клеток [196]; (2) сигнал определяли как изменение стандартного отклонения (SD) интенсивности изображения; и (3) сигнал PKA-Spark рассчитывали как сумму площадей всех флуоресцентных капель после вычитания фона с помощью инструмента "Rolling-ball" (программа ImageJ, Bethesda, MD, USA) (Рис. 2.3Б-В). Мы обнаружили, что последний подход - подсчет общей площади флуоресцентных агрегатов - показывает минимальный уровень сигнала в отсутствие стимуляции (Рис. 2.3Г) и наибольшую контрастность (Рис. 2.3Д). Поэтому для дальнейшего анализа мы использовали именно этот подход для количественной оценки ответов МСК. Изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ. Мы также проанализировали обратимость сигнала и обнаружили, что PKA-Spark демонстрирует очень медленную динамику распада флуоресцентных капель, и капли частично сохранялись через 30 мин после вымывания гормона. Таким образом, повторная гормональная стимуляция одних и тех же клеток, которая обычно используется при регистрации кальциевых сигналов [197], для данного метода детекции была невозможна.

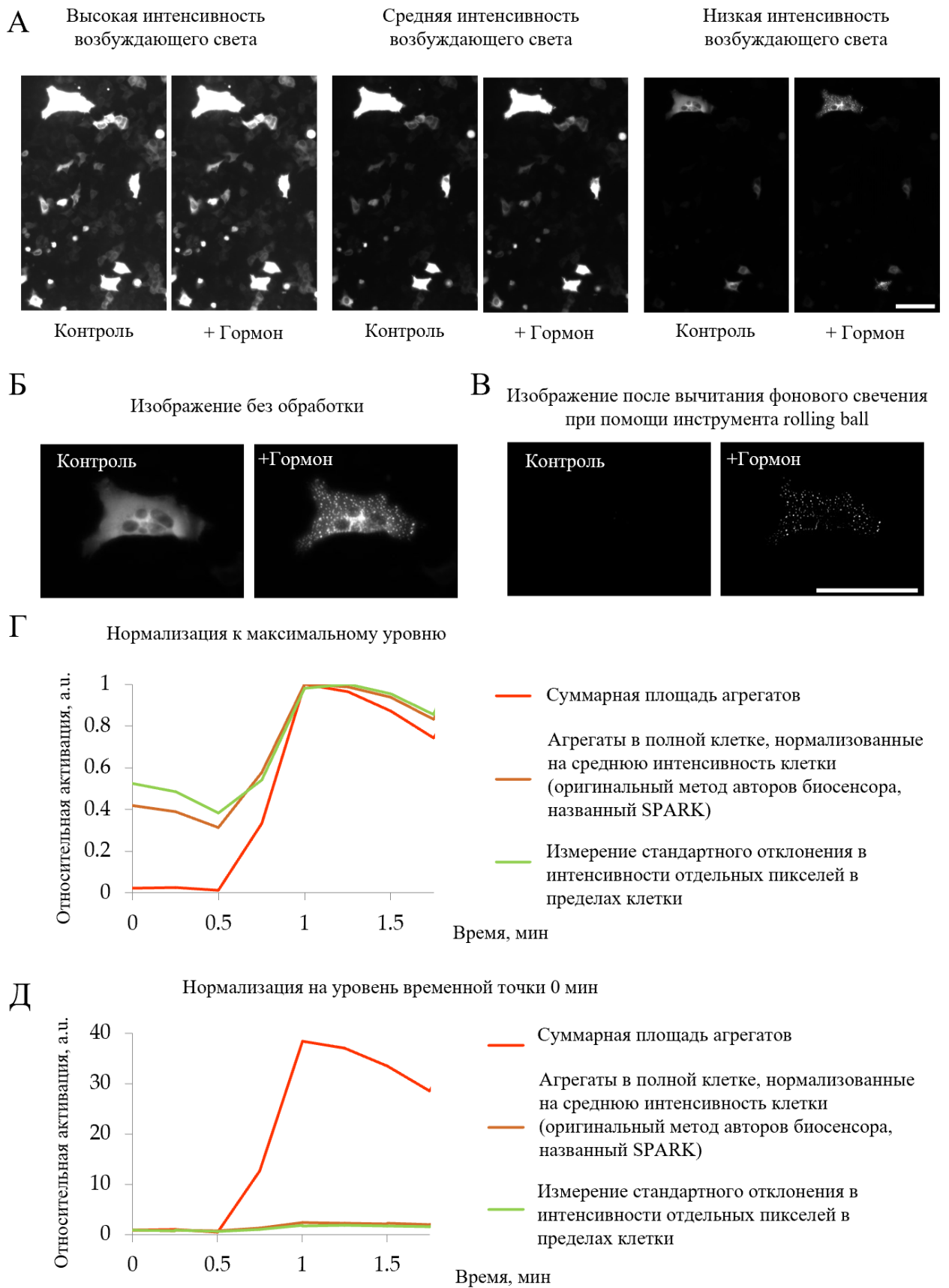


Рис. 2.3. Отработка метода регистрации активности ПКА с помощью флуоресцентного биосенсора PKA-Spark. А – PKA-Spark экспрессировали в клетках HeLa-Kyoto с различными

уровнями экспрессии и стимулировали серотонином (10 μ M). Флуоресценция в одном и том же поле зрения регистрировалась при разной интенсивности освещения (интенсивность возбуждающего света отмечена над изображениями). Видно, что только наиболее яркие клетки, экспрессирующие зонд с относительно высоким уровнем, демонстрировали гормон-зависимый ответ. Масштабная линейка 100 мкм. Б-В. – Обработка флуоресцентных изображений отвечающих клеток. Б – Отвечающая клетка до и после добавления гормона без обработки изображений. В – Флуоресцентные изображения после вычитания фона с использованием инструмента Rolling-ball в программе ImageJ. Масштабная линейка 100 мкм. Г-Д - Проверка различных стратегий количественной оценки образования флуоресцентных капель биосенсора PKA-Spark. Г – Результаты количественного анализа нормированы на максимальный измеренный уровень. Д – Результаты количественного анализа нормированы на значения в нулевой временной точке.

2.19. Работа с мышами. Индукция побурения. Локальная симпатэктомия эпидидимального жирового депо

Все экспериментальные манипуляции с животными осуществлялись сотрудниками, прошедшими специальное обучение (курс повышения квалификации «Современные методы использования лабораторных грызунов в трансляционных биомедицинских исследованиях») и имеющих соответствующие сертификаты. Лабораторные животные содержались в условиях вивария лаборатории трансляционной медицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова. Виварий имеет достаточный штат подготовленных сотрудников для обеспечения условий содержания животных и работы с ними в соответствии с международными стандартами (Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях Convention ETS №123 (Страсбург, 18 марта 1986 г). Условия вивария одобрены комиссией по биоэтике МГУ (заявка № 3.5-сод, одобрена 17.03.2022, продлена 19.05.2023).

В эксперименте использовались самцов мышей линии C57Bl6/N возрастом 8-12 недель. Мышей содержали в стандартных условиях вивария лаборатории

трансляционной медицины, температура 20-24°C, влажность воздуха 30-70%, искусственное освещение с фотопериодом 12/12, стандартный корм и питьевая вода доступны круглосуточно без ограничения. Дизайн эксперимента построен на оценке эффективности побурения белого жира в предварительно десимпатизированных эпидидимальных жировых депо (eWAT), при этом парный eWAT всегда использовался в качестве контрольного. Для проведения локальной симпатэктомии использовали следующий протокол: Манипуляции с животными проводили под общим ингаляционным наркозом (ингаляция воздушной смесью с содержанием 2 - 4% препарата Изофлюран (Laboratorios Karizoo, S. A., Spain) и около 93% кислорода (использовался испаритель V3000 Parkland Scientific с кислородным концентратором Nuvo Lite 52). Операционное поле выбривали от шерсти и обрабатывали кожным антисептиком АХД-2000. После этого делали короткий (3-5 мм) разрез по средней линии в нижней трети брюшной поверхности, прорезая кожу и подлежащие мышечные слои брюшной стенки. В получившийся разрез последовательно выводили жировые депо сначала правого (опытного), затем левого (контрольного) эпидидимиса. В опытный eWAT с помощью шприц-ручки (Санофи-Восток, Россия) делали 12 инъекций по периметру жирового депо по 3,3 мкл. р-ра гуанетидина (MedChem Express LLC, США) в стерильном PBS концентрацией 10 мг/мл [198] или 6-гидроксидофамина (Sigma, St Louis MO) концентрацией 9 мг/мл. В контрольный eWAT вводили стерильный ФСБ таким же способом в таком же объеме. После введения жировые депо помещали обратно в полость тела, а разрез ушивали послойно викрилом (Ethicon 5-0 игла 16 колноще-режущая). Всего использовали 10 мышей для эксперимента с гуанетидином и 5 для эксперимента с 6-гидроксидофамином. После выхода из наркоза мышей помещали в домашнюю клетку и наблюдали в течение 10-15 минут до восстановления нормального поведения.

Для индукции побурения мышам вводили внутрибрюшинно раствор β 3-агониста (CL-316243, Sigma) в стерильном PBS в дозе 0,1 мг/кг массы тела

(объем около 100 мкл на мышь) ежедневно в течение 7 дней. На 8-ой день мышей эвтаназировали передозировкой анестетика (смесь Zoletil 100 (Virbac, France) концентрацией 30 мг/мл и Xyla (Interchemie werken “De Adelaar” Eesti AS) концентрацией 3 мг/мл объемом 300 мкл на мышь) после чего проводили некропсию и забирали ткани обоих eWAT для последующего анализа. Всего использовали 17 мышей для эксперимента с локальной симпатэктомией гуанетидином с последующей индукцией побурения.

2.20. Определение концентрации норадреналина в парных депо жировой ткани мыши

Содержание норадреналина в эпидидимальной жировой ткани мыши определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ион-парная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД), на жидкостном хроматографе System Gold (Beckman Coulter, Inc., США), оснащенный амперометрическим детектором RECIPE EC 3000 (Германия), с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов - 20 мкл. Катехоламины хроматографически разделяли на обращенно-фазной колонке Nucleodur C18 Gravity, 4,6×250 мм, диаметр пор 5 мкм (Mashery-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Использовали насос System Gold 125 (Beckman Coulter, Inc., США), скорость потока подвижной фазы - 1 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза для разделения катехоламинов: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрила (рН 3,0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора RECIPE EC 3000 (Германия), оборудованном измерительной ячейкой ClinLab ECD-Cell, Model Sputnik, со стеклоглеродным рабочим электродом (+ 0,85 V) и хлорсеребряным электродом сравнения Ag/AgCl. Перед хроматографированием катехоламины изолировали из гомогената эпидидимальной жировой ткани мыши методом твёрдо-фазной экстракции с применением в качестве экстрагента активированного оксида алюминия.

2.21. Хондрогенная дифференцировка

Для индукции дифференцировки МСК в хондрогенном направлении использовали «StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit» (Gibco, США) по инструкции производителя. Центрифугированием (300g, 10 мин) в 15 мл пробирках (Corning, США) формировали осадки, состоящие из 350 тыс. клеток. Супернатант утилизировали, а к осадку аккуратно добавляли 1,5 мл дифференцировочной среды, после чего обычные пробки 15 мл пробирок заменяли на аналогичные со встроенным воздушным фильтром.

Через 4 суток после начала эксперимента клеточные осадки трансформировались в сфероиды, что позволяло производить смену среды каждые 3-4 суток без центрифугирования. По завершении протокола дифференцировки сфероиды замораживали в среде Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США). На криотоме Leica CM1850 с каждого образца получали не менее 10 срезов толщиной 10 μ М, которые помещали на одно покровное стекло и фиксировали 4% раствором формальдегида в ФСБ в течение 15 мин. После промывки в ФСБ стекла со срезами дифференцированных и контрольных сфероидов окрашивали раствором альцианового синего (Sigma, США) для окраски полисахаридов и муцинов. Окрашенные срезы фотографировали на микроскопе Leica DM6000, оснащенный камерой DFC420, а анализ результатов проводили в программе Fiji (NIH, США).

2.22. Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., Калифорния, США) и R-studio 1.4 (RStudio, Бостон, США) с помощью пакета Stats в языке программирования R. Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Для сравнения нормально

распределенных данных использовали t-критерий Стьюдента для двух независимых групп. Для ненормально распределенных данных использовали тест Манна-Уитни для двух независимых групп. Сравнение трех и более независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Чтобы определить, какие именно пары средних значений статистически значимо различаются, использовали тест Даннета. Наличие корреляции между способностью клеток к сенситизации к норадреналину после симпатического овердрайва и параметрами доноров выявляли методом Пирсона. Статистическую значимость определяли как значение $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеризация МСК

3.1.1. Определение МСК

Гормональную регуляцию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) мы изучали на примере МСК, выделенных из подкожной жировой клетчатки человека. Большинство экспериментов было проведено на МСК, выделенных из подкожного жира живота здоровых пациентов, которые оперировались по причине травм, ортопедических заболеваний или в косметологических отделениях. Таким образом, все доноры жировой ткани, использованной в данной работе, были здоровыми, без хронических метаболических заболеваний, средний индекс массы тела (ИМТ) составил 25,6 (детальное описание доноров в Приложении 2). МСК, выделяемые из жира, отвечали всем критериям мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, сформулированным международным обществом [4, 153]. Выделяемые нами МСК экспрессировали ключевые маркеры CD73, CD90 и CD105 и не экспрессировали общий маркер гематопоезических предшественников CD45 (Рис. 3.1). Фенотипически МСК представляли собой веретеновидные клетки (Рис. 3.2). Клетки проявляли мультипотентность, которая проявлялась в способности к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях (Рис. 3.3А-В).

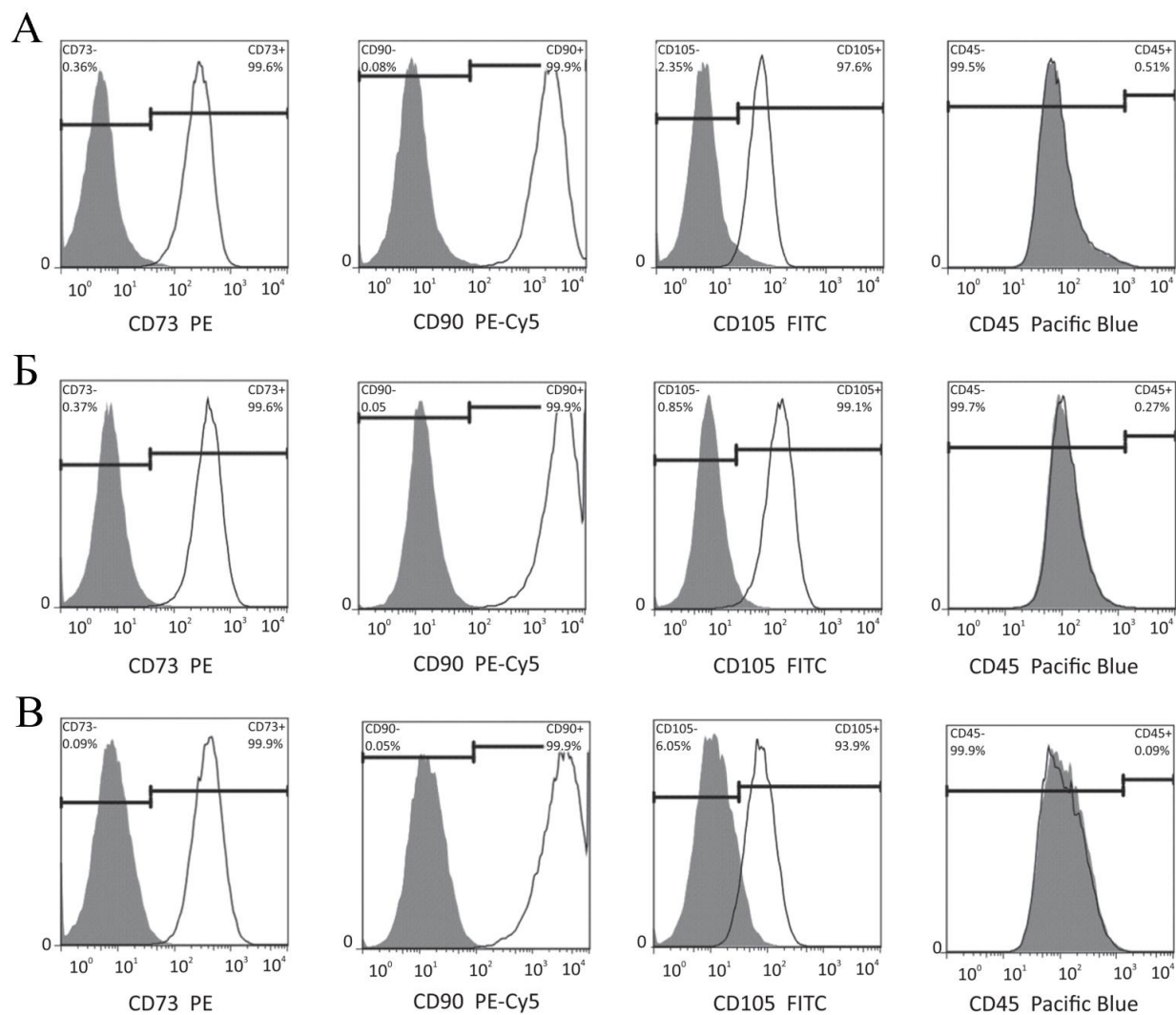


Рис. 3.1. Экспрессия маркеров МСК на поверхности клеток, выделяемых из подкожной жировой ткани. Результаты проточной цитометрии на экспрессию поверхностных маркеров CD73, CD90 и CD105, специфичных для МСК, и маркера лимфоцитов CD45. Все маркеры анализировали параллельно по четырем флуоресцентным каналам: PE – R-фиикоэритрин (CD73), PE-Cy5 – тандемный флуорохром, сочетающий в себе PE и цианиновый краситель (CD90), FITC – изотиоцианат флуоресцеина (CD105) и Pacific Blue (CD45). Контрольные IgG – закрашенные графики серого цвета. Черной линией показан график флуоресценции МСК, покрашенных на представленность поверхностного маркера. Название маркера и краситель, связанный с антителами, приведены под графиками.

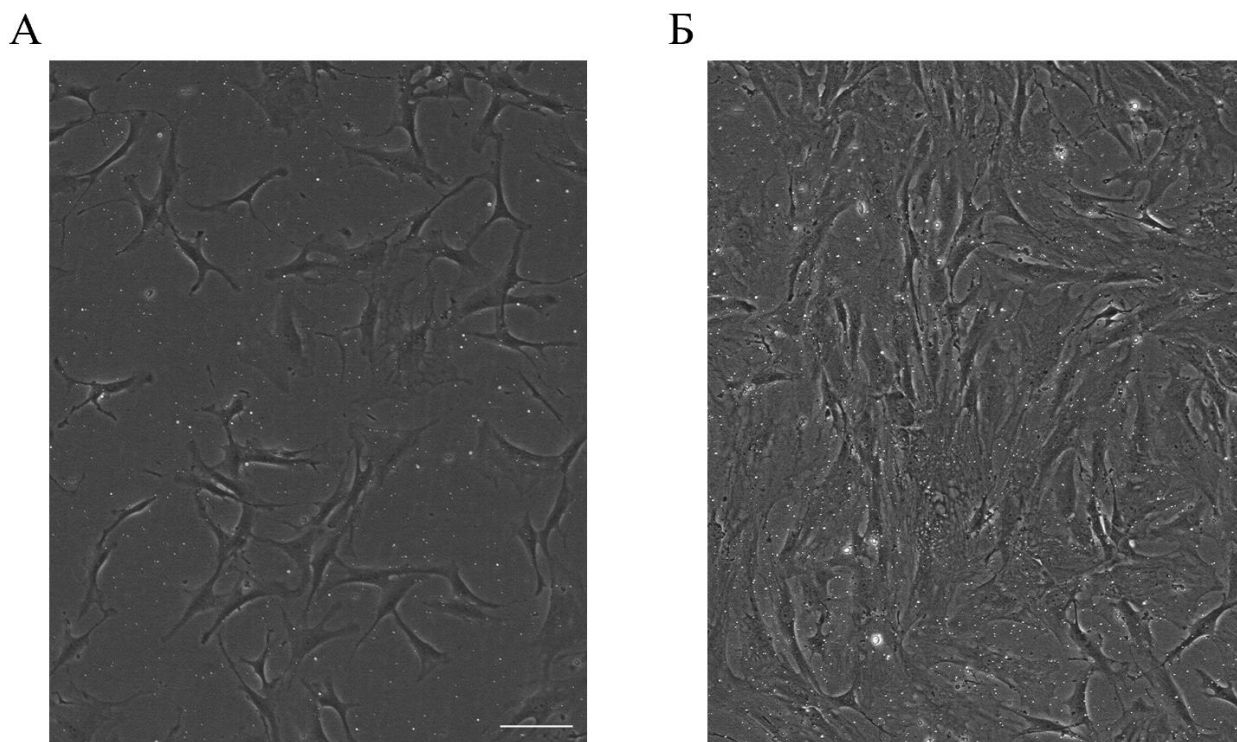


Рис. 3.2. Микрофотографии культур МСК при редкой (А) и густой (Б) посадке. Масштаб 10 μ М.

3.1.2. Гетерогенность МСК по способности к дифференцировке

Несмотря на то, что МСК удовлетворяли минимальным критериям, входящим в определение этих клеток, данное Международным обществом клеточной терапии [153], и достаточно гомогенно экспрессировали поверхностные маркеры МСК (см. Рис. 3.1), эти клетки проявляли значительную гетерогенность по способности к выполнению функции (функциональная гетерогенность). Например, если внимательно посмотреть на адипогенную дифференцировку МСК, окажется, что лишь 20-80% клеток подвергалось адипогенной дифференцировке (результаты 5 независимых экспериментов) (Рис. 3.3А). Точная цифра в значительной степени зависит от свойств клеток конкретного донора и от плотности посадки клеток в культуре, но всегда значительно ниже 100%. Эффективность остеогенной дифференцировки сложно измерить, подсчитав число одиночных клеток,

прошедших в дифференцировку, поскольку клетки откладывали оссификаты внеклеточно, но опять же, отложение кальциевых оссификатов осуществлялось неравномерно в культуре МСК (Рис. 3.3Б).

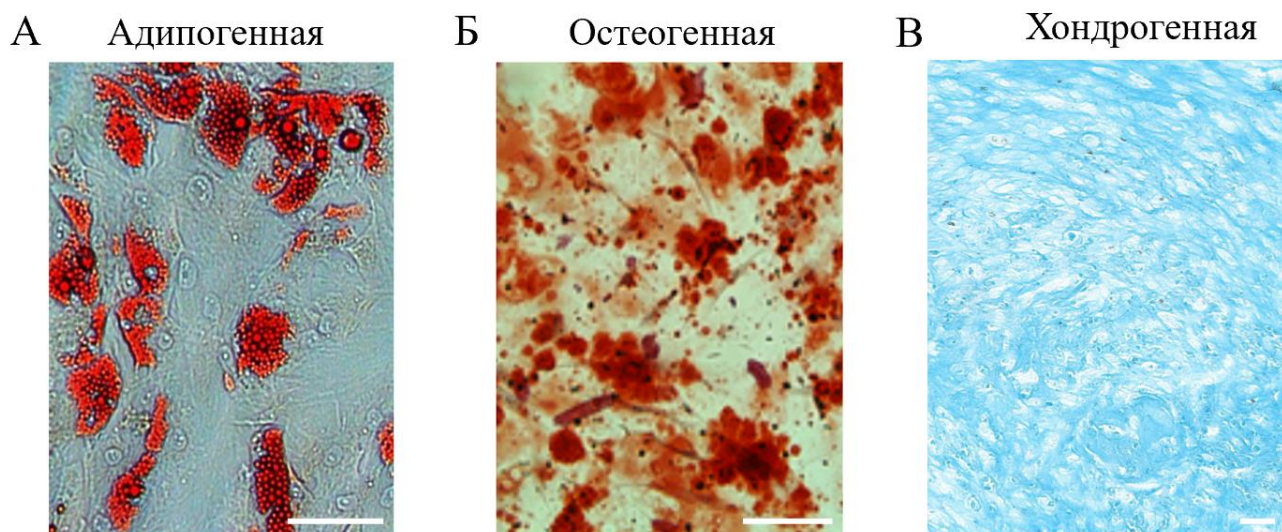


Рис. 3.3. МСК проявляют мультипотентность. В определенных условиях они способны дифференцироваться в адипогенном (А), остеогенном (Б) и хондрогенном направлениях. Адипогенная дифференцировка окрашена красителем нейтральных липидов Oil Red O, остеогенная дифференцировка окрашена красителем отложений гидроксиапатита кальция ализариновым красным, хондрогенная дифференцировка окрашена альциановым синим, красителем полисахаридов и муцинов. Масштаб 50 μM .

3.1.3. Гетерогенность МСК по их подвижности

МСК также проявляли высокую гетерогенность по своим миграционным свойствам. При измерении миграционной активности МСК на уровне одиночных клеток оказывалось, что некоторые отдельные клетки популяции мигрировали относительно быстро и за время наблюдения продвигались на большие расстояния. Другие отдельные клетки в течение большей части времени наблюдения оставались на месте (Рис. 3.4А-Б миграция МСК и траектории отдельных клеток). Изложенные наблюдения подтверждаются также литературными данными. Так, было показано, что в популяции

мезенхимных клеток не все клетки способны к клональному росту, при получении клонов-потомков одиночных клеток мультипотентные свойства в популяции распределены также неравномерно [199, 200]. Более того, функциональные свойства мезенхимных клеток могут изменяться в зависимости от действующих на них механических стимулов. Так, клетки-потомки одной изолированной клетки различаются по своему фенотипу и по функциональным свойствам в зависимости от нахождения в центре или по краям колонии [201].

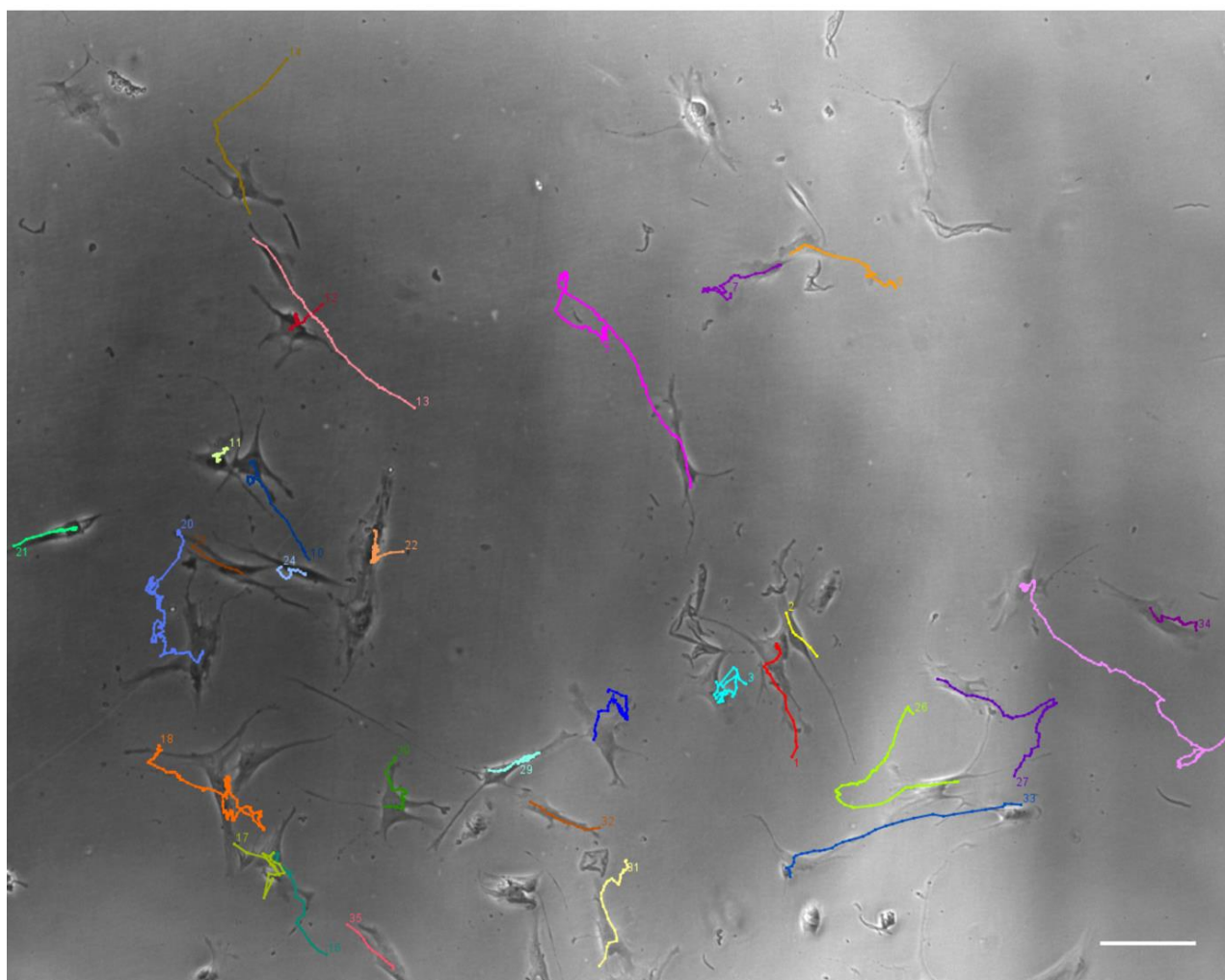


Рис. 3.4. МСК проявляли гетерогенность по своим миграционным характеристикам. Приведено репрезентативное поле зрения микроскопа с высаженными МСК, миграция которых регистрировалась при помощи цейтраферной съемки в проходящем свете с интервалом 30 мин между кадрами на протяжении 1 суток. Для каждой клетки приведена траектория ее движения в течение времени наблюдения. Некоторые клетки мигрировали быстрее других, какие-то на протяжении всего времени наблюдения оставались на месте.

Кроме того, гетерогенность проявлялась и в нерегулярности движения единичных клеток. Масштаб 10 μ М.

3.1.4. Гетерогенность МСК по гормональной чувствительности

Мы охарактеризовали гормональную чувствительность МСК на уровне одиночных клеток. Для регистрации внутриклеточной кальциевой сигнализации на уровне одиночных клеток мы использовали проникающий в цитоплазму флуоресцентный краситель Fluo-8 AM, который усиливает свою флуоресценцию в ответ на повышение уровня кальция в цитоплазме. Мы протестировали кальциевые ответы на ряд гормонов, для которых показаны кальций-мобилизующие рецепторы. Мы проверили, как отвечали МСК на норадреналин, ангиотензин II, серотонин, глутамат, γ -аминомасляную кислоту (ГАМК), дофамин. Как видно из [Рис. 3.5](#), не все МСК отвечали на гормональную стимуляцию единообразно. Не все клетки популяции отвечали на добавленные гормоны. Так, на ангиотензин отвечало 47% клеток популяции, на серотонин – 17%, на норадреналин – 15%, на дофамин – 7%, на ГАМК – 8%, на глутамат – 3,6%. Кроме того, ответы индивидуальных клеток различались. На [Рис. 3.5, Б-Ж](#) показаны репрезентативные ответы МСК на различные гормоны. Так, на ангиотензин II и глутамат некоторые отдельные клетки отвечали высокоамплитудными ответами, а другие – с низкой амплитудой. В ответ на серотонин не только различалась амплитуда ответов, но в некоторых клетках запускались ритмичные кальциевые осцилляции.

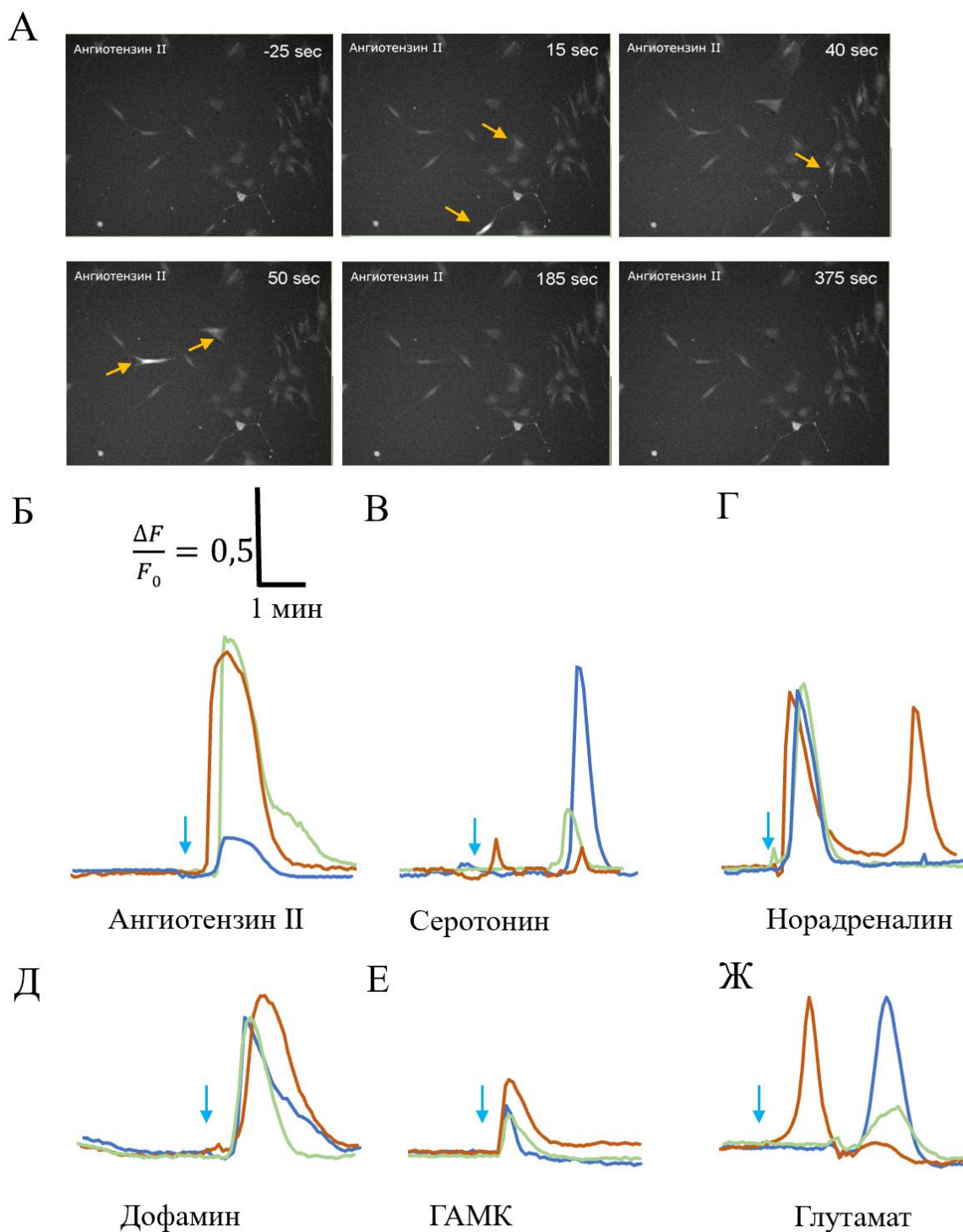


Рис. 3.5. Репрезентативные ответы МСК на некоторые гормоны-регуляторы, запускающие внутриклеточную кальциевую сигнализацию. А. Отдельные моменты времени фильма, снятого в цейтраферном режиме, который показывает ответ МСК на добавление ангиотензина II. Стрелками показаны отдельные клетки, внутриклеточный уровень кальция в которых транзиторно повысился в данный момент времени. Б-Ж – репрезентативные ответы МСК на ангиотензин II (Б, 10 нМ), серотонин (В, 10 мкМ), норадреналин (Г, 1 мкМ), дофамин (Д, 50 мкМ), гамма-аминомасляная кислота (Е, ГАМК, 20 мкМ), глутамат (Ж, 10 мкМ). Все графики указаны в едином масштабе, масштабные линейки амплитуды ответа и времени указаны около графиков ответов на ангиотензин II. Голубыми

стрелками указан момент добавления соответствующего гормона. Кальциевые ответы регистрировали при помощи флуоресцентного красителя Fluo-8 AM.

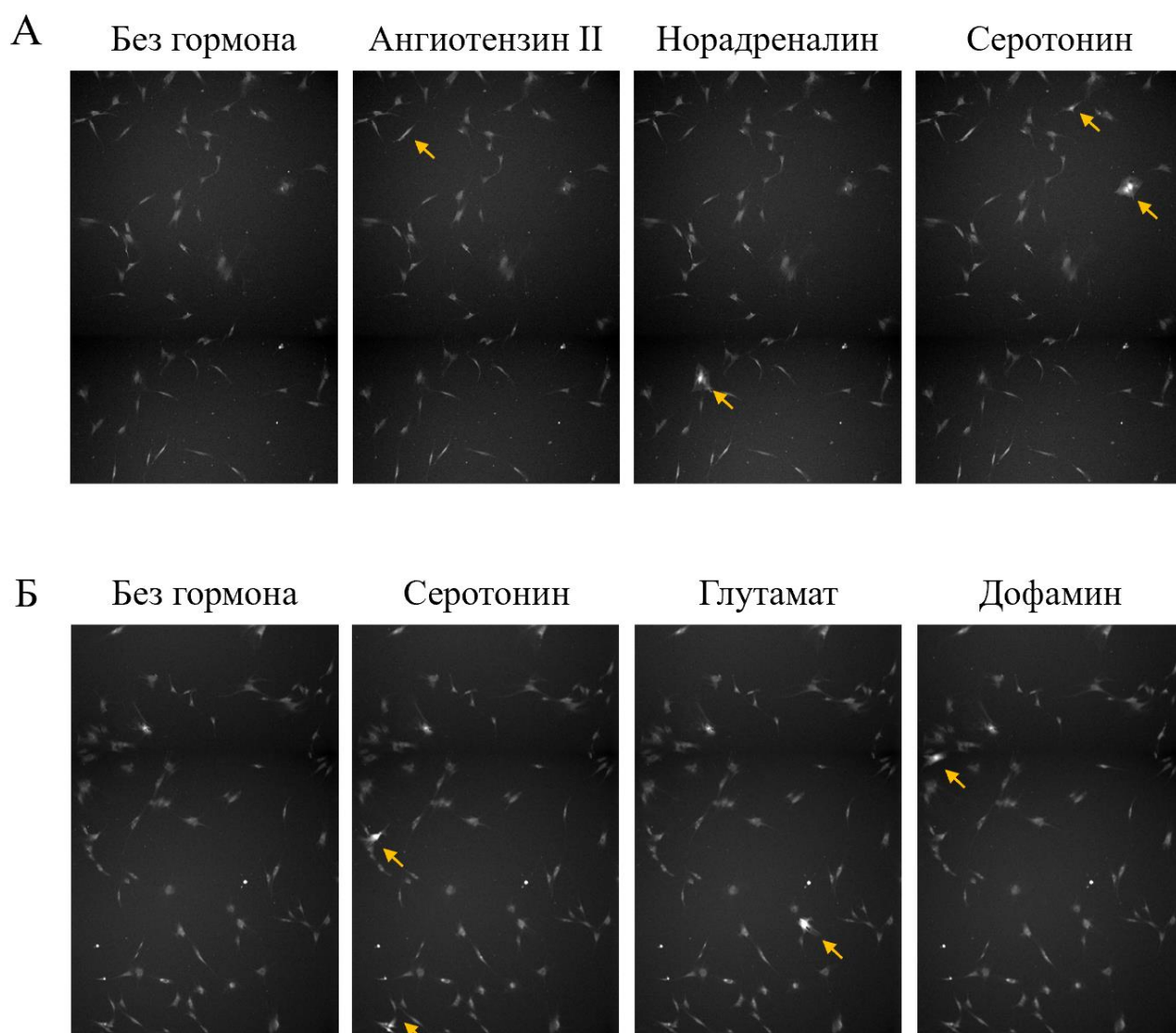


Рис. 3.6. Последовательные воздействия на одни и те же МСК различными гормонами с отмычками между добавляемыми гормонами. А. – Фильм, на протяжении которого были последовательно добавлены ангиотензин II (10 нМ), норадреналин (1 μ М), серотонин (10 μ М). Б. – Фильм, на протяжении которого были последовательно добавлены серотонин (10 μ М), глутамат (10 μ М), дофамин (50 μ М). Стрелками указаны отвечающие клетки. Кальциевые ответы регистрировали при помощи флуоресцентного красителя Fluo-8 AM.

Далее мы проверили, как распределена чувствительность к кальций-мобилизирующим гормонам в популяции МСК. Мы последовательно

стимулировали одну и ту же популяцию клеток различными гормонами. Как видно на [Рис. 3.6](#), на разные гормоны преимущественно отвечали разные клетки. Таким образом, МСК проявляли высокую степень функциональной гетерогенности в отношении чувствительности к кальций-мобилизующим гормонам; на уровне одиночных клеток отдельные клетки оказывались чувствительными к одному, реже двум гормонам.

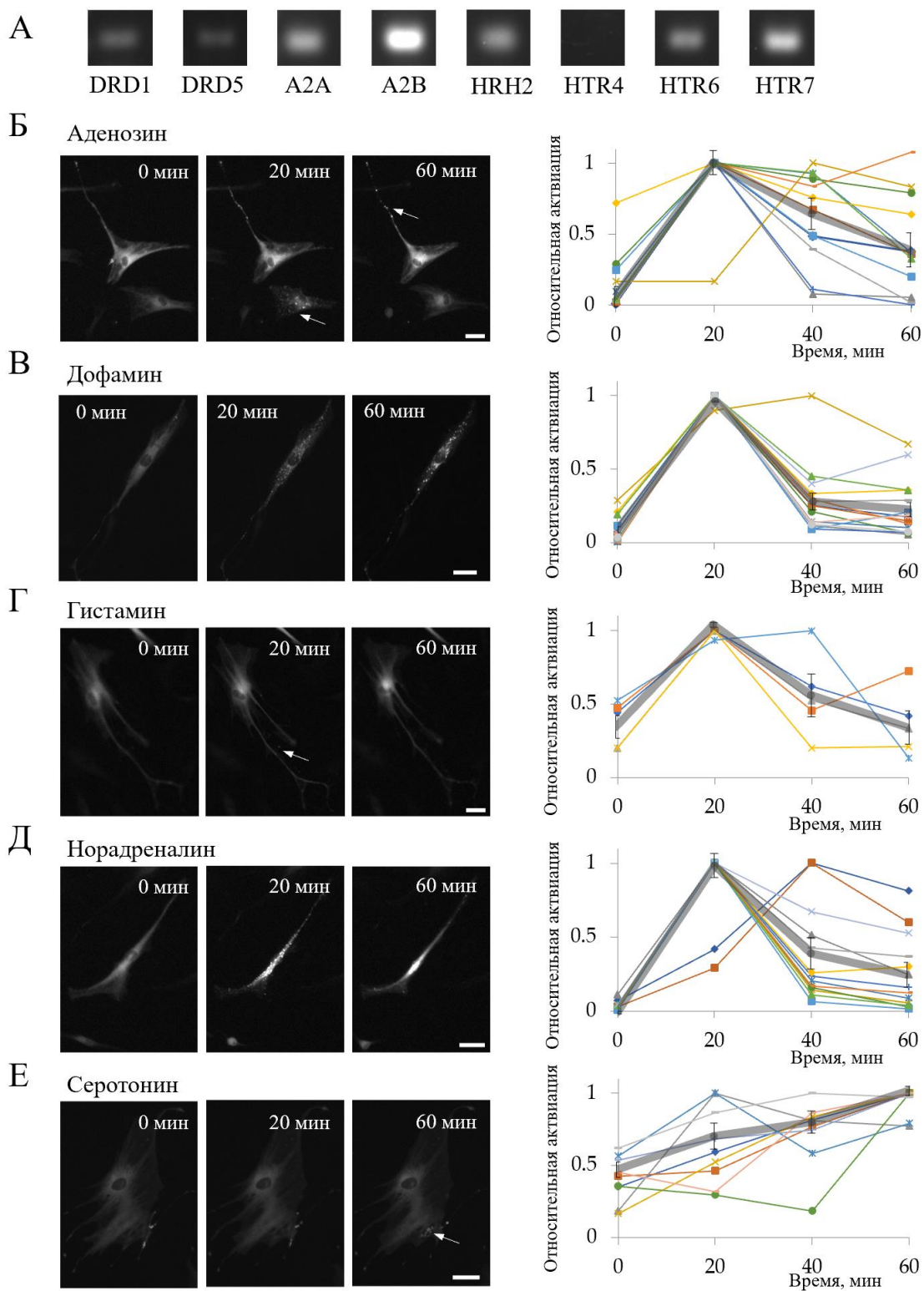


Рис. 3.7. Ответы МСК на гормоны, активирующие цАМФ-зависимые рецепторы. А. – Проверка экспрессируемых в МСК изоформ цАМФ-ассоциированных рецепторов при помощи качественного ПЦР. Б-Е. - В МСК активировалась ПКА в ответ на стимуляцию клеток различными гормонами, ассоциированными с цАМФ-зависимой сигнализацией. При этом ПКА активировалась с различной амплитудой и продолжительностью. Клетки были простимулированы аденозином (Б, 10 μ М), дофамином (В, 10 μ М), гистамином (Г, 1 μ М), норадреналином (Д, 1 μ М) и серотонином (Е, 10 μ М). Стрелками указаны появляющиеся в цитоплазме агрегаты биосенсора.

Мы также проанализировали на уровне одиночных клеток ответы МСК на гормоны, ассоциированные с цАМФ-зависимыми рецепторами, при помощи флуоресцентного генетически-кодируемого биосенсора PKA-Spark [196]. Этот биосенсор равномерно распределен в цитоплазме при неактивной PKA и обратимо собирается в цитоплазматические агрегаты при активации сигнальной киназы. Для того, чтобы выяснить, способны ли МСК отвечать на цАМФ-активирующие гормональные стимулы, мы на первом этапе выяснили, какие из Gs-ассоциированных рецепторов гормонов экспрессировались в МСК. Ключевыми регуляторами функциональной активности МСК, которые потенциально могут отвечать через Gs/АЦ/цАМФ-зависимый сигнальный путь, являются норадреналин, дофамин, аденозин, гистамин и серотонин, чьи рецепторы экспрессировались в этих клетках на уровне мРНК (Рис 3.7, А). Регистрация функциональных ответов на уровне единичных клеток показала, что в популяции МСК выявлялись клетки, отвечающие на все из вышеперечисленных гормонов. В то же время, как и в случае с гормон-опосредованной кальциевой сигнализацией, не все клетки популяции МСК отвечали на действующие гормоны (Рис 3.7, Б-Е).

Для того, чтобы выяснить, каким образом проявлялась функциональная гетерогенность МСК в случае цАМФ-ассоциированных рецепторов гормонов, мы провели серийную стимуляцию клеток гормонами. Серийная добавка гормонов с регистрацией цАМФ/PKA-зависимых сигнальных процессов показала, что функциональная гетерогенность МСК в этом случае проявлялась в том, что небольшая фракция клеток отвечала сразу на несколько действующих гормонов (Рис 3.8). Это значительно отличается от описанной выше кальций-опосредованной гормональной чувствительности МСК, где отдельные клетки отвечали только на один действующий гормон, к другим оставаясь нечувствительными.

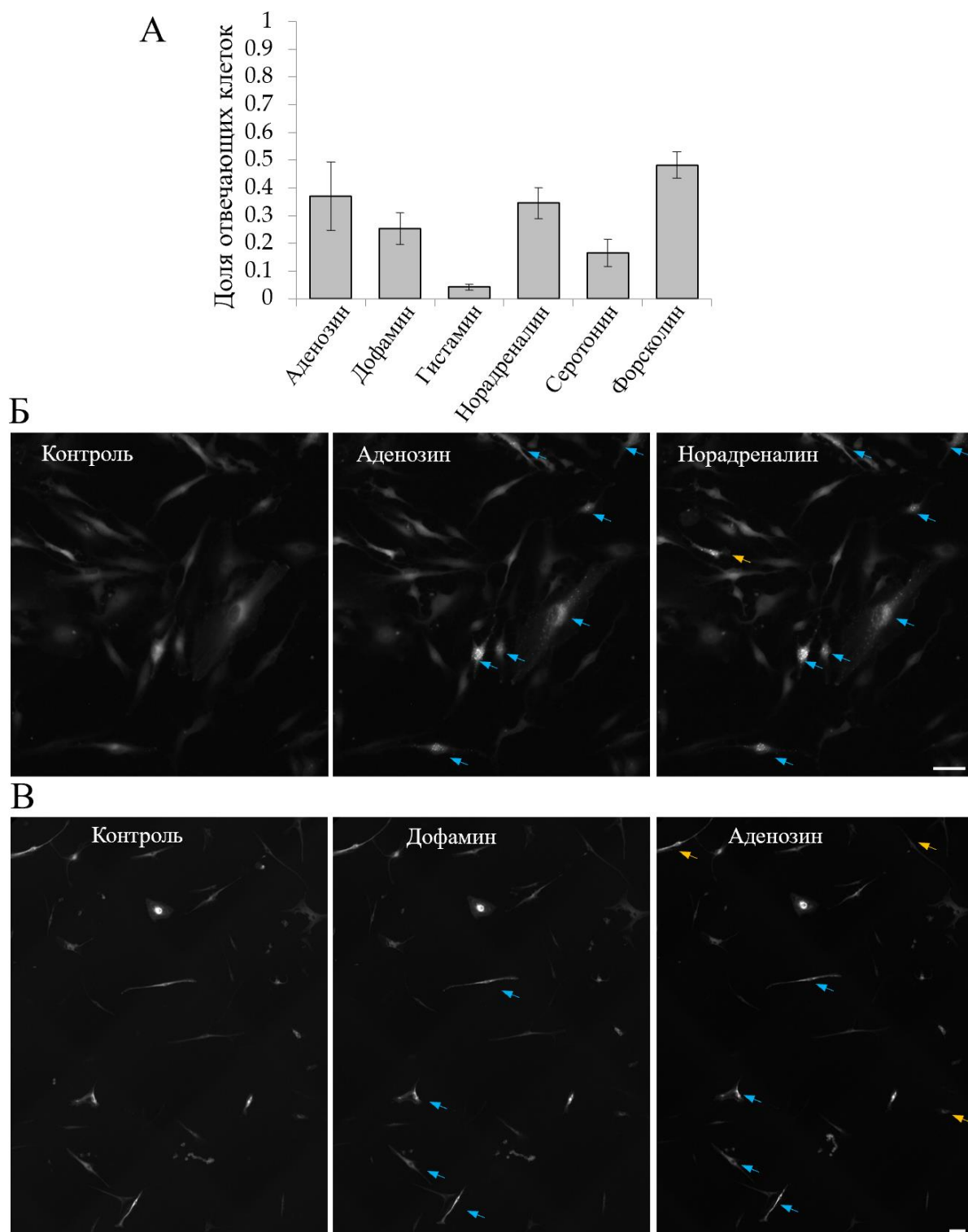


Рис. 3.8. Серийная стимуляция МСК гормонами с регистрацией цАМФ/ПКА-зависимой сигнализации. А. Доля МСК, отвечавших на стимуляцию различными гормонами, ассоциированными с цАМФ/ПКА-мобилизующими гормонами, регистрируемые при помощи биосенсора PKA-Spark. Ср.знач. +/- станд.ош., n=12 независимых экспериментов на материале от 3 различных доноров. Б-В. – Последовательная добавка различных гормонов на одни и те же клетки. Следующий гормон был добавлен после отмытки от предыдущего.

Голубые стрелки показывают клетки, которые ответили на первый добавленный гормон. Желтые стрелки указывают на клетки, которые дополнительно ответили на второй добавленный гормон. Масштаб 100 мкм.

Таким образом, если на уровне целой культуры клеток МСК проявляли мультипотентность и удовлетворяли всем критериям определения, то на уровне одиночных клеток МСК в высокой степени гетерогенны. В связи с высокой степенью гетерогенности популяции МСК изучение молекулярных механизмов выбора направления дифференцировки мы проводили по возможности на уровне единичных клеток. Более того, там, где это было возможно, мы наблюдали за функциональными ответами и выбором направления дифференцировки одних и тех же клеток при помощи различных методов.

3.2. Инициация МСК

Для начала изучения молекулярных механизмов выбора направления дифференцировки МСК мы отталкивались от наиболее простой и классической схемы дифференцировки мультипотентных стволовых клеток ([Рис. 3.9](#)) [202, 203]. Согласно этой схеме, стволовая клетка, находясь в нише, способна к самообновлению путем симметричного или асимметричного деления, а также к выходу из ниши, сопряженному с выбором направления дифференцировки. При этом механизмы выбора направления дифференцировки МСК остаются практически не изученными.

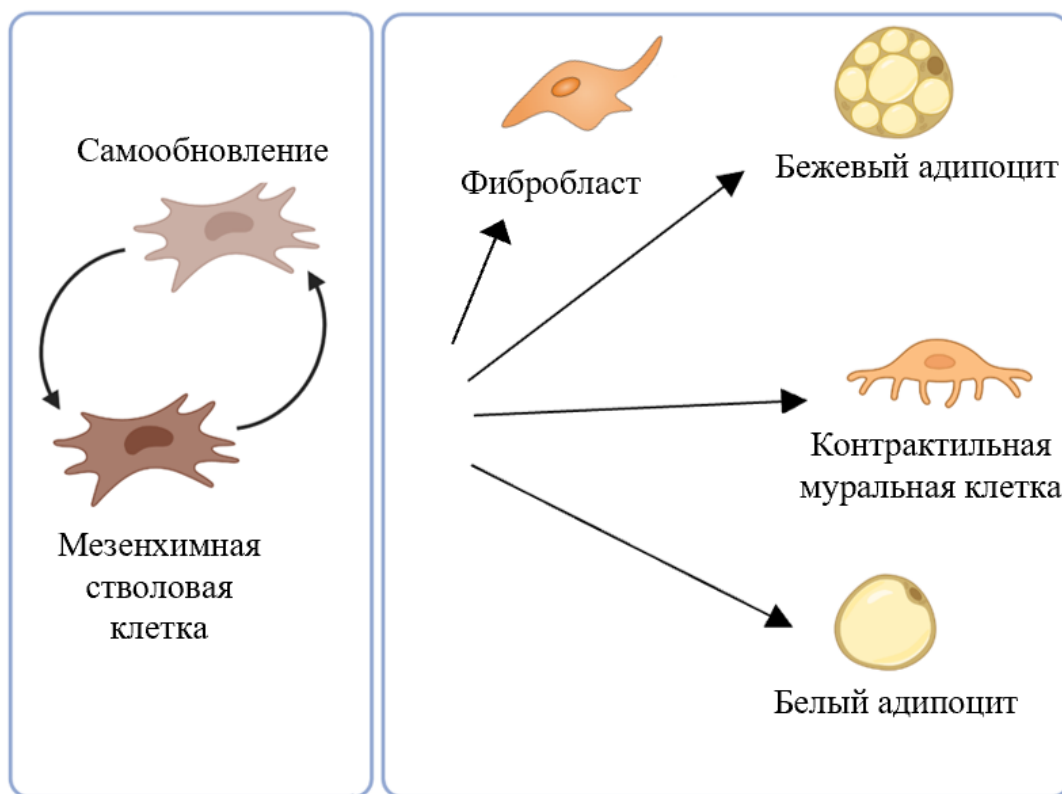


Рис. 3.9. Наиболее часто используемая схема выбора направления дифференцировки мультипотентными стволовыми клетками.

3.2.1. Поиск функционального состояния МСК, в котором они производят выбор направления дифференцировки

На начальном этапе изучения механизмов выбора направления дифференцировки МСК мы воспользовались скрининговым методом анализа транскриптома единичных клеток (scRNAseq), а именно 3'-профилирования единичных клеток при помощи технологии транскриптомного анализа единичных клеток в каплях (droplet-based scRNAseq analysis). Для анализа мы взяли несколько массивов МСК, полученных от одного донора (клетки выделены из подкожной жировой ткани здорового донора без ожирения и хронических заболеваний, в эксперимент взяты на 1 пассаже). Клетки были направлены по различным путям дифференцировки:

1. Мы взяли в анализ массив МСК, направленных в адипогенную дифференцировку при помощи стандартного редуцированного коктейля (инсулин, дексаметазон и IBMX), на самых ранних этапах адипогенной дифференцировки (4 дня после индукции адипогенной дифференцировки). Этот образец далее будем называть Адипогенез;

2. МСК, коммитированные в контрактильный фенотип (двукратная обработка клеток 1 μ M норадреналина в течение 1 часа с интервалом в 6 часов, подробнее об этом направлении дифференцировки см. [Раздел 3.5](#), здесь используем сокращенное название Контрактильная);

3. МСК, коммитированные в фиброзное направление. Для этого клетки культивировали в течение 4 дней в профиброзных условиях – на децеллюляризованном внеклеточном матриксе, полученном от дермальных фибробластов человека. Далее используется сокращенное название массива Фиброз. Данные scRNAseq были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории репарации и регенерации тканей Института Регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующая лабораторией Ефименко А.Ю. [204].

4. В качестве контрольного образца мы использовали клетки того же донора и пассажа, находившиеся в течение всего времени подготовки вышеупомянутых проб в полной среде роста.

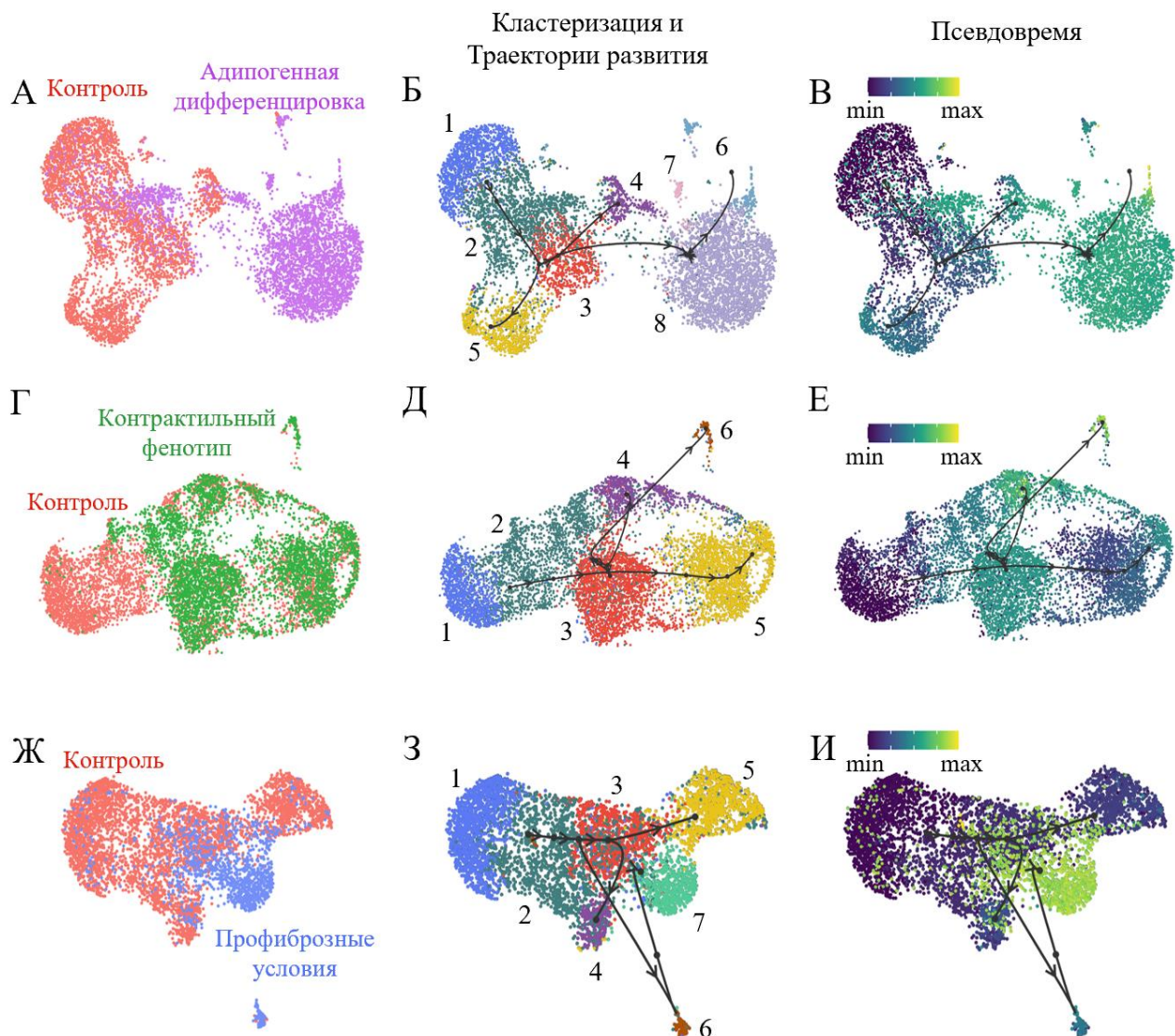


Рис. 3.10. Результаты транскриптомного профилирования на уровне единичных клеток (scRNAseq) МСК жировой ткани, направленных в адипогенную дифференцировку (А-В), в контрактильный фенотип (Г-Е) и в фиброзный фенотип (Ж-И). Контрольные клетки в интеграторах (А, Г, Ж) отмечены красным, клетки, направленные в адипогенном направлении – фиолетовым (А), клетки, направленные в контрактильный фенотип – зеленым (Г), в фиброзном направлении – голубым (Ж). Б, Д, З. – Кластеризация интегрированных данных с наложенными траекториями развития. В, Е, И. – Графическое отображение рассчитанных значений псевдовремени (большие значения псевдовремени – клетки, находящиеся в более стабильном фенотипе). Каждая точка представляет одну клетку.

Мы провели попарную интеграцию образцов и кластеризацию полученных массивов данных (Рис. 3.10). Далее раскластеризовали полученные

интегрированные данные и провели функциональную аннотацию клеток с помощью анализа транскрипционного профиля. Для этого по спискам генов, специфически повышенных в определенных кластерах, предположили, к каким функциональным типам клеток могут относиться клетки того или иного кластера - выявили маркеры клеток. На [Рис. 3.10, А,Г,Ж](#), показывающих интеграцию массивов клеток, направленных в дифференцировку с контрольным массивом, видно, что при направлении МСК в дифференцировку большая или меньшая часть клеток изменяла свой транскрипционный профиль, хотя часть клеток оставалась в исходном состоянии. На [Рис. 3.10, Б,Д,З](#) показана кластеризация интегрированных массивов. Кластер 1 включал МСК в базальном состоянии, так как в основном этот кластер представлен клетками контрольного образца. Кроме того, это состояние, судя по транскриптому клеток, характеризуется высокой синтетической активностью клеток, а также высоким уровнем аэробного метаболизма. В этом кластере повышена экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ (*COX7A1*, *COX7A2*, *ATP5F1E*), а также кодирующих рибосомальные белки (*RPLA1*, *RPL28*, *RPS28*, *RPS12*). Кластер 4 во всех вариантах интеграции данных содержал фибробласто-подобные клетки, характеризующиеся повышенным синтезом белков внеклеточного матрикса (*POSTN*, *FNI*, *COL1A1*, *COL3A1*). Кластер 5 во всех трех вариантах интеграции данных состоял из клеток, в которых был повышенный уровень экспрессии генов клеточного цикла (*TOP2A*, *MKI67*, *CENPF*) и активности транскрипционных факторов *BRCA1*, *POLE3* *MYBL2*. Это указывает, что данные клетки находились в состоянии деления. Помимо этого, мы провели дополнительный биоинформатический анализ состояния клеточного цикла (Cell cycle score), который указал, что клетки данного кластера находились в S, G2 и M-фазах клеточного цикла.

В каждой из интегрированных пар выявлялись кластеры, характерные для соответствующего направления дифференцировки. Кластер 6 в интегрированных данных Контроль-Фиброз и Контроль-Контрактильный

состоял из клеток с контрактильным фенотипом, характеризующихся повышенной экспрессией генов, связанных с гладкомышечным фенотипом (*ACTA2*, *MYLK*, *ACTG2*, *MYH11*). Клетки кластера 6 в датасете Контроль-Адипогенез являлись адипоцитами, так как они экспрессировали гены, связанные с метаболизмом липидов (*FABP4*, *CEBPA*, *LPL*, *ACACB*). В этом интегрированном образце анализ активности транскрипционных факторов показал повышенную активность факторов, связанных с адипогенезом (*PPARA*, *PPARGC1A*, *PPARG*, *SREBF1*). Кластер 2 во всех вариантах интеграции данных включал фенотипически не определяемые клетки (эти МСК не имели значительных отличий в экспрессии генов от других клеток).

Для того чтобы выяснить, какие изменения претерпевали клетки при направлении в дифференцировку, мы построили траектории развития. Этот биоинформатический алгоритм выстраивает клетки в расчетную траекторию развития из предположения, что при изменении фенотипа клетки экспрессия генов изменяется постепенно. Предполагается, что клетки, наиболее похожие друг на друга по транскрипционному профилю, могут находиться в близких функциональных состояниях. Такие клетки с наименьшими изменениями транскрипционного фенотипа размещаются в выстраиваемой траектории развития близко друг от друга. Для построения траекторий развития трех пар массивов мы воспользовались пакетом *Dynverse* и выбрали метод построения траектории развития, наиболее адекватно отражающий известные нам физиологические процессы [189, 190]. При помощи метода *Paqa tree trajectory inference* мы показали, что во всех трех парах массивов существовал один кластер, в котором происходило разветвление траекторий развития между различными направлениями дифференцировки (Рис. 3.10, второй столбец).

В случае адипогенной дифференцировки далее клетки превращались в адипоциты (Кластер 6), фибробластоподобные клетки, синтезирующие внеклеточный матрикс (Кластер 4) или делящиеся клетки (Кластер 5) (Рис. 3.10, А-В). Фибробласты создают окружение для регуляции и поддержания дифференцировки МСК в адипоциты [205]. Направление клеток

в митоз обусловлено необходимостью сохранения популяции стволовых клеток, и лежит в основе процесса самообновления стволовых клеток. Часть МСК не отвечало на дифференцировочный стимул.

В случае направления МСК в контрактильный фенотип (Рис. 3.10, Г-Е) клетки аналогичным образом выходили из базального состояния (Кластер 1), в кластере 3 происходило разветвление траектории развития на несколько направлений – контрактильные клетки (кластер 6), фибробласты (кластер 4) и делящиеся клетки (кластер 5) на Рис. 3.10, Д. При анализе массивов фиброзной дифференцировки МСК картина траекторий развития с первого по третий кластеры аналогична, а далее траектория разделялась на направление к фибробластам (кластер 4), к делящимся клеткам (кластер 5) и фиброзным клеткам (кластеры 6 и 7). Таким образом, во всех проанализированных направлениях дифференцировки МСК выявлялся кластер 3, в который клетки переходили сразу после выхода из базального состояния, и в котором осуществлялось разделение траекторий развития клеток между различными направлениями дифференцировки.

Направления траекторий развития клеток независимо подтвердили расчетом псевдовремени. Расчет латентного времени осуществлялся путем динамического моделирования транскрипционной динамики зрелой и незрелой мРНК в клетке. Чем выше этот параметр, тем более стабильный фенотип клеток. Некоторые исследователи соотносят его со степенью дифференцированности клеток. Как видно, в большинстве исследованных нами образцов Контроль-Адипогенез, Контроль-Фиброз и Контроль-Контрактильный латентное время оказывалось повышено в конечных точках траекторий развития клеток.

Траектории развития МСК позволили сделать крайне важное наблюдение: все разветвления траекторий развития клеток, то есть непосредственно финальный выбор направления дифференцировки клеток осуществлялся в одном кластере (в данном случае его номер 3). Мы предложили называть это состояние МСК иницированным. Действительно, в

этом состоянии стволовые клетки вышли из состояния покоя, но еще не коммитировались ни в каком направлении, они все еще сохраняют свою мультипотентность.

3.2.2. Дифференцировка МСК сопряжена с образованием универсального инициированного состояния

Далее мы задались вопросом, насколько кластер инициированных МСК универсален. Формируются ли для различных направлений дифференцировки различные инициированные состояния, или же это универсальное функциональное состояние МСК, в которое она переходит на начальном этапе выбора направления дифференцировки.

Для того чтобы сравнить инициированные состояния при различных вариантах дифференцировки мы перенесли кластеризацию из одного интегрированного датасета в другой. Для этого мы сравнили, какие клетки контрольного массива данных попадали в кластер инициированного состояния при кластеризации интегратора Контроль-Адипогенез, Контроль-Фиброз и Контроль-Контрактильный. На [Рис. 3.11](#) изображен перенос кластеризации Контроль-Адипогенез ([Рис. 3.11, Б](#)) в датасеты Контроль-Контрактильный ([Рис. 3.11, А](#)) и Контроль-Фиброз ([Рис. 3.11, В](#)). При данном переносе кластеризации мы перемещали кластеризацию контрольного образца из интегрированных данных Контроль-Адипогенез на те же контрольные МСК из других интегрированных датасетов. Кластеры, которые состояли исключительно из клеток образца Адипогенез, мы не переносили в датасеты Контроль-Контрактильный и Контроль-Фиброз. В результате переноса кластеризации 1, 2, 3, 4, 5 кластеры Контроль-Адипогенез совпали с аналогичными по названию кластерам датасетов Контроль-Фиброз и Контроль-Контрактильный. Совпадение кластеров подтвердилось схожими функциями кластеров в разных интегрированных датасетах, рассчитанными при помощи типирования кластеров. Таким образом, анализ траекторий указал на

формирование общего иницированного состояния при различных вариантах дифференцировки МСК.

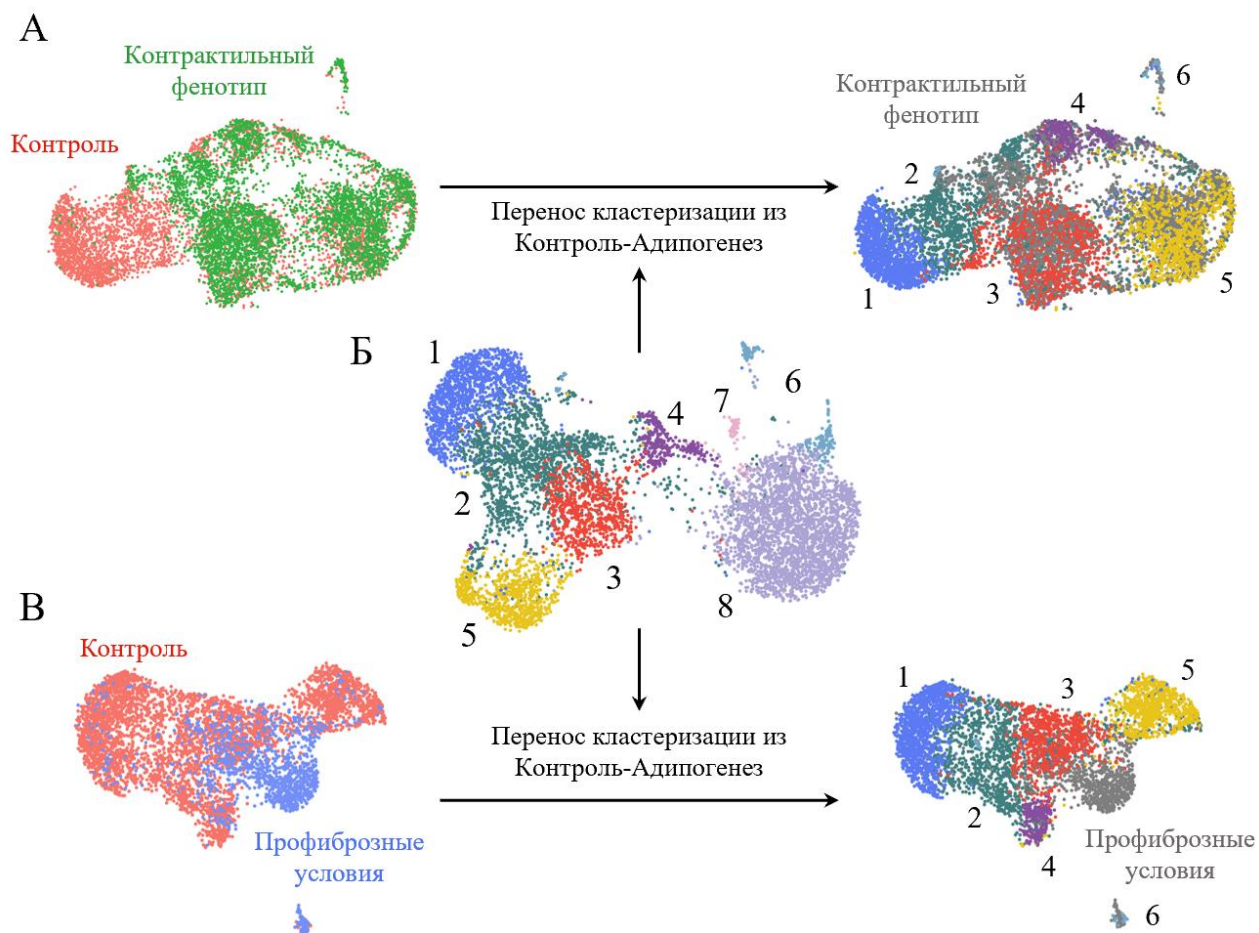


Рис. 3.11. Различные направления дифференцировки МСК связаны с формированием универсального иницированного состояния. А. Перенос кластеризации из массива данных Контроль-Адипогенез (Б) в интегрированные данные Контроль-Контрактильный. В. Перенос кластеризации из массива данных Контроль-Адипогенез (Б) в интегрированные данные Контроль-Фиброз.

Мы дополнительно произвели интеграцию множества массивов МСК, выделенных из разных доноров, направленных по различным путям дифференцировки. Как видно из Рис. 3.12, красный кластер, соответствующий

инициированному состоянию, оказывается единым для разных направлений дифференцировки.

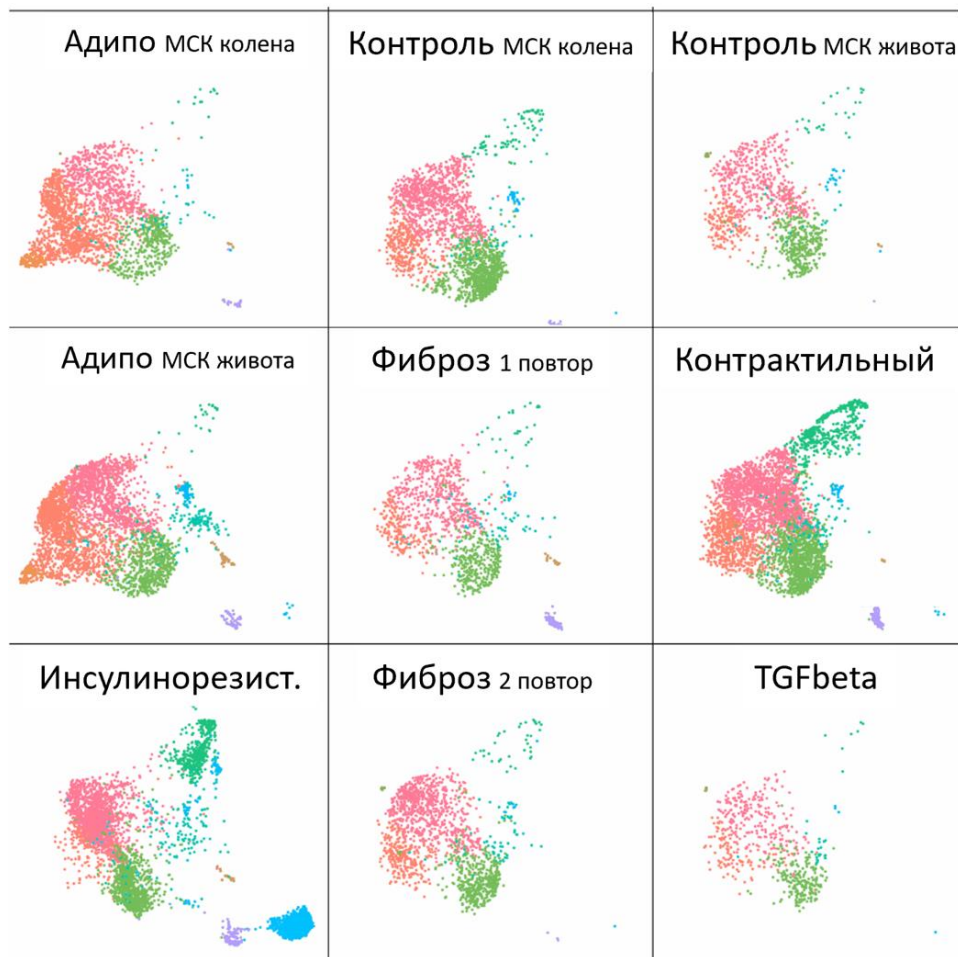


Рис. 3.12. Интеграция различных направлений дифференцировки МСК, а также МСК, выделенных из различных локаций в организме и различных пациентов. Красным отмечена субпопуляция, соответствующая инициированному состоянию МСК. Контроль МСК колена – МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области коленного сустава, в базальных условиях; Контроль МСК живота – МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота, в базальных условиях; Адипо МСК колена – МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области коленного сустава, направленные в адипогенную дифференцировку в течение 4 дней; Адипо МСК живота – МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота, направленные в адипогенную дифференцировку в течение 4 дней; Фиброз 1 повтор и Фиброз 2 повтор – МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота,

в течение 4 дней культивированные на децеллюляризованном матриксе фибробластов человека; TGFbeta - МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота, в течение 4 дней культивированные в присутствии профиброзного агента TGFbeta; Контрактильный - МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота, направленные в контрактильную дифференцировку путем двукратной обработки норадреналином в течение 1 часа; Инсулинорезист. - МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки в области живота, у пациента с подтвержденной инсулинорезистентностью.

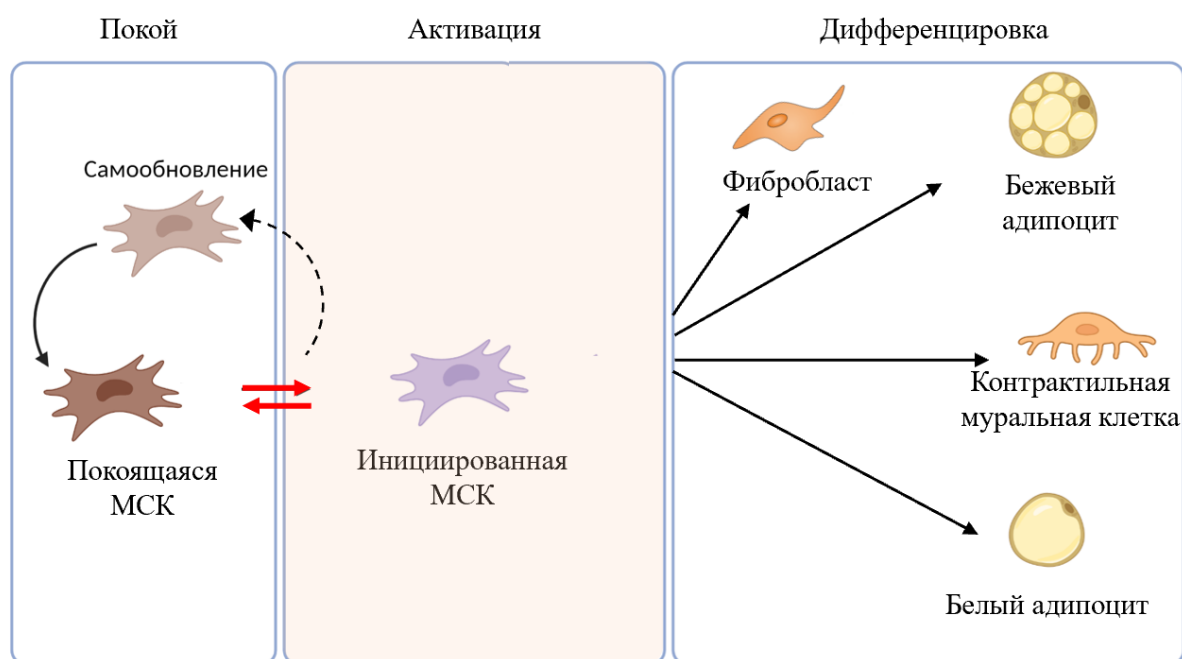


Рис. 3.13. Дополненная схема механизмов начальных этапов выбора направления дифференцировки МСК. В схему добавлено промежуточное функциональное состояние клеток, инициированное состояние, в котором МСК осуществляют выбор направления коммитирования.

3.2.3. Обсуждение. Инициация МСК как выход стволовой клетки из функциональной ниши

Таким образом, мы смогли предположить существование универсального для разных направлений дифференцировки инициированного функционального состояния МСК, в котором происходил выбор направления дифференцировки (Рис. 3.13). Подобное состояние постнатальных стволовых клеток, насколько

нам известно, описано впервые. Некое транзитное состояние, в которое переходят стволовые клетки при возникновении повреждения, показано для сателлитных клеток мышечной ткани, и было названо “alert” состоянием. В него сателлитные клетки переходят, когда на расстоянии от них возникает повреждение мышечной ткани. Сателлитные клетки в этом состоянии увеличиваются в размерах, активизируют митохондриальное дыхание, подготавливаются к клеточному циклу, но не вступают в него. Это обратимое и преактивированное состояние регулируется сигнальным комплексом mTORC1, однако более подробные механизмы его возникновения и функциональная значимость показана не была [14]. В условиях химического повреждения мышцы токсическим агентом TCDD переход стволовых клеток в состояние “alert” выполняет защитную роль, предотвращая их спонтанную и неконтролируемую активацию [15]. Инициированное состояние, показанное в данной работе, проявляет отличные функции от состояния “alert” сателлитных клеток. В инициированном состоянии МСК приобретают возможность выбора направления дифференцировки между несколькими возможными.

Для нормального функционирования стволовых клеток важным компонентом является ниша стволовой клетки [53]. Так, для эпителиальных стволовых клеток показано существование морфологически четко выявляемых структур, в которых располагаются стволовые клетки [81, 206]. Нарушение этих структур или выход из них стволовой клетки соответствует либо ее активации, либо нарушению функции стволовой клетки. В случае МСК понятие структурной ниши является дискутабельным, поскольку в тканях не обнаружены воспроизводимые структуры, которые могли бы соответствовать нише стволовой стромальной клетки [207]. Часто применяют понятие стромальной ниши, которое, однако, является в значительной степени абстрактным. Показанный нами переход МСК из покоящегося базального в инициированное состояние можно соотнести с выходом стволовой клетки из ниши. Однако в этом случае выход из ниши является не структурным и

пространственным, а функциональным. Клетка функционально изменяется, при этом получает возможность принимать решение о выборе направления дифференцировки и переходу к коммитированию. Можно предположить, что клетка при этом меняет свои регуляторные свойства, которые могут выражаться в гормональной чувствительности.

3.3. Пролиферация МСК как ключевой процесс самообновления

После перехода в инициированное состояние МСК производят выбор дальнейшей судьбы клетки. Одним из важнейших свойств стволовой клетки является самообновление – деление клеток, при котором одна или обе дочерних клетки остаются в нише и сохраняют стволовость. В случае стволовых клеток, для которых известно устройство их ниши, это соответствует сохранению локализации клетки в нише. В случае же стромальной ниши, которая, как обсуждалось выше, может представлять собой функциональную нишу, то есть особое функциональное состояние стромальных стволовых клеток, располагающихся в ткани, самообновлению МСК может соответствовать пролиферация этих клеток с последующим возвратом в функциональное базальное состояние.

3.3.1. Инициированное состояние как ключевой этап направления МСК в пролиферацию

Для выяснения условий перехода МСК в пролиферацию и механизмов регуляции этого процесса мы снова на первом этапе воспользовались методами scRNAseq. На первом этапе мы выяснили, какие кластеры МСК соответствуют пролиферирующим клеткам. Для этого мы воспользовались двумя инструментами по предсказанию стадии клеточного цикла исходя из транскрипционного профиля клеток. Как показано на [Рис. 3.14, А-Б](#), клетки, относящиеся к кластеру 0, находились в стадии клеточного цикла подготовки к митозу (G2-фаза) или непосредственно митоза (М-фаза). Кроме того, именно

эти клетки проявляли повышенное латентное время для отдельных клеток (Рис. 3.14, В). Эта характеристика описывает вероятность нахождения клетки в динамическом состоянии изменения фенотипа или же стационарном состоянии стабильного уровня экспрессии генов. Расчет латентного времени осуществлялся путем динамического моделирования транскрипционной динамики зрелой и незрелой мРНК в клетке. Упрощая, можно сказать, что для расчета латентного времени вычисляли соотношение зрелой мРНК исследуемых генов к незрелой несплайсированной. Аналогично, кластеры 0 на массивах Контроль-Адипогенная дифференцировка и Контроль-Фиброз соответствовали делящимся клеткам (Рис. 3.15, В-Г). Как видно из рассчитанных траекторий развития клеток, МСК направлялись в митоз строго из иницированного состояния при всех направлениях дифференцировки (Рис. 3.15, Г).

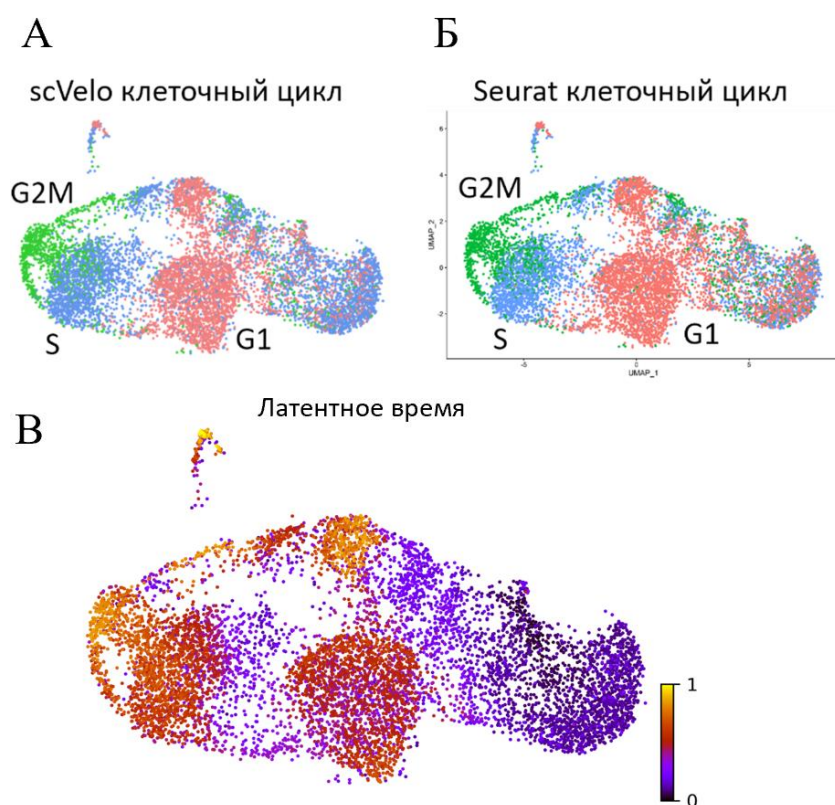


Рис. 3.14. Расчет состояния клеточного цикла при помощи биоинформатических подходов scVelo (А) и Seurat (Б). В. – Расчет латентного времени, которое описывает вероятность нахождения клетки в динамическом состоянии изменения фенотипа или же стационарном состоянии стабильного уровня экспрессии генов.

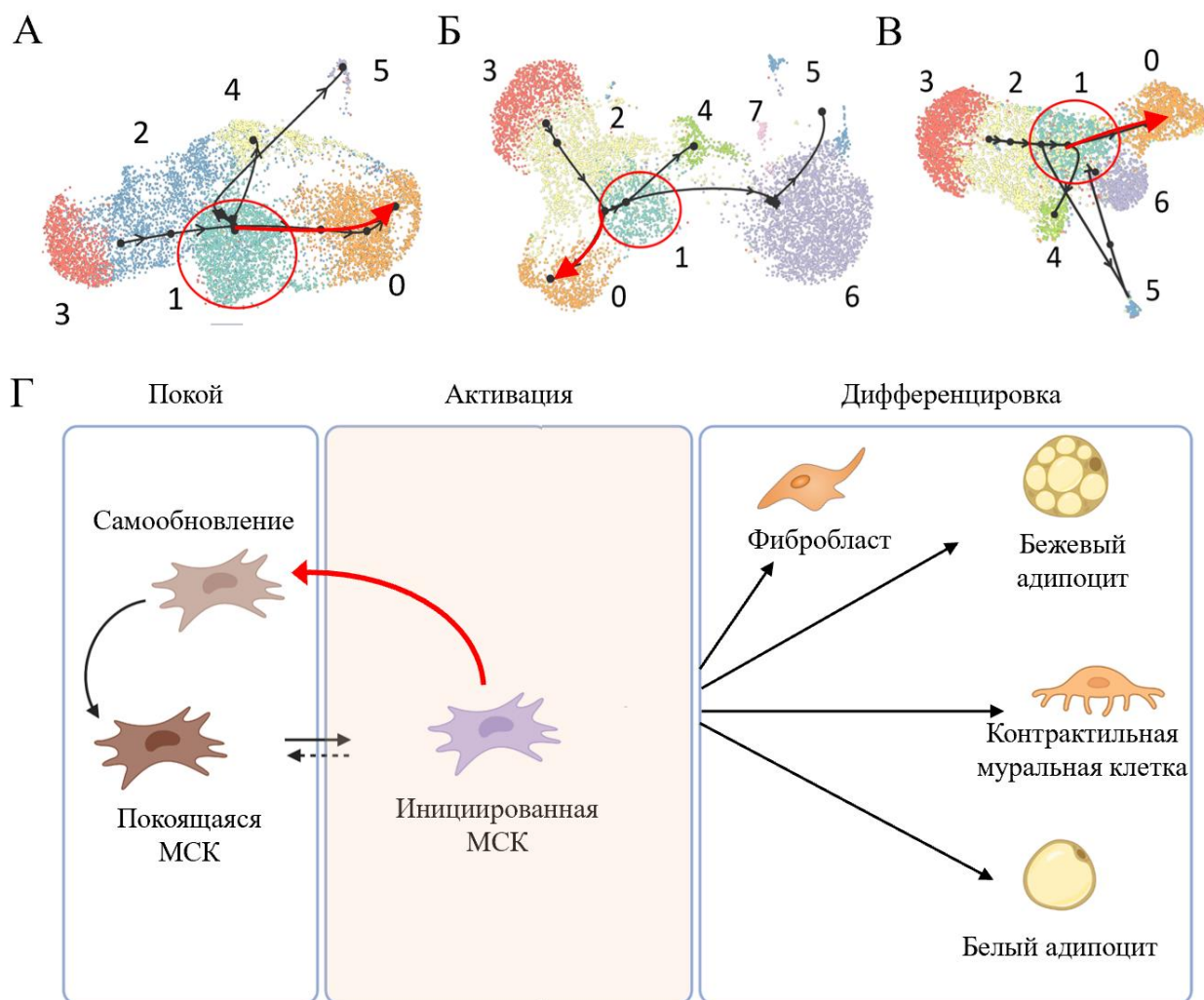


Рис. 3.15. В самообновление МСК направлялись из иницированного состояния. А. – контрактивная дифференцировка, Б. – адипогенная дифференцировка, В. – фиброзная дифференцировка. Иницированное состояние обведено красным кругом. Г. – схема направления МСК в дифференцировку, дополненная переходом МСК к пролиферации из иницированного состояния.

3.3.2. Ключевые регуляторы пролиферативной активности МСК

Для выяснения механизмов регуляции пролиферативной активности МСК мы стимулировали пролиферацию при помощи ключевых факторов роста, регулирующих митогенную активность МСК – тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и эпидермального фактора роста (EGF). Как показано на Рис. 3.16, А-Б, и PDGF, и EGF стимулировали пролиферацию МСК. В то же время анализ

активируемых факторами роста сигнальных каскадов показал, что EGF активировал только Erk1/2 MAP-киназный сигнальный каскад, тогда как PDGF активировал и MAP-киназы, и фосфорилирование Akt (протеинкиназы B) (Рис. 3.16, В, исходные мембраны вестерн-блоттинга см. Приложение 3). Фосфорилирование Akt носило редокс-зависимый характер и подавлялось при блокировании рецептор-опосредованного образования пероксида водорода ингибитором сборки НАДФН-оксидаз апоцинином и проникающей в клетку ПЭГ-каталазой, которая разрушала непосредственно пероксид водорода. Пероксид водорода выступал в данном случае в качестве вторичного посредника (Рис. 3.17, исходные мембраны вестерн-блоттинга см. Приложение 3). При этом, стоит отметить, что и апоцинин, и ПЭГ-каталаза снижали уровень фосфорилирования Akt, но не Erk1/2. Подавление образования пероксида водорода при помощи апоцинина приводило к предотвращению митогенного эффекта PDGF в стромальных клетках (Рис. 3.18). Таким образом, МСК направлялись в пролиферацию через промежуточное иницированное состояние, а ключевой митоген МСК, PDGF, регулировал деление этих клеток редокс-зависимым образом.

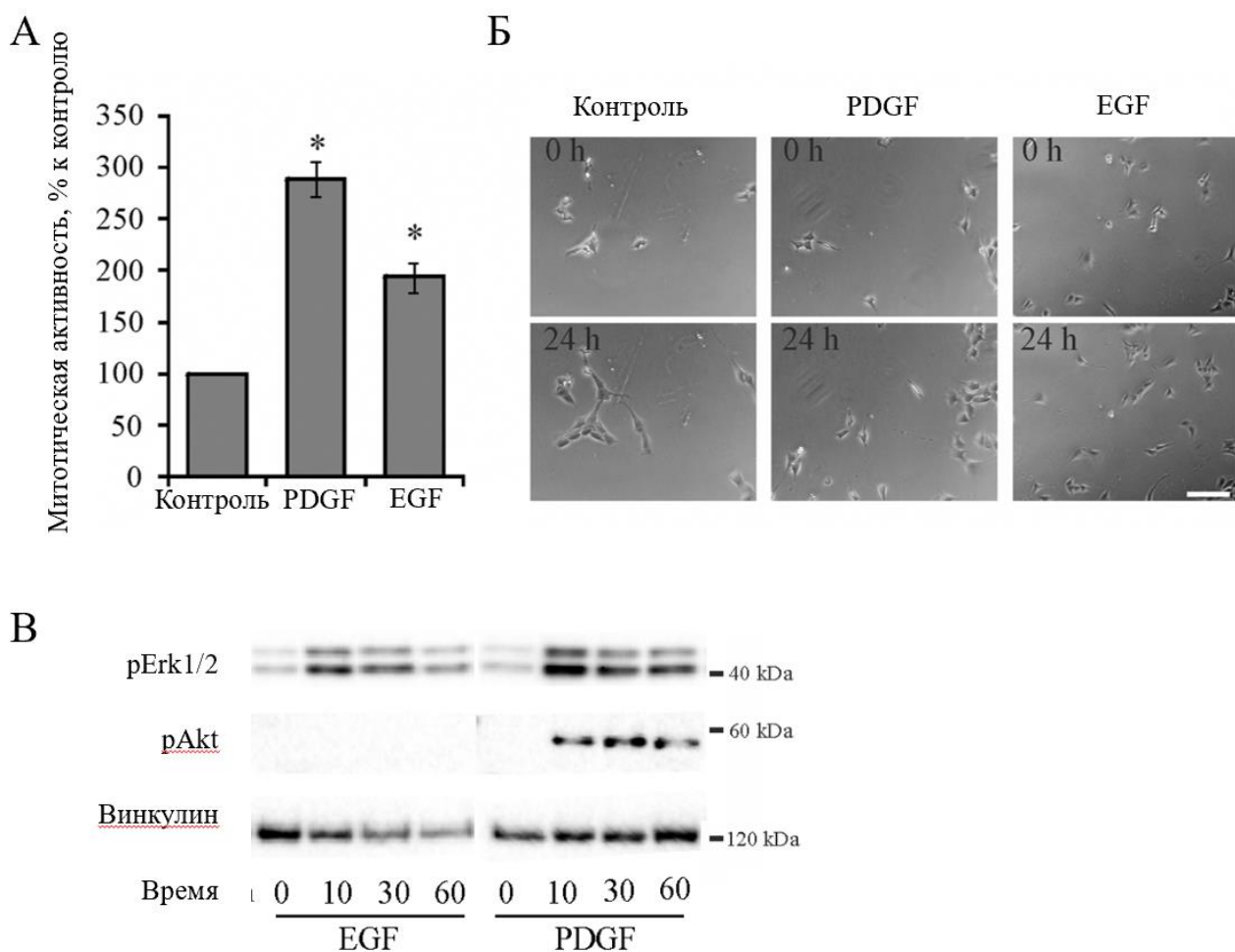


Рис. 3.16. (А) PDGF и EGF стимулировали митотическую активность стромальных клеток. Средние значения \pm ст.ош. $n = 6-7$ независимых экспериментов; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, обработанной растворителем. Всего на каждой панели анализировали 250–340 клеток. Б. – Репрезентативные фазово-контрастные изображения клеток без стимуляции (Контроль) и клеток, стимулированных PDGF или EGF, в начальный момент времени съемки (0 часов) и конечный кадр (24 часа). Фильмы снимались с интервалом между кадрами 10 минут. Митотическую активность определяли путем ручного подсчета делений клеток. Масштабная линейка, 100 μ M. (В) PDGF, но не EGF стимулирует фосфорилирование PKB/Akt в МСК, но и PDGF, и EGF сходным образом стимулируют фосфорилирование Erk1/2. Показаны репрезентативные мембраны, полученные в одном из двух независимых экспериментов.

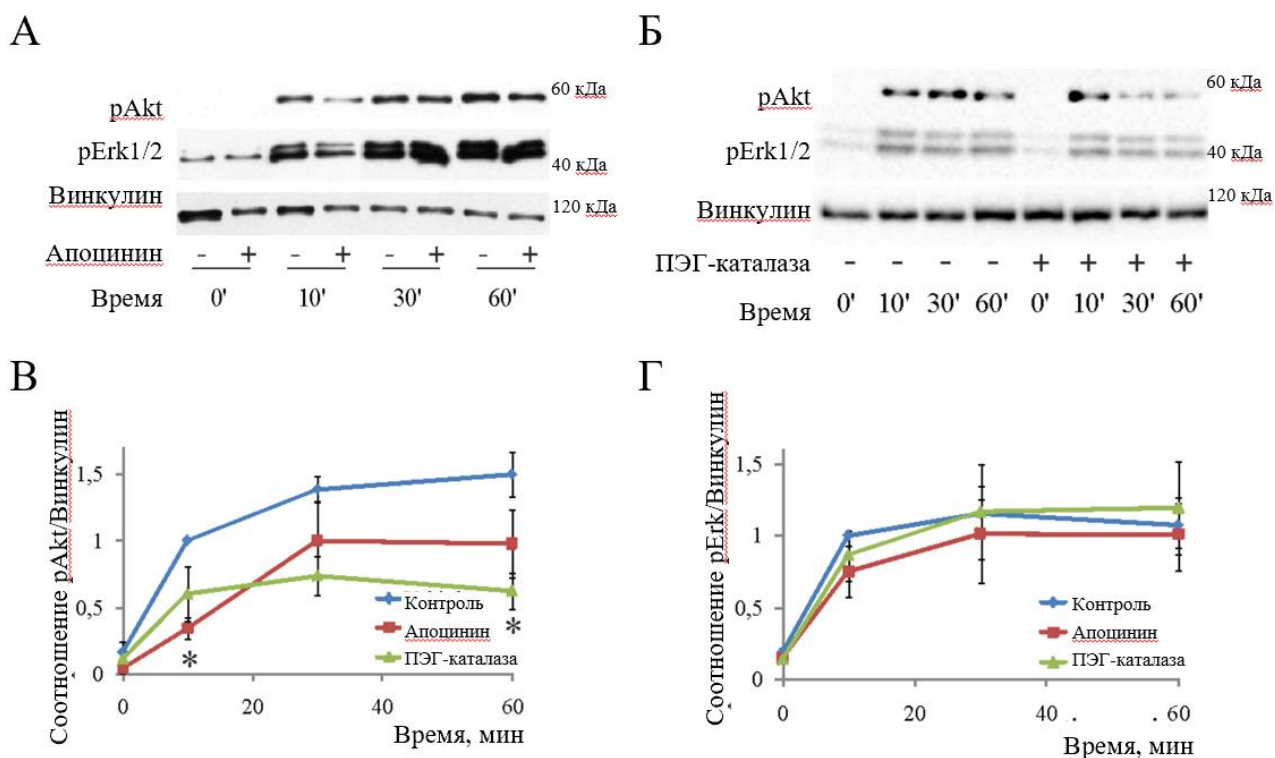


Рис. 3.17. PDGF-зависимая активация PKB/Akt-зависимого, но не Erk1/2-зависимого сигнального каскада носила редокс-зависимый характер. А-Б. – репрезентативные мембраны вестерн-блоттинга, показывающие влияние апоцинина (А) и ПЭГ-каталазы (Б) на кинетику фосфорилирования PKB/Akt и Erk1/2 в МСК, стимулированных PDGF. Для контроля загрузки использовали окрашивание винкулином. В-Г. – Статистический анализ изменения фосфорилирования PKB/Akt или Erk1/2 в МСК, проанализированные в 4 независимых экспериментах путем нормализации сигналов фосфорилирования, приведенных выше, к содержанию винкулина. Как указано выше, каждый набор данных был нормализован по значению 10-минутной стимуляции в контроле без ингибитора; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем без ингибитора.

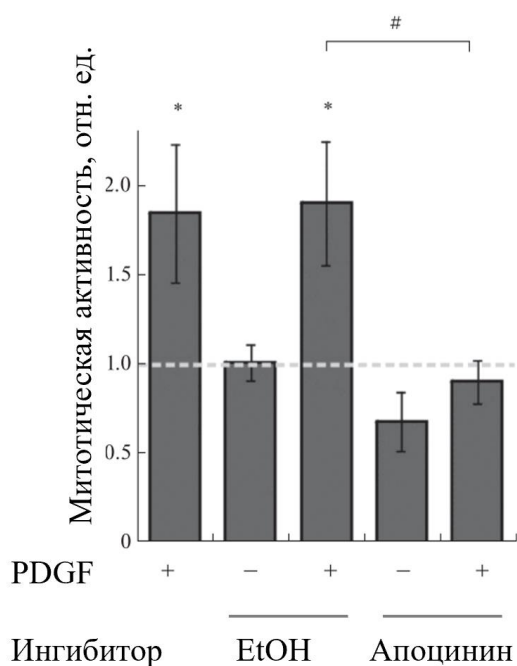


Рис. 3.18 Ингибирование образования пероксида водорода апоцинином предотвращало PDGF-зависимое усиление пролиферации стромальных клеток. EtOH – этанол, растворитель апоцинина. PDGF добавлен в концентрации 10 нг/мл.

3.3.3. Обсуждение. В самообновление стромальные клетки направлялись из иницированного состояния по редокс-зависимым механизмам

Биоинформатический анализ показал, что МСК направлялись в пролиферацию из того же иницированного состояния, в котором они осуществляли выбор направления дифференцировки. При этом ключевой регулятор миграции и пролиферации МСК, фактор роста PDGF, усиливал митотическую активность редокс-зависимо, путем активации PI3-киназного сигнального каскада и протеинкиназы В/Акт. Мы показали это при помощи двух агентов, предотвращающих появление сигнального пероксида водорода, опосредованное сигналингом от факторов роста. Во-первых, это апоцинин, ингибитор сборки НАДФН-оксидаз, производящих H₂O₂, и антиоксидант [208]. Во-вторых, это проникающая в клетку ПЭГ-каталаза, быстро разрушающая образующийся H₂O₂ [209]. При этом другой фактор роста, EGF, тоже усиливал митотическую активность стромальных клеток, но его эффект

не зависел от H₂O₂, и он не активировал PKB/Akt. Среди сигнальных каскадов, активируемых PDGF, PI3-киназный путь являлся специфически редокс-регулируемым, в отличие от Erk1/2-пути, который активировался PDGF и EGF одинаково редокс-нечувствительным образом. При этом из литературных данных известно, что Erk1/2 контролирует прогрессию клеточного цикла [210, 211] активируясь рецепторами PDGF и EGF.

Редокс-зависимость процессов самообновления стволовых клеток может являться важным регуляторным фактором поддержания их стволового состояния в нише. Так, например, для гематопоэтической стволовой клетки (ГСК) показано, что в эндостальной нише она испытывает значительный недостаток кислорода, что HIF1- зависимым образом поддерживает ее в стволовом состоянии [94]. При делении ГСК в эндостальной нише обе дочерние клетки остаются стволовыми и не идут в дифференцировку.

3.4. Механизмы перехода МСК в иницированное состояние

3.4.1. Норадреналин как регулятор инициации МСК

Для поиска сигнальных механизмов перевода МСК в иницированное состояние мы обратились к известным физиологическим механизмам регуляции МСК в ткани. Ключевым регулятором МСК в ткани является симпатическая нервная система и ее нейромедиатор норадреналин. Наиболее хорошо ключевая функция норадреналина показана для костномозговых МСК. Так, в красном костном мозге симпатические волокна непосредственно иннервируют нестин-экспрессирующие МСК и регулируют функциональную активность МСК [83, 131]. Более того, процесс кроветворения СНС регулирует исключительно через посредничество МСК, не влияя напрямую на гематопоэтические клетки-предшественники. При деплеции МСК в костном мозге исчезает симпатическая регуляция кроветворения [83].

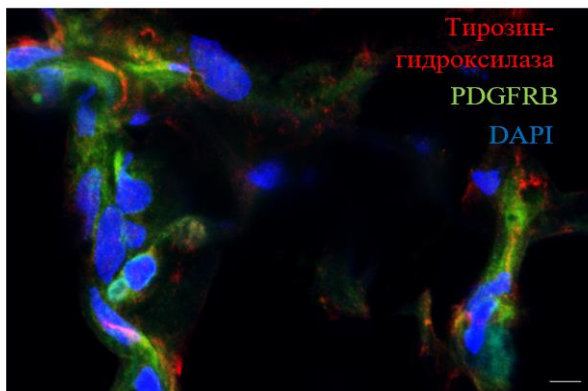


Рис. 3.19. Норадреналин является ключевым регулятором МСК в стромальной нише. Микрофотография иммуногистохимической окраски МСК и симпатических волокон в подкожной жировой ткани человека. Маркер МСК – PDGFR β (зеленый), маркер симпатических волокон – тирозин-гидроксилаза (красный); ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 10 μ М.

Мы проанализировали взаимную локализацию симпатических волокон и МСК в жировой ткани человека. Симпатические волокна мы поместили путем иммунофлуоресцентной окраски на тирозин-гидроксилазу, скорость-лимитирующий фермент синтеза норадреналина. МСК поместили путем окраски на один из их основных маркеров PDGFR β . Как видно на [Рис. 3.19](#), МСК непосредственно контактировали с симпатическими волокнами в жировой ткани человека. Для того, чтобы установить, влияет ли стимуляция МСК норадреналином на представленность клеток в инициированном состоянии, мы провели scRNAseq анализ клеток, обработанных норадреналином. Для моделирования избыточной стимуляции СНС клетки подвергли двукратной обработке норадреналином 1 μ М в течение 1 часа с интервалом в 5 часов. Как видно на [Рис. 3.20, А-Б](#), через 12 часов после воздействия норадреналина представленность МСК в инициированном состоянии выросла в 2.57 раз, тогда как в базальном состоянии практически не осталось клеток (после обработки норадреналином в этом кластере осталось лишь 4% клеток). Важно, что этот переход являлся транзиторным, поскольку уже через 48 часов после стимуляции норадреналином значительная часть клеток вернулась в исходное

состояние. При этом часть клеток перешла к митозу (Рис. 3.20, В-Г). Таким образом, стимуляция МСК норадреналином привела к транзитному переходу клеток из базального состояния в инициированное. Переход обратим, и уже менее чем через 48 часов клетки возвращались в исходное базальное состояние или вступали в митоз.

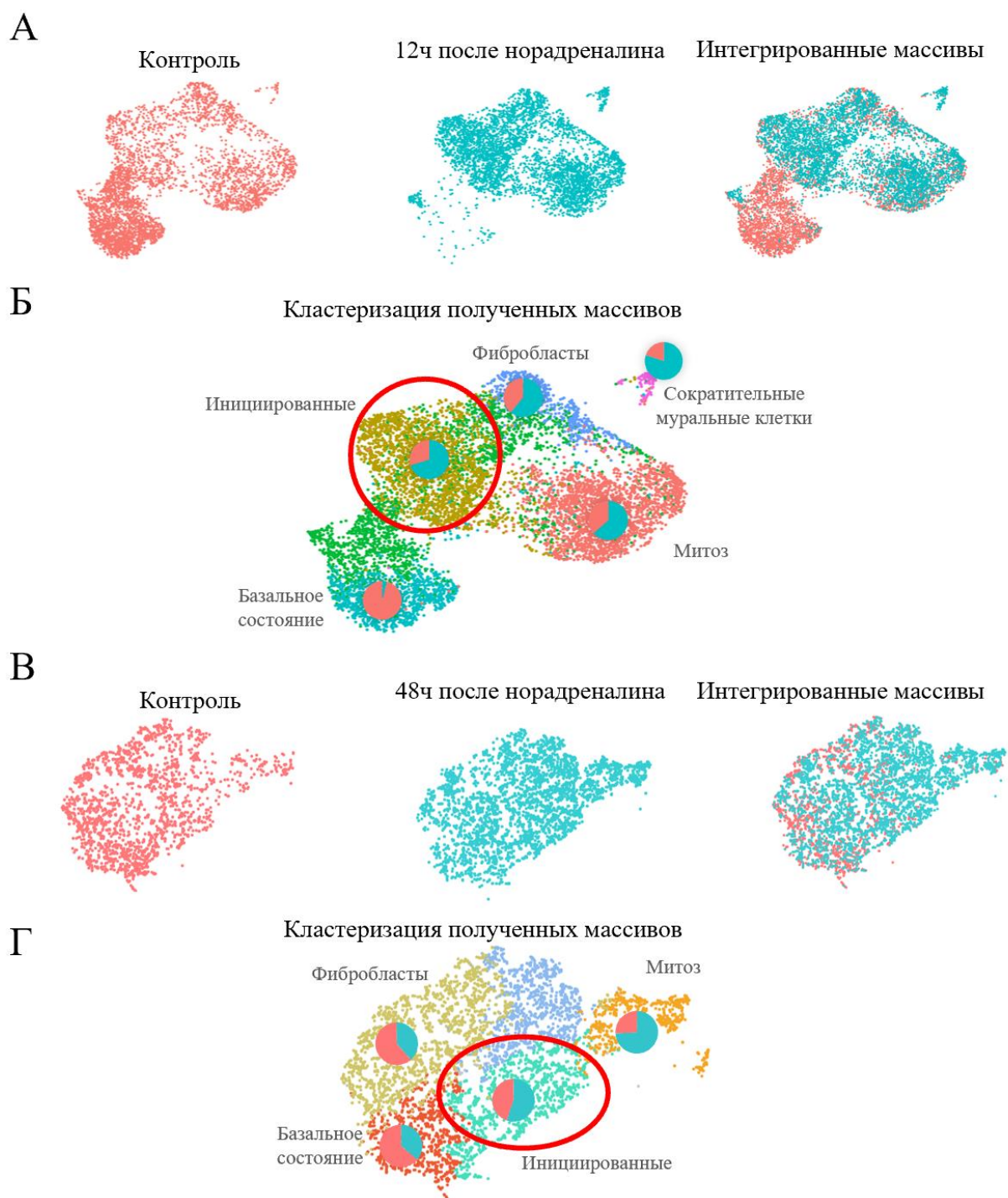


Рис. 3.20. Анализ транскриптома одиночных клеток после воздействия норадреналина на МСК. Анализ был проведен через 12 часов после обработки клеток (А-Б) и через 48 часов (В-Г). Красным цветом показаны контрольные массивы клеток (обработанных средой с растворителем без норадреналина), голубым – массивы клеток, обработанных норадреналином. Каждая точка показывает одну клетку. Б и Г – изображения кластеризации полученных массивов. Красным кругом показана субпопуляция иницированных клеток. Секторными диаграммами – доля клеток, находящихся в этом кластере до обработки клеток норадреналином (красный сектор) и после обработки норадреналином (голубой сектор).

3.4.2. Сигнальные механизмы инициации МСК под действием норадреналина

На первом этапе выяснения адренергических сигнальных механизмов перевода МСК в иницированное состояние мы проанализировали представленность различных изоформ адренорецепторов на поверхности МСК и их функциональную активность. Для идентификации типов и подтипов адренергических рецепторов, экспрессируемых МСК, мы использовали проточную цитометрию и показали, что МСК экспрессируют на своей поверхности адренергические рецепторы $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ (Рис. 3.21, А). МСК, выделенные от разных доноров, демонстрировали схожий фенотип (>99% этих клеток были CD105+CD73+CD90+CD45-) и проявляли примерно одинаковые способности к дифференцировке, проявляя мультипотентность. При этом процент клеток, экспрессирующих различные изоформы адренорецепторов, сильно различался у разных доноров и не зависел от их пола, возраста и ИМТ. Среди 13 проанализированных пациентов было 7 мужчин и 6 женщин, возраст различался от 27 до 63 лет (средний 42,8), ИМТ различался от 19 до 28 (средний ИМТ 23,3). В МСК наиболее распространены α -адренорецепторы. Что интересно, МСК большинства доноров содержали небольшое количество клеток, экспрессирующих изоформы $\beta 2$ и $\beta 3$ (медианы 6 и 1%, соответственно) (Рис. 3.21, Б), несмотря на то, что именно эти рецепторы считаются основными адренорецепторами для МСК [83, 212, 213].

Мы проанализировали функциональную активность адренергических рецепторов, экспрессируемых МСК. Как было показано выше, МСК экспрессировали $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -адренорецепторы. Все они являются семидоменными рецепторами, ассоциированными с тримерными G-белками. $\alpha 1$ -адренорецепторы ассоциированы с G_q , который запускает фосфоинозитидный обмен и кальциевую сигнализацию. На уровне единичных клеток эту сигнализацию можно проанализировать при помощи проникающих в клетку кальциевых красителей. $\alpha 2$ -адренорецепторы ассоциированы с G_i ,

который ингибирует аденилатциклазы. Ингибирование аденилатциклазы зарегистрировать на уровне единичных клеток проблематично. Однако для G_i показано, что комплекс $\beta\gamma$ -субъединиц этого тримерного белка может активировать кальциевую сигнализацию через фосфоинозитидный обмен или через вход кальция через плазматическую мембрану [214, 215]. β -адренорецепторы активируют аденилатциклазы и синтез вторичного посредника цАМФ, который может быть зарегистрирован на уровне единичных клеток при помощи генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров.

Для регистрации кальций-зависимых ответов α_1 - и α_2 -адренорецепторов мы регистрировали изменение внутриклеточного уровня Ca^{2+} на уровне единичных клеток при помощи флуоресцентного красителя Fluo-8. При этом мы серийно стимулировали клетки норадреналином или норадреналином в присутствии антагонистов различных адренорецепторов. Как видно, клетки специфически отвечали на серийную стимуляцию 1 μ М норадреналина (Рис. 3.21, В). Поскольку практически 100% МСК экспрессировали α_1 -адренорецепторы, активирующие кальций-зависимые сигнальные каскады, мы ожидали, что отвечать на добавление норадреналина будут практически все клетки. К нашему удивлению, норадреналин индуцировал высвобождение Ca^{2+} только в $6,9 \pm 0,8\%$ клеток (данные 43 независимых экспериментов, сделанных на 14 МСК из различных доноров, средний возраст $45,2 \pm 4,1$ лет; ИМТ $23,4 \pm 2,5$). Среди МСК, отвечающих на норадреналин изменением цитоплазматического уровня Ca^{2+} , специфический α_1 -антагонист празозин (10 μ М) полностью блокировал действие норадреналина в части клеток ($26 \pm 4\%$ от ответивших) (Рис. 3.21, Г) и α_2 -антагонист атипамезол (100 μ М) – в других клетках ($67 \pm 7\%$ от ответивших) (Рис. 3.21, Д). Можно предположить, что в остальных клетках, отвечающих кальцием на норадреналин, этот ответ мог активироваться несколькими рецепторами, и α_1 , и α_2 -изоформами. Поскольку МСК на уровне единичных клеток отвечали на норадреналин по принципу все-или-ничего,

аддитивности между ответами, активируемыми различными изоформами рецепторов, мы не наблюдали.

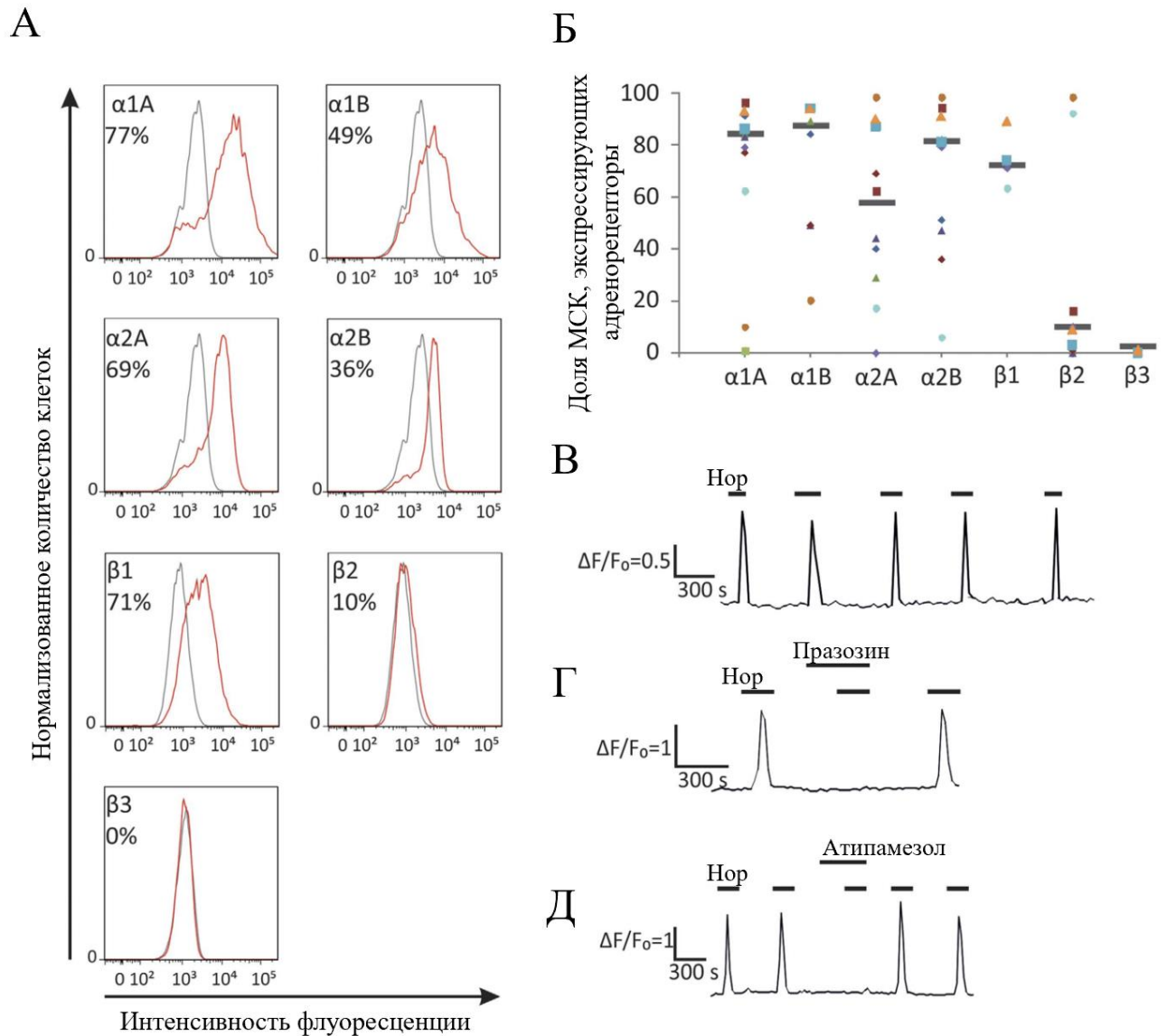


Рис. 3.21. Представленность различных изоформ адорецепторов на поверхности МСК и их функциональная активность. А. – Проточная цитометрия на представленность различных изоформ адорецепторов. Клетки фиксированные непермеабелизованные. Б. – Представленность различных изоформ адорецепторов. Значками одного цвета показаны измерения изоформ у одного донора (всего 10 доноров). В-Д. – Репрезентативные графики кальций-зависимых ответов индивидуальных МСК на 1 μM норадреналина в отсутствие антагонистов (Нор, секция В), в присутствии 10 μM $\alpha 1$ -антагониста празозина (Г) и в присутствии 100 μM $\alpha 2$ -антагониста атипамезола (Д).

Как было показано выше (см [Рис. 3.7, Г](#)), мы также проанализировали цАМФ-зависимые ответы на стимуляцию МСК норадреналином. Для этого мы использовали генетически-кодируемый внутриклеточный биосенсор РКА-Spark [196]. МСК отвечали цАМФ-зависимым образом на норадреналин, но, также, как и в случае с кальциевой сигнализацией, отвечали не все клетки. На норадреналин отвечали $34,7 \pm 5,5\%$ клеток популяции МСК. Кроме того, различные индивидуальные клетки отвечали на норадреналин с различной временной динамикой. Некоторые клетки показывали максимальный ответ на 20 минуте наблюдения, тогда как другие показывали существенно более продолжительный ответ с максимумом на 40-60 минутах. Это еще одно проявление функциональной гетерогенности популяции МСК. Таким образом, несмотря на то что большинство МСК экспрессировали адренергические рецепторы, которые запускали и кальций-зависимые, и цАМФ-зависимые сигнальные каскады, лишь небольшая часть из них оказывалась функционально активными.

3.4.3. Влияние норадреналина на чувствительность МСК к норадреналину

Норадреналин переводил МСК в инициированное состояние. Мы предположили, что этот процесс мог быть ассоциирован с изменениями в гормональной чувствительности клеток. Для проверки этой гипотезы мы провели следующий эксперимент. Мы стимулировали МСК $1 \mu\text{M}$ норадреналина в течение 1 часа, после чего отмывали клетки от гормона и оставляли клетки в полной среде роста. Далее через различные промежутки времени мы тестировали чувствительность клеток к норадреналину ([Рис. 3.22, А](#)).

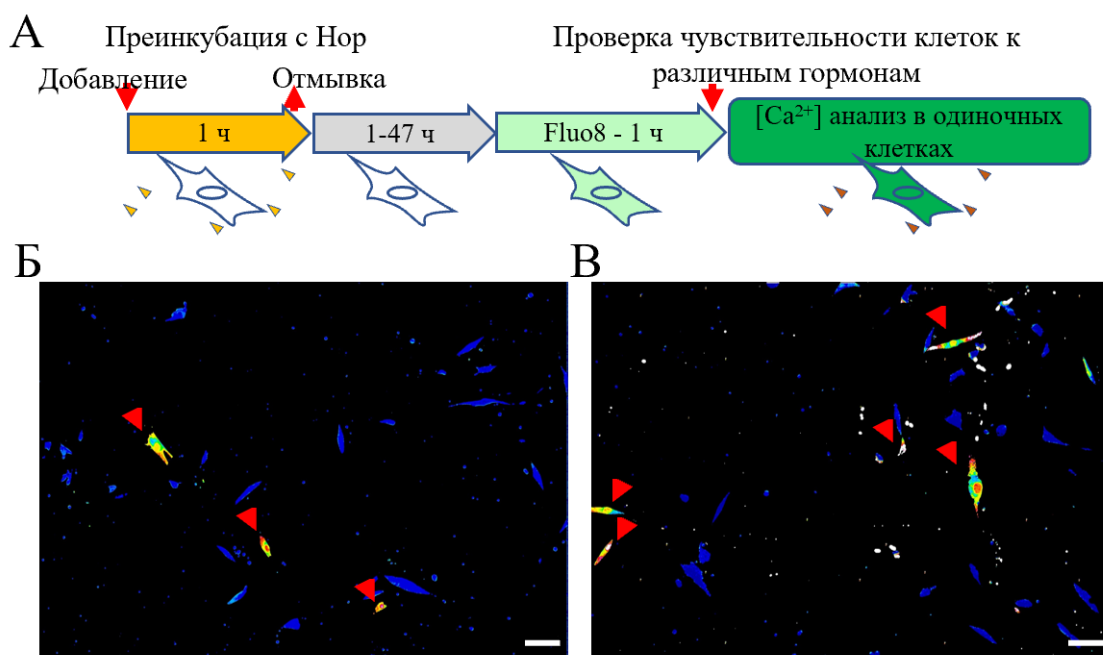


Рис. 3.22. Преинкубация МСК с 1 μM норадреналина. А. – Схема обработки МСК норадреналином с последующим измерением восприимчивости клеток к различным гормонам. Б-В. – Репрезентативные микрофотографии отвечающих клеток контрольных (Б) и преинкубированных с норадреналином через 6 часов после преинкубации (В). Масштаб 20 μm .

Поскольку известно, что гормоны могут регулировать чувствительность клеток к самим себе, мы предположили, что норадреналин может влиять на функциональную активность адренергических рецепторов в МСК. Обычно это влияние заключается в том, что действие на клетки гормона вызывает десенситизацию и даун-регуляцию активированных рецепторов, что проявляется в снижении чувствительности и числа отвечающих на гормон клеток [128, 216, 217]. После часовой стимуляции МСК 1 μM норадреналина мы протестировали ответ на этот же гормон через 3, 6 и 24 часа. Предварительная стимуляция норадреналином через 6 часов приводила к двукратному увеличению количества МСК, реагирующих на норадреналин Ca^{2+} сигнализацией (Рис. 3.22). При этом эффект был ограниченным по времени. Через 3 или 24 часа МСК реагировали так же, как и необработанные контрольные клетки (Рис. 3.23). Таким образом, мы обнаружили уникальный

феномен повышения чувствительности клеток к действующему на них гормону. Этот необычный и отложенный во времени сигнальный ответ может быть связан с временным переходом МСК в инициированное состояние, при котором на короткое время изменяется функциональная активность клеток.

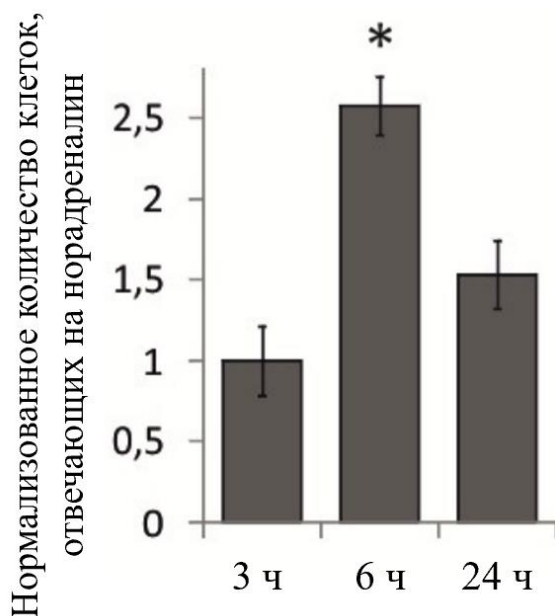


Рис. 3.23. Временная развертка изменения чувствительности МСК к норадреналину (по кальциевой сигнализации) после преинкубации клеток с норадреналином.

3.4.4. Норадреналин-зависимое повышение чувствительности МСК к норадреналину связано с повышением уровня $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов

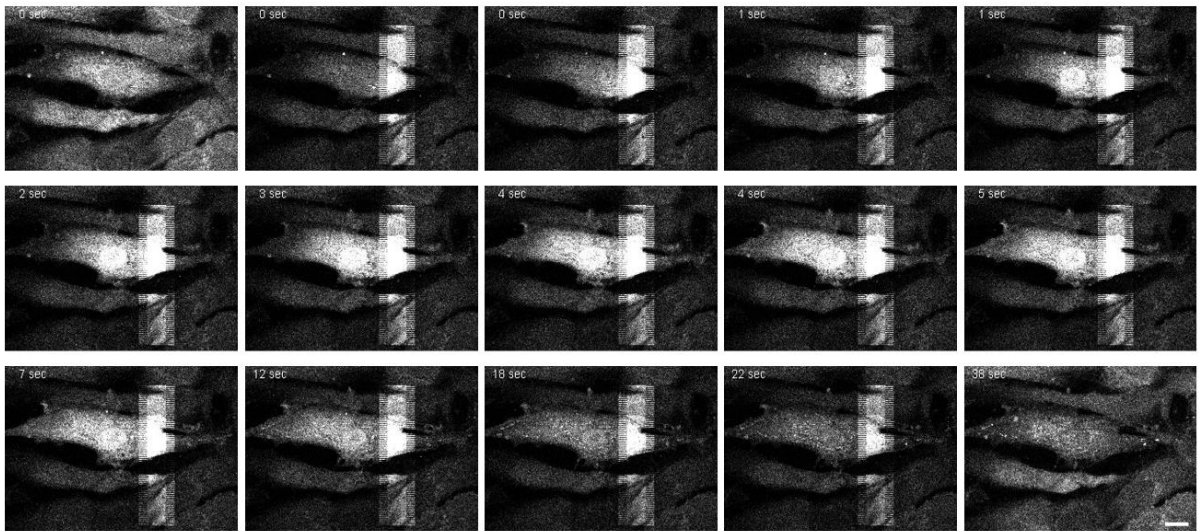
Норадреналин транзиторно повышал число клеток, отвечающих на норадреналин. Это могло быть связано как с изменением чувствительности МСК к этому гормону, так и с появлением новых клеток, способных отвечать на норадреналин. Для ответа на этот вопрос мы проанализировали, как изменяется чувствительность МСК к норадреналину после их преинкубации с этим гормоном. Когда мы подбирали оптимальную действующую концентрацию норадреналина, мы обнаружили, что МСК отвечают на норадреналин по принципу все-или-ничего. Мы предположили, что МСК

генерируют ответ на норадреналин в два последовательных этапа. Первоначально агонист запускал небольшой сигнал Ca^{2+} , вероятно, градуально зависящий от интенсивности гормонального стимула. При превышении некоего порога этот сигнал затем усиливался до уровня, максимально возможного для данной клетки, с помощью механизма кальций-индуцированного выхода кальция (CICR) [218, 219]. Если это предположение верно, то можно предположить, что каждое появление Ca^{2+} в цитоплазме МСК, если оно будет достаточно быстрым и высокоамплитудным, будет приводить к массивному выходу кальция из внутриклеточных депо. Мы сделали следующий эксперимент. Помимо кальций-чувствительного красителя Fluo-8, мы поместили в клетку светочувствительный хелатор кальция NP-EGTA. Этот химический агент представляет собой светочувствительный хелатор ионов кальция с высоким сродством к Ca^{2+} , при облучении светом 350 нм его K_d изменяется от 80 нМ до >1 мМ. Поглощение ультрафиолетового (УФ) света NP-EGTA приводит к высвобождению ионов Ca^{2+} , вызывая резкое увеличение уровня Ca^{2+} в цитоплазме [220]. Клетку, загруженную Fluo-8 и NP-EGTA, мы локально облучили ультрафиолетовым светом 350 нм (белая яркая область на представленных кадрах), после чего наблюдали за изменением уровня кальция в цитоплазме. Как видно на [Рис. 3.24 А-Б](#), в цитоплазме прошла кальциевая волна, начавшаяся в месте облучения ультрафиолетом, то есть там, где NP-EGTA высвободил ионы кальция. Этот результат однозначно свидетельствует о существовании в МСК механизма CICR. Последний может зависеть как от риаудиновых рецепторов, так и от ИФЗ-рецепторов на эндоплазматическом ретикулуме [218, 219].

Ответ МСК по принципу все-или-ничего позволил нам измерить пороговые значения появления ответа клеток на различные действующие концентрации норадреналина для измерения чувствительности МСК. Для этого на МСК, окрашенные кальциевым красителем Fluo-8, воздействовали ступенчато повышающимися концентрациями норадреналина в интервале 10 нМ-2000 нМ:

(концентрации 10, 20, 40, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000 нМ) и регистрировали кальциевые ответы клеток. В контрольных МСК пороговый уровень норадреналина для активации CICR составлял 431 ± 71 нМ. При этом преинкубация клеток с норадреналином в течение 1 часа через 6 часов приводила к более чем пятикратному повышению чувствительности МСК к этому гормону. Пороговое значение активации клеток снизилось с 431 ± 71 нМ до 88 ± 18 нМ, $p < 0,001$ (Рис. 3.24). Серая область на рисунке показывает интервал концентраций норадреналина, в котором клетки начинали отвечать. При этом клетки отвечали сразу максимально возможной амплитудой ответа, что подтверждает ответ по принципу все-или-ничего. Линия в серой области обозначает среднее значение концентрации норадреналина, при которой клетки начинали отвечать. Таким образом, норадреналин при действии на МСК вызывал транзиторное повышение чувствительности этих клеток к катехоламинам.

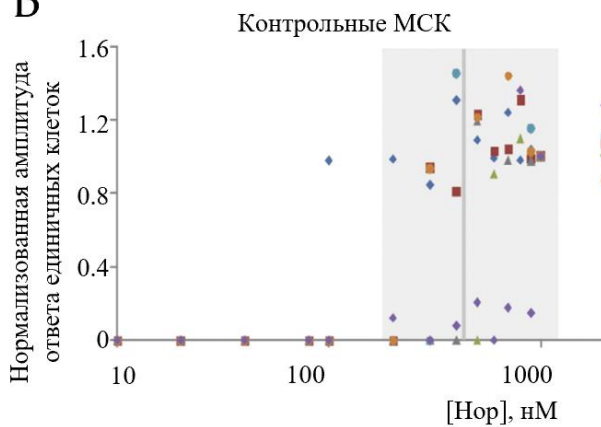
А



Б



В



Г

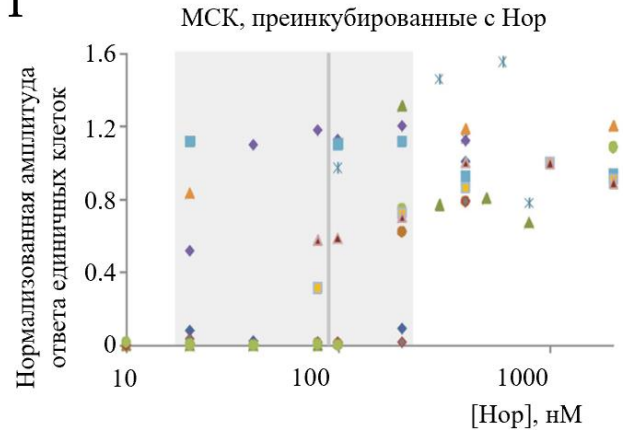


Рис. 3.24. А-Б. – Регистрация кальций-индуцированного выхода кальция в МСК. МСК заполнены кальциевым красителем Fluo-8 ($4 \mu\text{M}$) и светочувствительным хелатором кальция NP-EGTA ($4 \mu\text{M}$). А – временная развертка фильма по регистрации изменения внутриклеточного уровня кальция в единичной клетке. Видно прохождение кальциевой волны, начинающейся от места облучения клетки (белая полоса на кадре 0 сек). Масштаб 10 мкм. Б – кимограмма изменения свечения клетки: каждая горизонтальная линия

соответствует яркости флуоресценции кальциевого красителя вдоль оси клетки в одной временной точке фильма. Видно прохождение фронта кальциевой волны. В-Г. – Определение чувствительности МСК к норадреналину в контрольных клетках и через 6 часов после их преинкубации с норадреналином. Серая область на рисунке показывает интервал концентраций норадреналина, в котором клетки начинали отвечать. При этом клетки отвечают сразу максимально возможной амплитудой ответа, что подтверждает ответ по принципу все-или-ничего. Линия в серой области обозначает среднее значение концентрации норадреналина, при которой клетки начинают отвечать. Данные 3 независимых экспериментов. Точки одного типа обозначают ответы одной и той же клетки на разные концентрации норадреналина. Амплитуда ответов отдельных клеток была нормализована на высоту первого появившегося для этой клетки ответа.

Для выяснения механизма повышения чувствительности МСК к норадреналину мы проанализировали экспрессию адренергических рецепторов в МСК через 6 часов после преинкубации с 1 μ M норадреналина. Во-первых, мы проанализировали количество клеток, экспрессирующих отдельные изоформы адренорецепторов. Как видно на [Рис. 3.25, А](#), число клеток, положительных по экспрессии рецепторов, существенно не изменилось. Во-вторых, мы измерили среднюю интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных антителами к различным адренорецепторам. Этот показатель коррелирует с количеством молекул рецептора, представленных на поверхности клеток. Как видно на [Рис. 3.25, Б-В](#), представленность α 1A-адренергических рецепторов на поверхности МСК существенно (практически в 4 раза) выросла после преинкубации МСК с норадреналином. Это указывает на увеличение плотности α 1A-адренергических рецепторов на поверхности клетки, что могло быть связано с повышенным выходом рецепторов. При этом уровень других изоформ адренергических рецепторов не изменялся. Повышенная представленность рецепторов на поверхности клеток могла быть следствием выхода молекул рецептора из внутриклеточных депо либо синтеза рецепторов *de novo*. Для выяснения этого вопроса мы проанализировали общее содержание белка рецептора в клетке при помощи вестерн-блоттинга. Как

видно на [Рис. 3.25, Г-Д](#), (исходные мембраны вестерн-блоттинга см. Приложение 4), общее содержание белка $\alpha 1A$ -адренергического рецептора также повышалось в МСК, предварительно инкубированных с норадреналином. Это означает, что действие норадреналина приводило к синтезу дополнительного количества молекул $\alpha 1A$ -адренорецепторов и выходу их на поверхность МСК. Кроме того, мы проанализировали функциональность вышедших на поверхность $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов ([Рис. 3.26, А-В](#)). После преинкубации с норадреналином доля клеток, отвечавших на $\alpha 1$ -агонист фенилэфрин, выросла в 2 раза, тогда как доля МСК, отвечавших на $\alpha 2$ -агонист клонидин, не изменилась.

Таким образом, норадреналин транзиторно повышал чувствительность МСК к катехоламинам за счет повышения общего клеточного содержания функционально-активных $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов и их выхода на поверхность клетки.

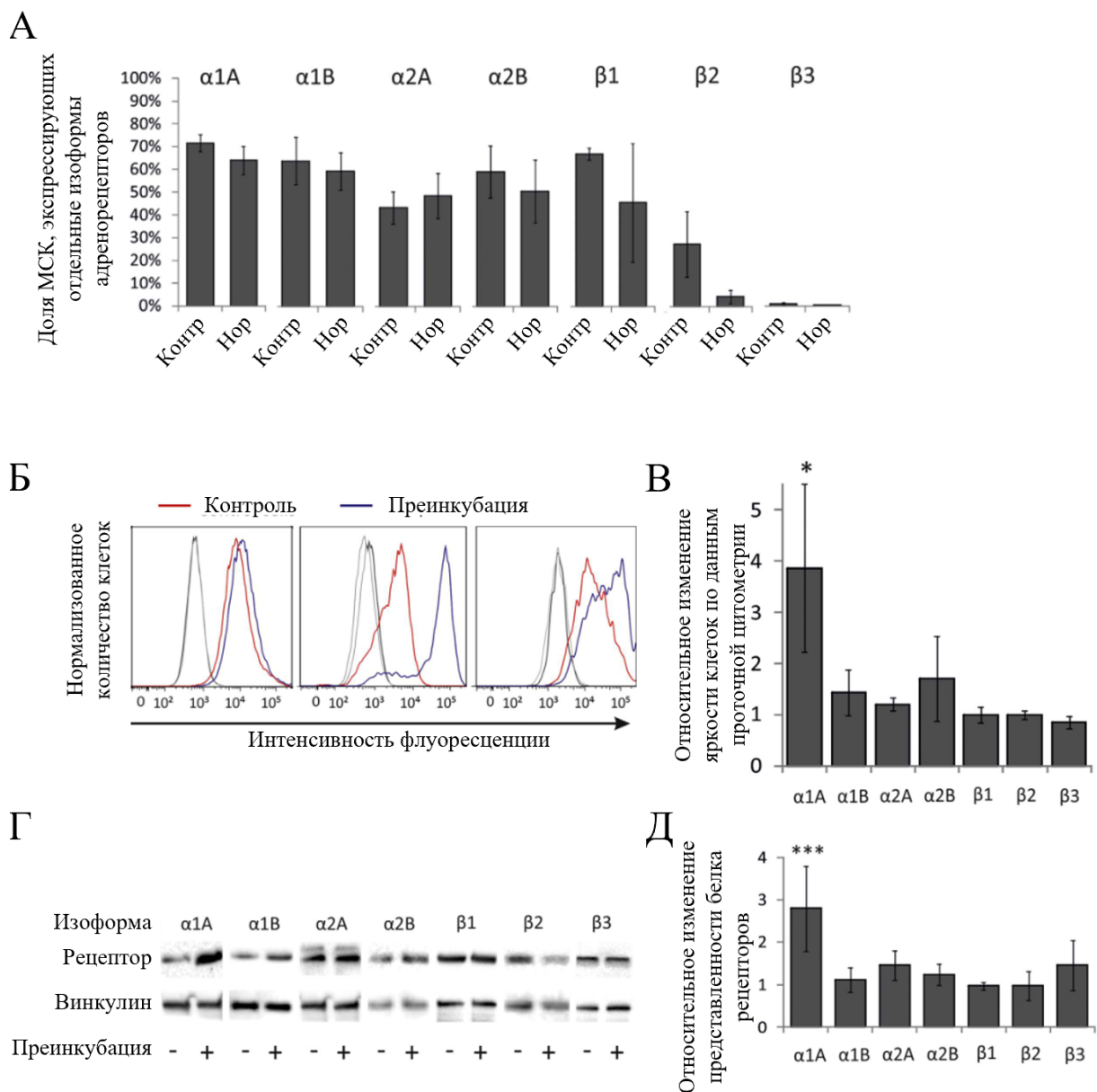


Рис. 3.25. Обработка норадреналином увеличивала количество $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК. А. – Доля МСК, экспрессирующих различные адренергические рецепторы, после преинкубации с норадреналином (Нор) по сравнению с необработанными клетками (Контроль). Среднее значение \pm стандартная ошибка, $n = 8$. Б. – Репрезентативные графики проточной цитометрии с антителами против $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК через 6 часов после стимуляции норадреналином (синие кривые), по сравнению с контрольно обработанными МСК, (добавление среды роста клеток, красные кривые). Графики получены от трех разных пациентов. Графики IgG показаны серыми кривыми. В. – Относительное изменение средней интенсивности флуоресценции МСК, предварительно инкубированных с норадреналином, по сравнению с контрольными клетками. Среднее \pm стандартная ошибка, $n=8$, * $p<0,05$. Г. – Репрезентативные мембраны вестерн-блоттинга с окрашенными различными изоформами адренергических рецепторов в контрольных МСК и МСК,

преинкубированных с 1 μM норадреналина. Д. – Среднее относительное изменение интенсивности полос адренергических рецепторов вестерн-блоттинга в клетках, предварительно обработанных 1 μM норадреналина, по сравнению с контрольными клетками, обработанными растворителем. Среднее \pm стандартная ошибка, $n=10$, $*p<0,05$.

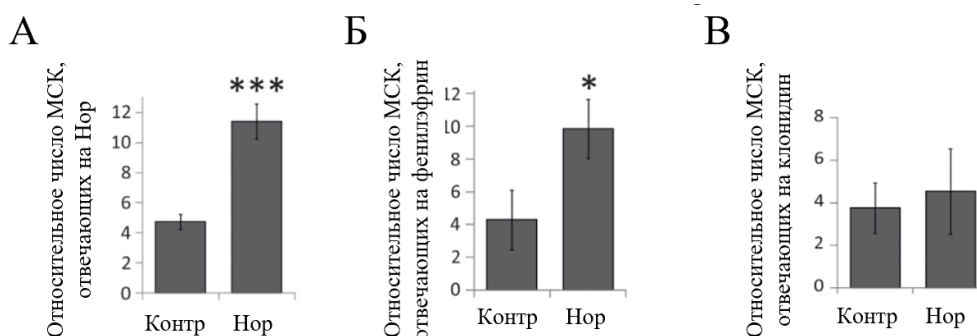


Рис. 3.26. А. – Относительное количество МСК, отвечающих на 1 μM норадреналина через 6 часов после преинкубации клеток с 1 μM норадреналина. Б. – Относительное количество МСК, отвечающих на $\alpha 1$ -агонист фенилэфрин (100 μM) через 6 часов после преинкубации клеток с норадреналином. Среднее \pm стандартная ошибка, $n=12$, $*p<0,05$. В. – Относительное количество МСК, отвечающих на $\alpha 2$ -агонист клонидин (100 μM) через 6 часов после преинкубации клеток с норадреналином. Среднее \pm стандартная ошибка, $n=10$.

3.4.5. Механизмы норадреналин-зависимого повышения чувствительности МСК к норадреналину

Далее мы установили, какие изоформы адренергических рецепторов и связанные с ними сигнальные каскады ответственны за изменение чувствительности МСК после воздействия на них норадреналина. Мы воздействовали на МСК специфическими агонистами различных изоформ адренорецепторов, а также норадреналином в присутствии антагонистов адренорецепторов. После часовой обработки клеток через дополнительные 5 часов регистрировали ответ клеток на норадреналин при помощи флуоресцентной микроскопии и кальциевого красителя Fluo-8. Преинкубация

МСК с $\alpha 1$ -агонистом фенилэфрином и $\alpha 2$ -агонистом клонидином не изменяла количество отвечающих на норадреналин клеток. При этом β -агонист добутамин увеличивал чувствительность МСК к норадреналину (Рис. 3.27, А). Антагонист β -адренорецепторов альпренолол предотвращал развитие эффекта норадреналина (Рис. 3.27 Б). Мы провели дополнительный контроль для демонстрации того, что добутамин увеличивал долю клеток, реагирующих на норадреналин путем активации именно $\alpha 1$ -адренергических рецепторов (Рис. 3.27, В). Таким образом, увеличение числа клеток, чувствительных к норадреналину, в результате воздействия норадреналина осуществлялось через β -адренорецепторы.

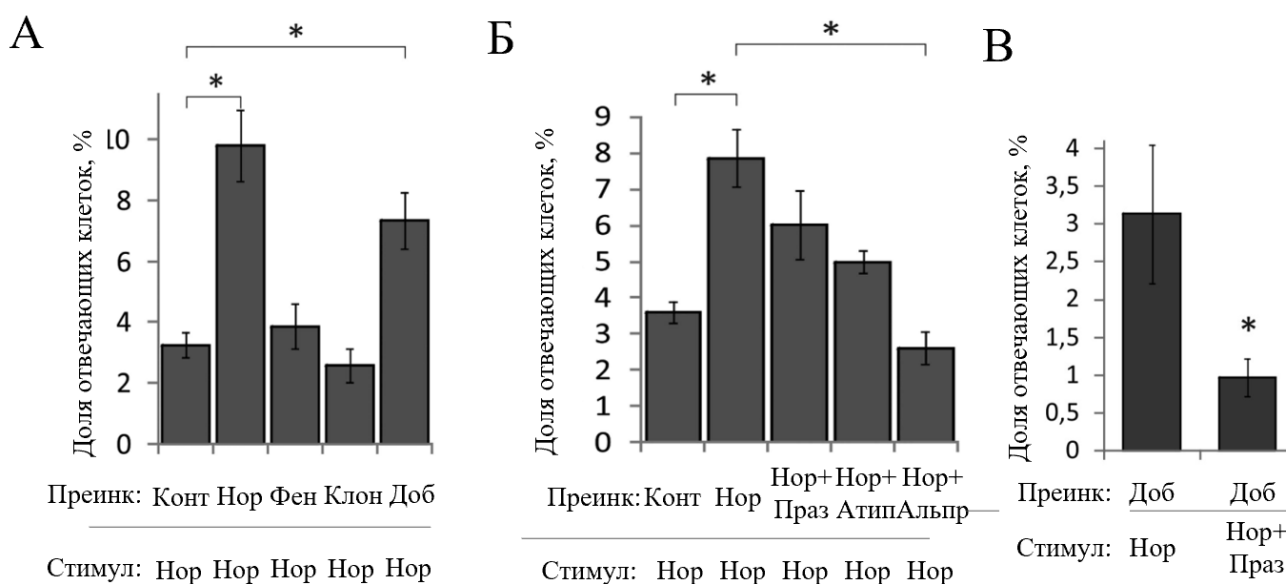


Рис. 3.27. β -адренергические рецепторы регулировали количество МСК, реагирующих на норадреналин. А. – Доля МСК, реагирующих на норадреналин через 6 часов после предобработки адренергическими агонистами (1 μM норадреналина (Нор), 100 μM $\alpha 1$ -агониста фенилэфрина (Фен), 100 μM $\alpha 2$ -агониста клонидина (Клон), 1 μM β -агониста добутамина (Доб) или в контрольных условиях (Конт)). Среднее значение \pm ст.ош., $n = 14\text{--}21$, * $p < 0,05$. Б. – Доля МСК, отвечающих на норадреналин через 6 часов после предобработки норадреналином в присутствии антагонистов адренергических рецепторов (10 μM $\alpha 1$ -антагониста празозина (Праз), 100 μM $\alpha 2$ -антагониста атипамезола (Атип), 10 μM β -антагониста альпренолола (Альпр) или в контрольных условиях (Конт)). Среднее значение \pm ст.ош., $n = 6\text{--}12$, * $p < 0,05$. В. – Доля МСК, реагирующих на норадреналин либо

норадреналин в присутствии $\alpha 1$ -антагониста празозина (Праз, 10 μM) через 6 часов после предварительной инкубации с норадреналином. Среднее значение \pm ст.ош., $n = 3-6$, $*p < 0,05$.

β -адренорецепторы передают сигналы преимущественно через активацию G_s -белка, запуск аденилатциклаз (АЦ) и синтез цАМФ [221]. Далее цАМФ активирует либо протеинкиназу А, либо неканоническую мишень цАМФ, белок Ерас. У этих белков имеются как цитоплазматические мишени, так и ядерные. Ключевой цАМФ-зависимый транскрипционный фактор – это CREB (Рис. 3.28). Для выяснения механизма регуляции чувствительности МСК к норадреналину мы проанализировали эти сигнальные каскады.

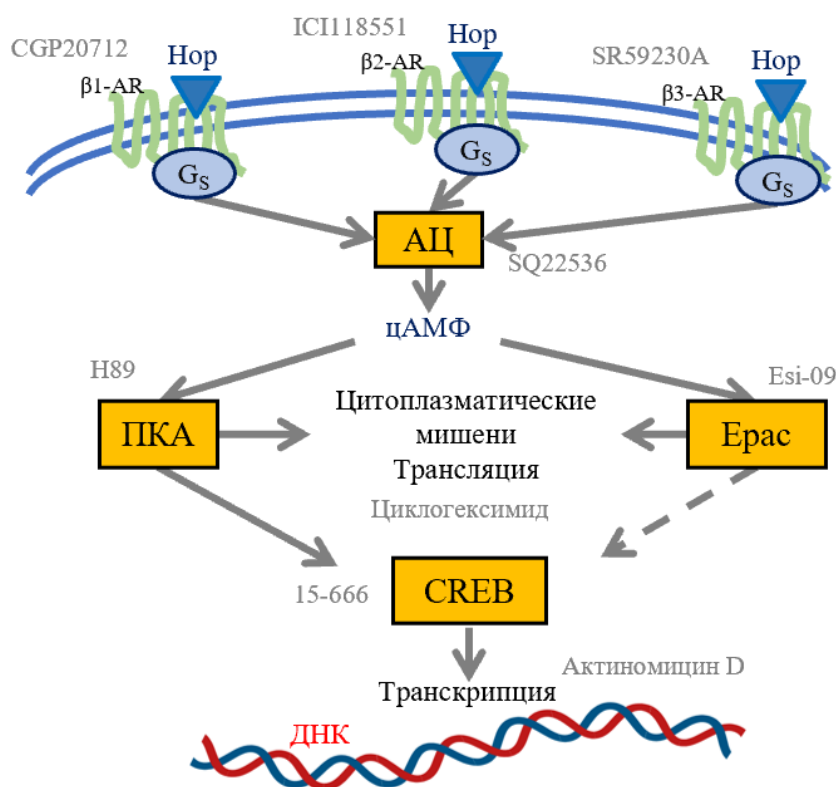


Рис. 3.28. Схема β -адренорецептор-зависимого сигнального пути с ключевыми мишенями участие которых в развитии эффекта сенситизации к норадреналину проверялось при помощи ингибиторного анализа. Используемые ингибиторы специфических мишеней указаны серым шрифтом.

Во-первых, при помощи ингибиторного анализа мы выяснили, какая конкретно изоформа β -адренорецепторов опосредовала действие норадреналина на чувствительность МСК. Мы использовали специфические ингибиторы β 1-адренорецепторов (CGP20712, 0.1 μ M), β 2-адренорецепторов (ICI118551, 0.05 μ M) и β 3-адренорецепторов (SR59230A, 0.25 μ M). Как показано на [Рис. 3.29](#), ингибирование β 3-адренорецепторов нивелировало потенцирующий эффект норадреналина, поскольку только в случае SR59230A+Нор наблюдалось статистически достоверное снижение по сравнению с выборкой Нор. Ингибирование β 2-адренорецепторов показывало статистически не значимую тенденцию к снижению эффекта.

Ключевую роль β 3-адренорецепторов в описываемом процессе мы дополнительно проверили при помощи нокаута белка с использованием CRISPR-Cas9 системы ([Рис. 3.30](#), исходные мембраны вестерн-блоттинга см. Приложение 5). Для подавления экспрессии этих рецепторов в данном эксперименте мы использовали иммортализованные МСК жировой ткани коммерчески доступную линию ASC52-telo. Поскольку ингибирование β 2-адренорецепторов химическими ингибиторами показывало тенденцию к подавлению эффекта, их вклад в эффект норадреналина мы тоже проверили путем нокаута. Как показано на ([Рис. 3.31](#)), нокаут β 3-адренорецепторов, но не β 2-адренорецепторов привел к предотвращению норадреналин-зависимого повышения чувствительности МСК к норадреналину.

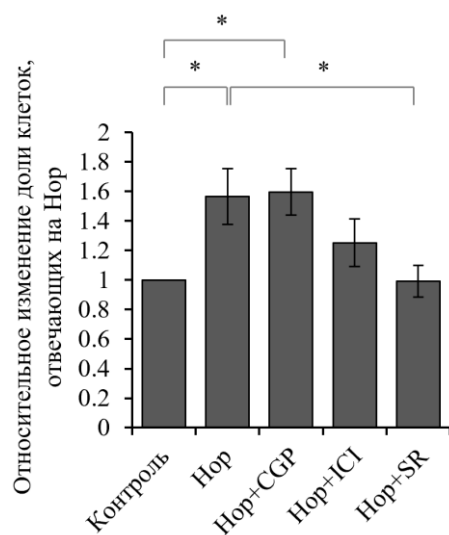


Рис. 3.29. Ингибиторный анализ β -адренорецепторов, инициирующих повышение чувствительности МСК к норадреналину. β 1-антагонист CGP20712 (100 нМ, CGP), β 2-антагонист ICI18551 (50 нМ, ICI) и β 3-антагонист SR59230A (250 нМ, SR) Среднее значение \pm ст.ош., n = 12-19, *p < 0,05.

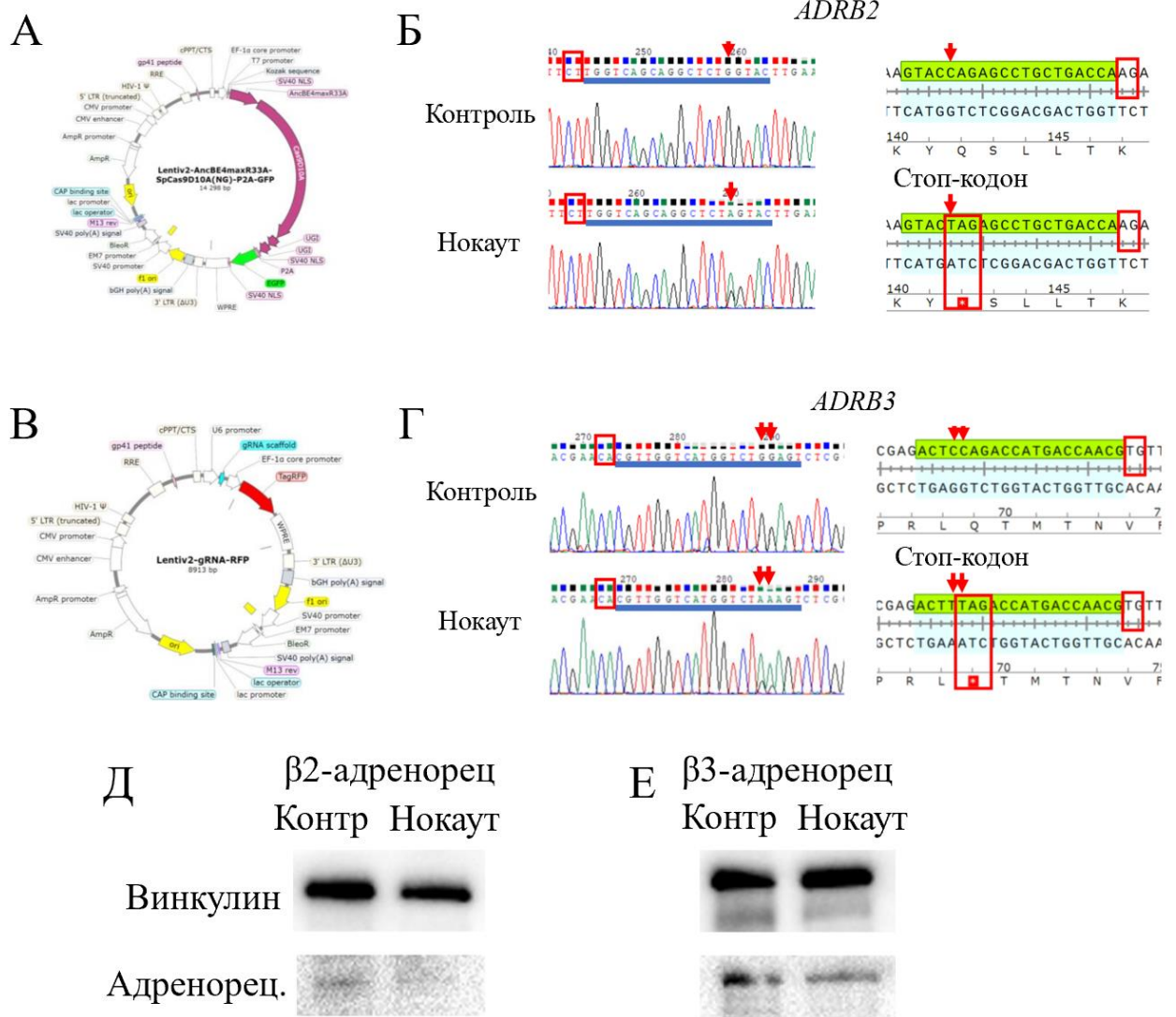


Рис. 3.30. Подтверждение CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов *ADRB2*/*ADRB3* в клеточной линии MCK жировой ткани ASC52telo. А. – Lentивирусные конструкции, использованные для нокаута генов *ADRB2*. Б. – Ампликоны геномной ДНК с нокаутом *ADRB2*. В. – Lentивирусные конструкции, использованные для нокаута генов *ADRB3*. Г. – Ампликоны геномной ДНК с нокаутом *ADRB3*. Д-Е. – вестерн-блот-анализ уровня экспрессии β2- (А) и β3-адренергических (Б) рецепторов после нокаута, соответственно, *ADRB2* или *ADRB3* в ASC52telo.

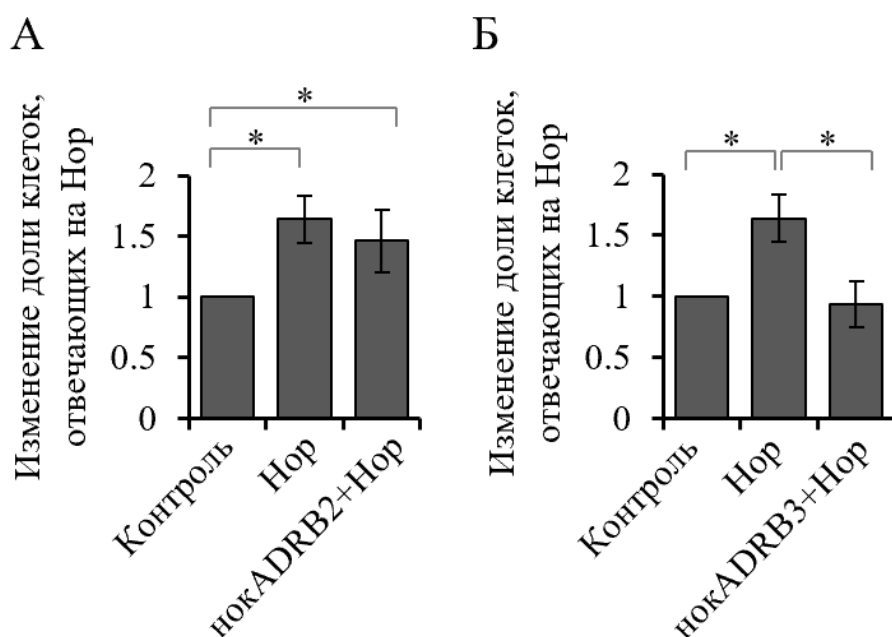


Рис. 3.31. Относительное изменение доли клеток, ответивших на норадреналин после преинкубации с норадреналином линейных МСК (линия ASC52), а также клеток после нокаута ADRB2 (А) или ADRB3 (Б). Среднее значение \pm ст.ош., $n = 4-7$, $*p < 0,05$.

Для выяснения компонентов сигнальных каскадов, задействованных в реализации эффекта норадреналина на МСК, мы провели ингибиторный анализ. Активация аденилатциклазы форсколином ($1 \mu\text{M}$) имитировала эффект норадреналина. При этом ингибитор аденилатциклаз SQ22536 ($1 \mu\text{M}$), предотвращал эффект норадреналина как на число чувствительных клеток, так и на повышение экспрессии $\alpha 1\text{A}$ -адренорецепторов (Рис. 3.32). При помощи ингибиторов протеинкиназы А (ингибитор Н89, $5 \mu\text{M}$) и белка Ерас (ингибитор Esi09, $10 \mu\text{M}$) мы показали вклад протеинкиназы А, но не Ерас в развитие эффекта норадреналина (Рис. 3.33, А-Б). Далее мы установили, что повышение чувствительности МСК к норадреналину, которое, как мы показали выше, обусловлено повышением содержания белка $\alpha 1\text{A}$ -адренорецепторов, не связано с усилением транскрипции его гена, но ассоциировано с трансляцией мРНК. Неспецифический ингибитор транскрипции актиномицин D (4 nM) не влиял на развитие стимулирующего эффекта норадреналина, тогда как блокирование

трансляции циклогексимидом (90 нМ) полностью убирало эффект. При этом уровень мРНК $\alpha 1A$ -адренорецепторов не изменялся несмотря на рост представленности белка (Рис. 3.33, В-Г). Таким образом, чувствительность МСК к норадреналину регулировалась за счет активации $\beta 3$ -адренорецепторов, которые запускали цАМФ-зависимым образом протеинкиназу А. Последняя, действуя на цитоплазматические мишени, повышала уровень белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов, не затрагивая транскрипцию его гена (Рис. 3.34).

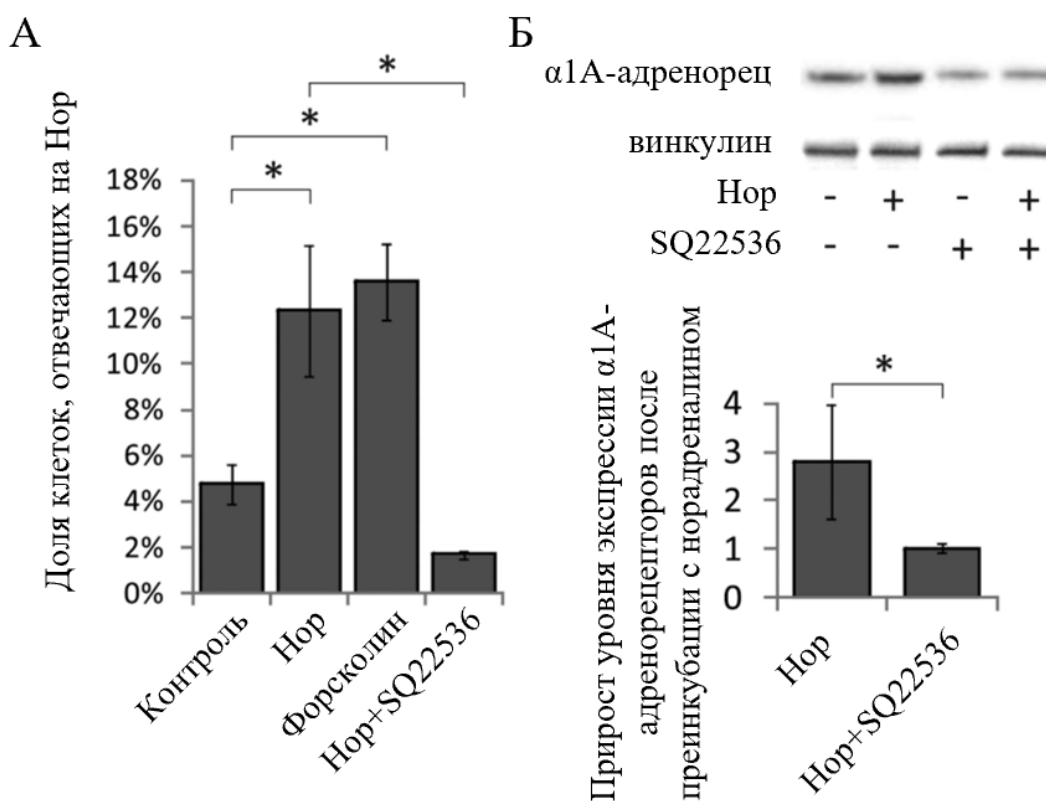


Рис. 3.32. А. – Доля отвечающих на норадреналин МСК через 6 часов после предобработки клеток норадреналином (Нор), активатором аденилатциклазы форсколином (1 μ М) или норадреналином в присутствии 1 μ М ингибитора аденилатциклазы SQ22536 (SQ). Среднее значение \pm ст.ош., n = 3–6, *p < 0,05. Б. – Прирост уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов после преинкубации с норадреналином предотвращался ингибированием аденилатциклазы. Репрезентативные мембраны вестерн-блоттинга, покрашенные антителами против $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Относительное изменение интенсивности полос вестерн-блоттинга клеток, предварительно обработанных 1 μ М норадреналина, по сравнению с клетками, обработанными растворителем. Вещества, с которыми была проведена преинкубация, указаны под столбцами. Среднее значение \pm ст.ош., n = 5, *p < 0,05.

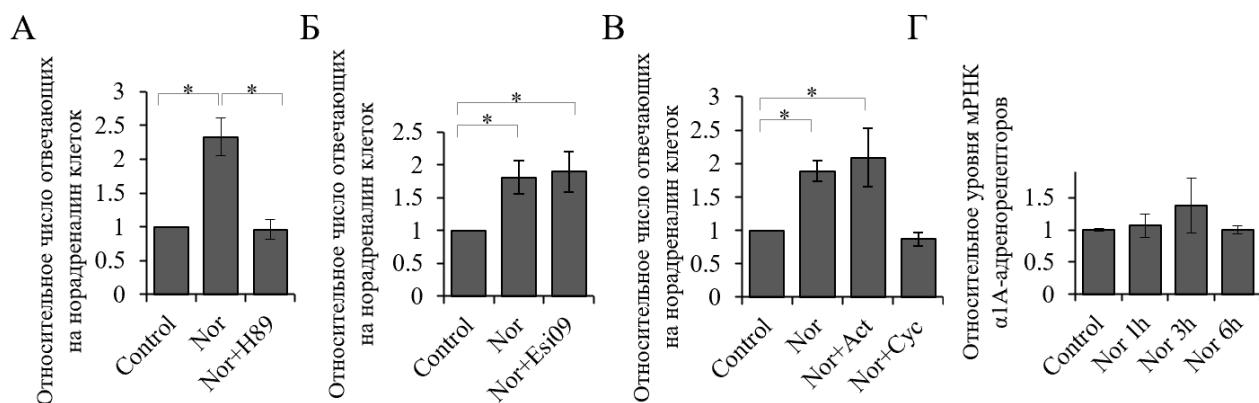


Рис. 3.33. Ингибиторный анализ сигнальных каскадов, активируемых β -адренорецепторами, регулирующих чувствительность МСК к норадреналину. А-Б. – Норадреналин увеличивал долю МСК, реагирующих на норадреналин за счет активации ПККА (А), но не ЕРАС (Б). Н89 - ингибитор ПККА (5 μ М, n=7-8) Esi09 - ингибитор ЕРАС (10 μ М, n = 7-10). В-Г. – эффект норадреналина реализуется посредством регуляции трансляции, но не транскрипции гена α 1А-адренорецепторов. Ингибирование транскрипции актиномицином D (Акт, 4 нМ, n = 14) не подавляло норадреналин-зависимое увеличение доли МСК, реагирующих на норадреналин. Ингибирование трансляции циклогексимином (Сус, 90 нМ, n = 8-10) ингибировало норадреналин-зависимое увеличение доли МСК, реагирующих на норадреналин. (Г) Динамика уровня мРНК α 1А-адренорецепторов после добавления норадреналина (1 μ М), n = 8-10. Данные представляют собой среднее значение \pm ст.ош., * p < 0,05.

3.4.6. Обсуждение. Сенситизация α 1А-адренорецепторов как возможный механизм инициации МСК

Показанный нами эффект повышения чувствительности клеток к действующему на них норадреналину является уникальным для клеток взрослого организма. В то же время, в эмбриогенезе показан схожий сигнальный феномен. При созревании адренергической сигнализации в эмбриогенезе чувствительность клеток за счет экспрессии β -адренорецепторов появляется раньше, чем начинают синтезироваться катехоламины [222]. При появлении катехоламинов β -адренорецепторы клеток сердца в этот период

индивидуального развития не десенситизируются и не подавляются β -агонистами [217]. Наоборот, стимуляция β -агонистами приводит к повышению чувствительности этих клеток к катехоламинам. Воздействие катехоламинов на β -адренорецепторы приводит, во-первых, к увеличению плотности β -адренорецепторов на поверхности кардиомиоцитов, во-вторых, к изменению внутриклеточного уровня экспрессии G-белков со сдвигом в передаче сигналов от Gi-белка к Gs-белку. Кроме того, изменяется спектр экспрессируемых изоформ аденилатциклаз [223]. Согласно нашим данным, норадреналин приводит к транзиторной сенситизации МСК к катехоламинам. Однако, в отличие от эмбриональных тканей, стимуляция МСК катехоламинами приводила к специфическому повышению уровня экспрессии не β -, а α 1A-адренорецепторов. Тем не менее, показанный феномен может свидетельствовать, что в МСК проявляются регуляторные механизмы, схожие с эмбриональными прогениторными клетками.

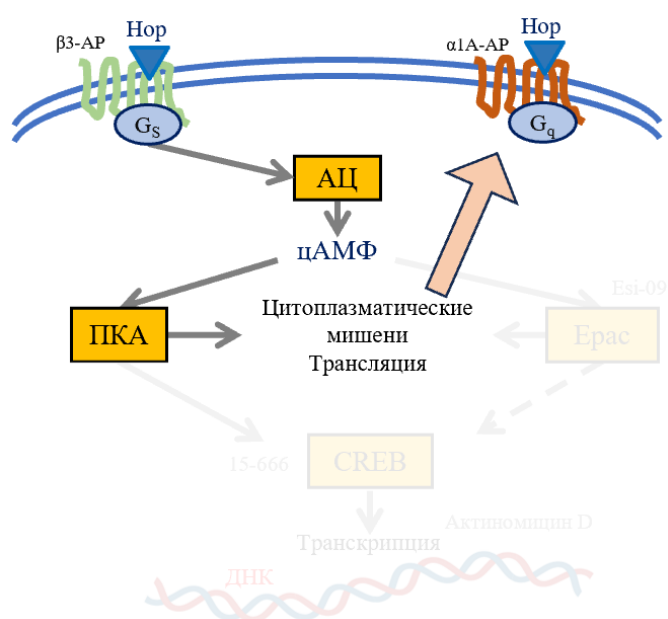


Рис. 3.34. Схема, описывающая сигнальный каскад, приводящий к повышению чувствительности МСК к норадреналину, которое ассоциировано с инициацией клеток.

Мы показали один из возможных путей инициации МСК, которая производилась путем действия на стволовую клетку норадреналина.

Последний, вероятно, выделяется из симпатических волокон, непосредственно иннервирующих МСК в ткани. Норадреналин регистрировался β -адренорецепторами, которые запускали цАМФ-зависимые сигнальные каскады, в результате чего на поверхность клеток выходили α 1А-адренорецепторы (Рис. 3.34). β -адренорецепторы, по-видимому, подвергались десенситизации. Это приводило к изменению чувствительности МСК: на повторное воздействие норадреналина клетки отвечали не β -адренорецептор/цАМФ-зависимым путем, а α 1А-адренорецептор/ Ca^{2+} -зависимым образом. При этом чувствительность клеток к норадреналину существенно возрастала. Кроме того, что представляется крайне важным, наблюдаемый сигнальный эффект носил транзиторный характер, что соответствует нашим данным о транзиторности перехода МСК в инициированное состояние.

Подводя промежуточный итог, можно заключить (Рис. 3.35), что МСК на начальных этапах активации переходили в особое функциональное состояние, которое мы назвали инициированным. В этом состоянии МСК приобретали возможность произвести выбор дальнейшей судьбы клетки. Именно из этого состояния клетки направлялись на самообновление (пролиферацию) либо дифференцировку в одном из возможных для этой мультипотентной клетки направлениях. Инициированное состояние характеризовалось транзиторностью: клетки в нем находились ограниченное время, после чего возвращались в исходное состояние. В инициированном состоянии изменялась чувствительность МСК к гормонам-регуляторам: снижалось число клеток, экспрессирующих β -адренорецепторы, но значительно увеличивалась чувствительность клеток к передаче сигнала от катехоламинов через кальций-зависимые α 1А-адренорецепторы. Это переключение сигнализации тоже носило транзиторный характер. В целом, можно предположить, что инициированное состояние являлось ключевым этапом выхода МСК из

стромальной ниши, которая носит не структурный характер, а функциональный.

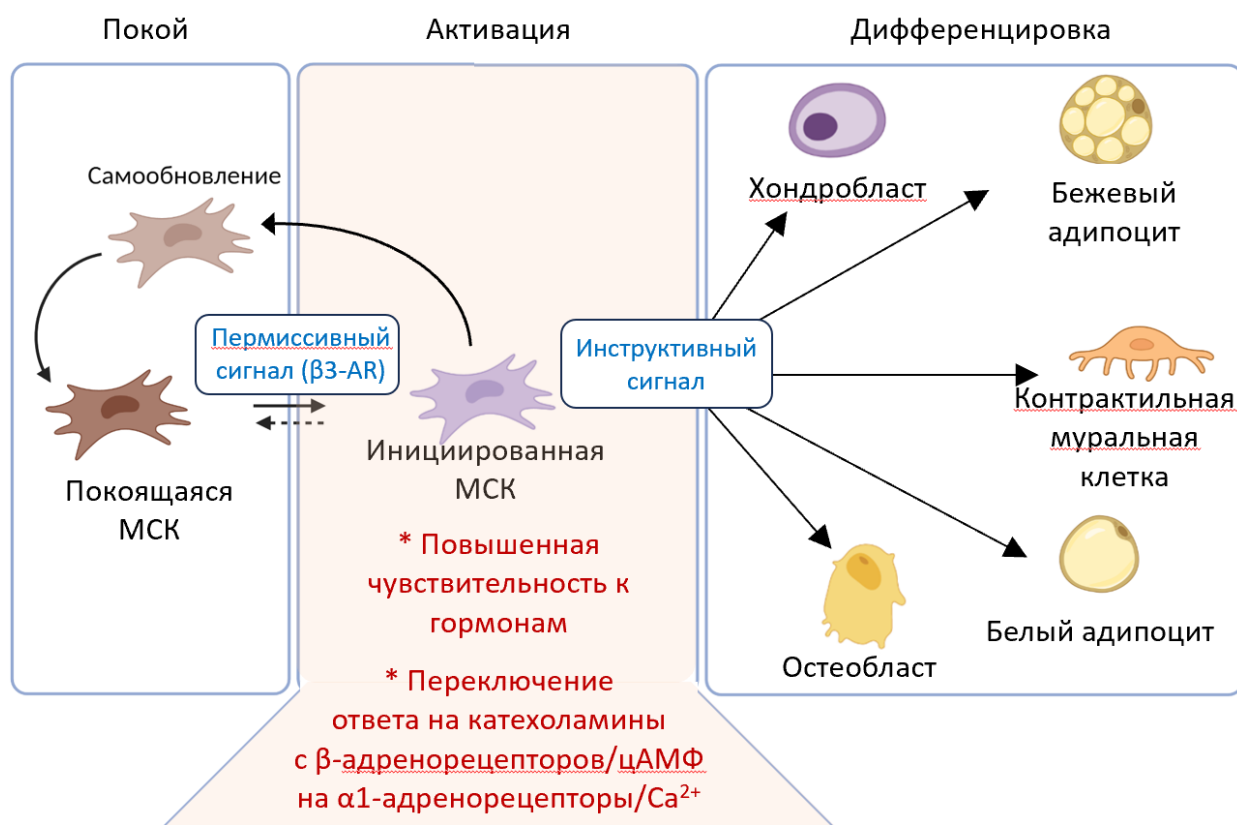


Рис. 3.35. Схема начальных этапов активации МСК – транзитный переход в инициированное состояние, характеризующееся повышенной чувствительностью к гормонам и измененной функциональной активностью клеток. В этом инициированном состоянии мультипотентные стволовые клетки осуществляли выбор дифференцировочной судьбы. Переход в инициированное состояние носил транзитный характер.

3.5. Дифференцировка МСК в контрактильный фенотип

По аналогии с эмбриональными клетками-предшественниками, сигналы, переводящие МСК в инициированное состояние, можно назвать пермиссивными сигналами. Эти сигналы необходимы для направления

стволовой клетки в дифференцировку или самообновление, но при этом сами по себе не задают направления выбора судьбы клетки. Они необходимы, но не достаточны для прохождения дифференцировки стволовой клетки. В нашем случае перmissiveм сигналом выступила стимуляция β 3-адренорецепторов. Соответственно, после действия permissiveм сигнала на клетку должен подействовать instructивный сигнал, который, во-первых, стволовая клетка сможет воспринять только в иницированном состоянии, во-вторых, определит точное направление дифференцировки клетки. Для поиска instructивных сигналов мы на первом этапе последовали следующей логике: инициация МСК приводила к изменению гормональной чувствительности клеток за счет транзитного повышения уровня экспрессии α 1A-адренорецепторов. Мы проверили, является ли стимуляция вышедших на поверхность клеток α 1A-адренорецепторов instructивным сигналом для одного из направлений дифференцировки МСК.

3.5.1. Локализация α 1A-адренорецепторов в жировой ткани

Перед началом изучения роли α 1A-адренорецепторов в регуляции функциональной активности МСК в жировой ткани мы выяснили, где располагаются в ткани клетки, экспрессирующие эти рецепторы. Мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание срезов подкожной жировой ткани человека. Как видно на [Рис. 3.36](#) (другие изображения и целые сканированные срезы см. Приложение 6; экспрессия других изоформ α 1-адренорецепторов см. Приложение 7; IgG контроль – см. Приложение 8), α 1A-адренорецепторы экспрессировались в подкожной жировой ткани живота, в основном, в районе кровеносных сосудов. При этом они не колокализировались с эндотелием ([Рис. 3.36, А](#)) и, что особенно удивительно, не колокализировались с ГМК ([Рис. 3.36, Б](#)). α 1-адренорецепторы, в первую очередь, α 1A-изоформа, являются ключевыми адренорецепторами, регулирующими контракцию малых

резистивных сосудов в жировой ткани [224, 225]. Они являются сенсорами симпатических сигналов, которые ведут к сокращения ГМК. В связи с этим, до сих пор по умолчанию считалось, что $\alpha 1A$ -адренорецепторы в составе сосудов экспрессируются на ГМК. Согласно нашим результатам, в малых резистивных сосудах подкожной жировой ткани живота $\alpha 1A$ -адренорецепторы строго колокализовались с перицитами, выкрашенными по их маркеру PDGFR β . Можно предположить, что норадреналин вызывает сокращение мелких сосудов жировой ткани не прямым воздействием на ГМК, а опосредованно, через воздействие на перициты. Последние уже при помощи паракринных факторов индуцируют сокращение ГМК. Стимулом к сокращения может быть передача ряда цитокинов в растворимой форме. Кроме того, перициты обладают крайне высокой склонностью к образованию щелевых контактов, через которые можно предположить прямую передачу цитоплазматического кальция при формировании сократительного ответа. Учитывая, что ГМК сосуда должны сокращаться скоординированно, этот механизм выглядит обоснованным: клетка-регулятор перицит выступает своеобразным фильтром внешних для малого резистивного сосуда сигналов и координатором сократительного ответа сосуда как целого. Таким образом, $\alpha 1A$ -адренорецепторы в жировой ткани локализовались периваскулярно и располагались на перицитах.

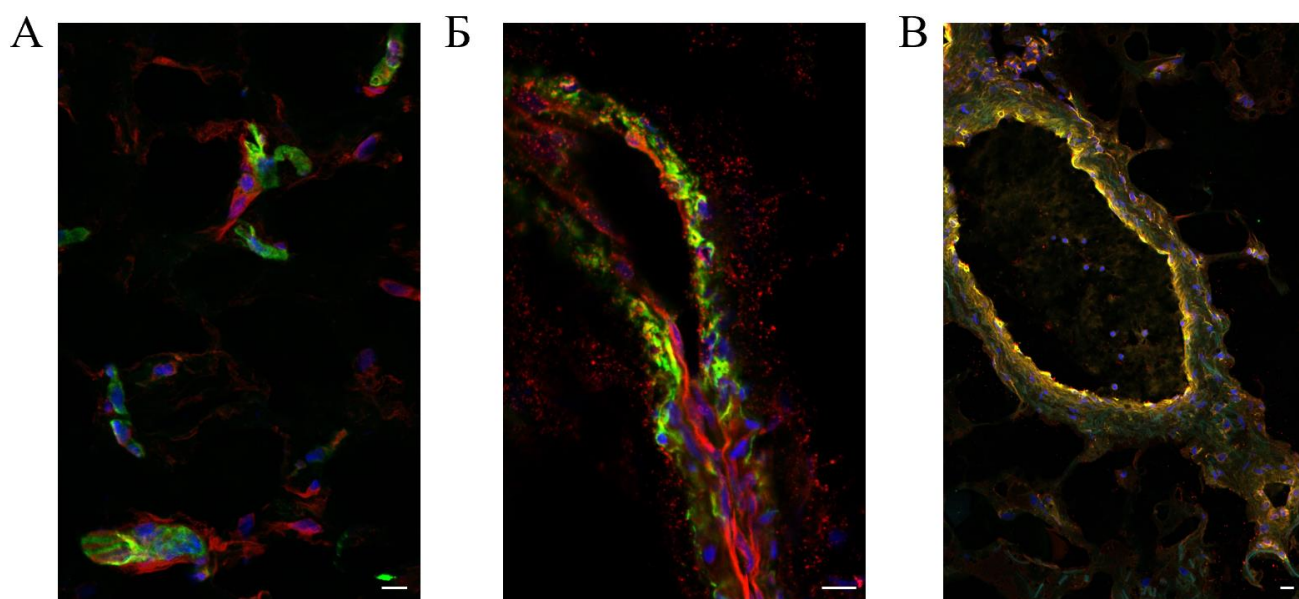


Рис. 3.36. Иммунофлуоресцентное окрашивание жировой ткани человека. (А-В) Репрезентативные конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. (А) Окрашивание эндотелия (CD31, зеленый) и клеток, экспрессирующих $\alpha 1A$ -адренорецепторы ($\alpha 1A$ -адренорецепторы, красный). (Б) Окрашивание гладкомышечных клеток (α SMA, зеленый) и клеток, экспрессирующих $\alpha 1A$ -адренорецепторы ($\alpha 1A$ -адренорецепторы, красный). (В) Окрашивание перицитов (PDGFR β , зеленый) и клеток, экспрессирующих $\alpha 1A$ -адренорецепторы ($\alpha 1A$ -адренорецепторы, красный). Ядра окрашены Dapi (синий). Масштаб 10 μ M.

3.5.2. *scRNAseq* анализ изменения МСК в направлении контрактильного фенотипа

Для общего понимания того, что происходило с клетками после стимуляции вышедших на поверхность инициированных МСК $\alpha 1A$ -адренорецепторов мы воспользовались *scRNAseq*. Для этого мы подвергли свежесыведенные МСК (операции проводились на 1 пассаже) первичному воздействию норадреналина в течение 1 часа для их инициации и далее через 6 часов – простимулировали вышедшие на поверхность клетки $\alpha 1A$ -адренорецепторы повторным воздействием норадреналина в течение 1 часа. В качестве контроля выступала

та же популяция МСК, подвергнутая всем тем же манипуляциям, но без норадреналина. В анализ мы брали клетки через 12 часов после второго воздействия гормона. После проведения scRNAseq анализа мы интегрировали образцы для выявления различий между отдельными субпопуляциями клеток. На Рис. 3.37 видно, что после интеграции в объединенном образце выявилось 6 субпопуляций, характеризующихся особым паттерном экспрессии генов. Кластер 3 соответствовал клеткам, находящимся в базальном состоянии. Он состоял из активно синтезирующих клеток с высоким уровнем аэробного метаболизма. В нем была повышена экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ (*COX7A1*, *COX7A2*, *ATP5F1E*), а также рибосомальные белки (*RPLA1*, *RPL28*, *RPS28*, *RPS12*). Кластер 0 соответствовал делящимся клеткам (*TOP2A*, *MKI67*, *CENPF*, *GTSE1* и *CDK1*). Кластер 1 – инициированные клетки. Кластер 4 – фибробласты (повышенная экспрессия генов внеклеточного матрикса *COL16A1*, *LAMB2*, *COL6A1*, *COL6A2*, *FN1*, *FBLN2*, *COL1A1*, *COL1A2* и клеточной адгезии *ITGB1*, *THBS1*, *THBS2*). 5 кластер представлял собой клетки, обладающие контрактивным фенотипом (повышенная экспрессия *ACTA2*, *ACTG2*, *MYOCD*, *MYL9*, *MYH11*, *MYLK*, *TAGLN*, *LMOD1* и *CALD1*) (Таблица 3).

Таблица 3. Ключевые гены, экспрессия которых дифференциально повышена в кластере 5

Ген	Расшировка	Повышение	P-value
ACTG2	actin gamma 2, smooth muscle	28,951	$1,25 \cdot 10^{-228}$
ADGRF5	adhesion G protein-coupled receptor F5	28,693	$4,30 \cdot 10^{-229}$
CD36	CD36 molecule	20,754	$3,23 \cdot 10^{-70}$
NES	nestin	16,030	$6,87 \cdot 10^{-126}$

MYH11	myosin heavy chain 11	13,825	1,86*10 ⁻²⁸⁷
MCAM	melanoma cell adhesion molecule	10,381	5,03*10 ⁻⁸⁷
ITGA1	integrin subunit alpha 1	8,243	1,27*10 ⁻⁷³
COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain	7,375	1,44*10 ⁻⁶⁹
PLN	phospholamban	6,619	8,34*10 ⁻²⁶⁷
PDGFA	platelet derived growth factor subunit A	6,340	4,71*10 ⁻⁶⁸
MYLK	myosin light chain kinase	6,172	3,76*10 ⁻⁶⁴
GJA5	gap junction protein alpha 5	5,679	1,16*10 ⁻²³⁹
ACTA2	actin alpha 2, smooth muscle	5,602	2,97*10 ⁻⁵⁷
CALD1	caldesmon 1	2,381	1,57*10 ⁻⁴⁷
MYOCD	myocardin	2,353	2,96*10 ⁻⁹
TAGLN	transgelin	2,066	3,59*10 ⁻³⁶
MYL9	myosin light chain 9	2,049	3,92*10 ⁻⁴⁹

Далее мы проанализировали, как инициация клеток с последующим воздействием на вышедшие на поверхность $\alpha 1A$ -адренорецепторы повлияла на ключевые субпопуляции МСК. Для этого мы попарно сравнили число клеток, попавших в каждую из субпопуляций в контрольном и опытном массивах. Визуально результаты сравнения представлены на [Рис. 3.37, Г](#) в виде секторных графиков на фоне каждого из кластеров. Цвет соответствует массиву, а относительная величина секторов – числу клеток данного кластера в этом массиве. Во всех субпопуляциях обнаруживались клетки и контрольного, и экспериментального образцов, однако доля клеток каждого образца

различалась. Наибольший рост показали кластеры контрактильных клеток (кластер 5) и инициаторной субпопуляции (кластер 1) и фибробластов (кластер 4). Таким образом, двукратное действие норадреналина с интервалом в 6 часов привело через 12 часов к повышению числа клеток в инициаторной субпопуляции и получающихся из нее дифференцированных клеток – фибробластов и контрактильных.

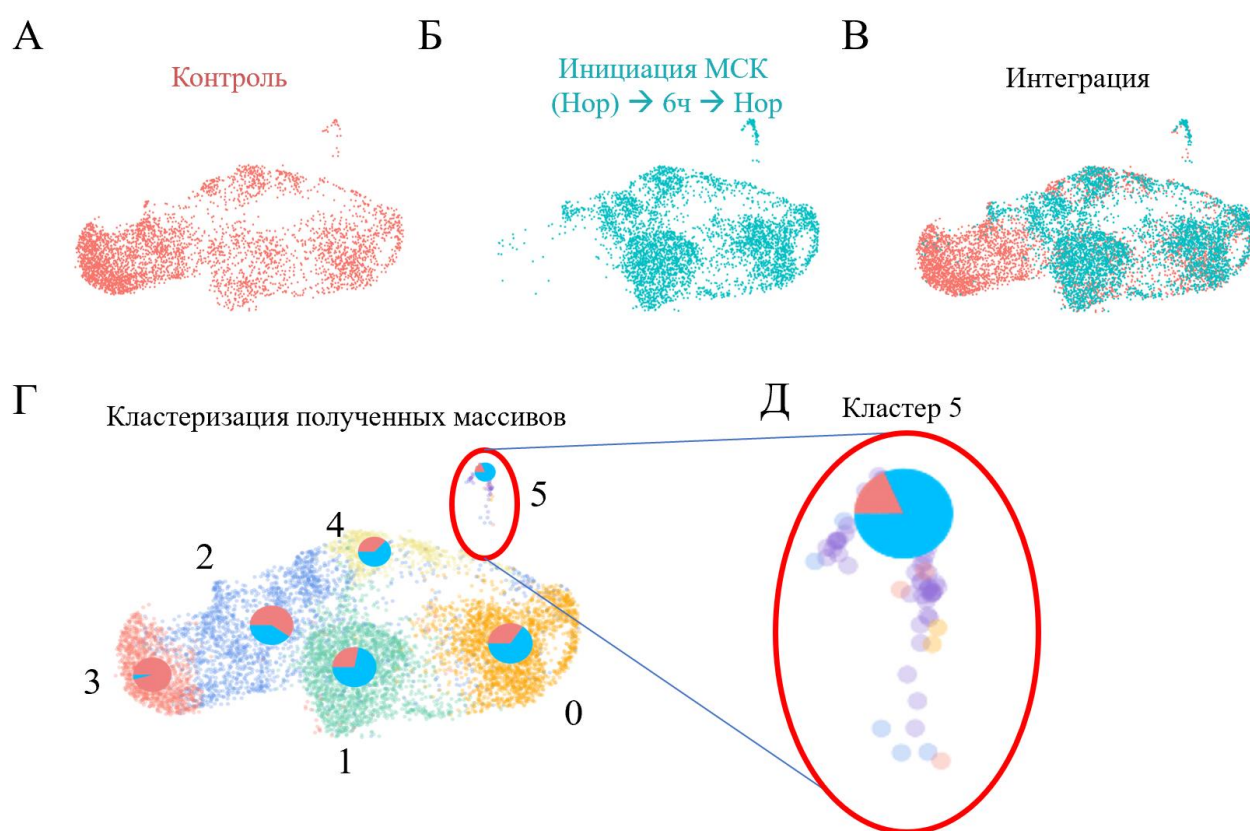


Рис. 3.37. scRNAseq анализ МСК жировой ткани в контрольных условиях (А, Контроль) и после двукратного воздействия норадреналина (Б, Инициация), при котором первое воздействие служило для инициации клеток, а при второй добавке норадреналина происходила стимуляция вышедших на поверхность клеток $\alpha 1A$ -адренорецепторов. В. – Интеграция массивов Контроль и Инициация. Г. – Кластеризация полученного массива. Д. – увеличенное изображение кластера 5, который проявил наибольшее повышение после обработки клеток двойным воздействием норадреналина.

Чтобы установить, какой тип контрактильных клеток образовался после воздействия на $\alpha 1A$ -адренорецепторы после инициации МСК мы проинтегрировали наш контрольный образец и образец после двукратной обработки норадреналином с референсным образцом стромально-васкулярной фракции жировой ткани (образец SRR12423012, находится в свободном доступе, первоначально использован в статье [226]). В этом массиве данных, полученном при непосредственном scRNAseq анализе клеток жировой ткани без их культивирования, охарактеризованы подтипы сосудистых клеток, а также клеток стромы жировой ткани. Как видно на Рис. 3.38, контрактильные клетки кластера 5 полностью соответствовали ГМК жировой ткани *in vivo*.

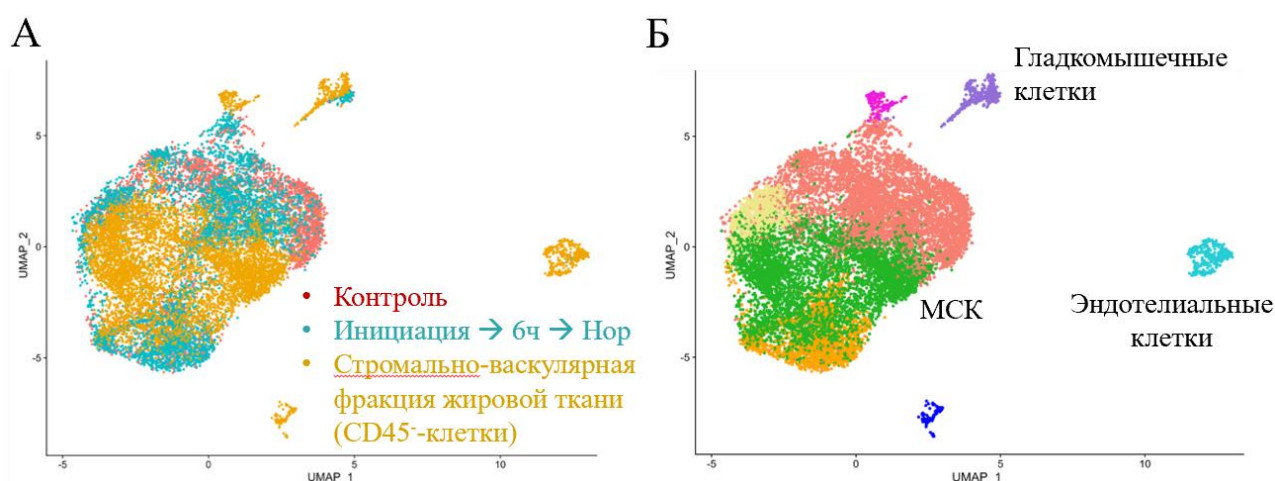


Рис. 3.38. Интеграция полученных нами данных с охарактеризованным массивом стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека (CD45⁻клетки). А. Визуализация интегрированных массивов. Б. Кластеризация интегрированного массива с обозначением ключевых типов клеток.

Биоинформатические подходы, используемые для обработки данных scRNAseq, позволяют предсказывать направления изменения фенотипа единичных клеток по тому, какие гены в этих клетках повышают свою экспрессию, а какие снижают. Эти выводы делаются из измерения количества несплайсированных мРНК определенных генов. Чем больше доля несплайсированных форм конкретной мРНК, тем более активным считается

этот ген. В случае же отсутствия несплайсированных форм делается предположение, что ген неактивен, а регистрируемые мРНК – следствие его прошлой работы. Среди методов, оценивающих транскрипционную динамику мРНК, наиболее широко используются *Velocyto* и *scVelo*. При помощи этих подходов мы показали, что после инициации МСК с последующим воздействием на них норадреналина во всей популяции МСК происходило повышение экспрессии генов, ассоциированных с сократительным фенотипом, а не только в кластере 5 (Рис. 3.39). Например, тенденция к увеличению уровня экспрессии генов белков, вовлеченных в сократимость клеток и в дифференцировку в гладкомышечные клетки, таких как *ACTA2*, *MYOCD*, *TAGLN*, *MYLK*, *CNN1*, *MYL9*, наблюдалась не только в кластере сократительных клеток (кластер 5), но и в других клетках популяции. Кроме того, во многих клетках популяции МСК повышался уровень несплайсированной формы гена *LTPP1*, который является регулятором TGFβ. Последний ассоциирован с развитием артериальной гипертензии [227]. Стоит отметить, что данные RNA Velocity – это не повышенный уровень мРНК описанных генов. Этот параметр показывает появление несплайсированной РНК, которая может превратиться, а может и не превратиться в зрелую. Кроме того, абсолютное значение мРНК в зеленых клетках может быть низким, но клетки будут зелеными, если относительно этого уровня будет большая доля несплайсированной РНК.

Кластеризация полученных массивов

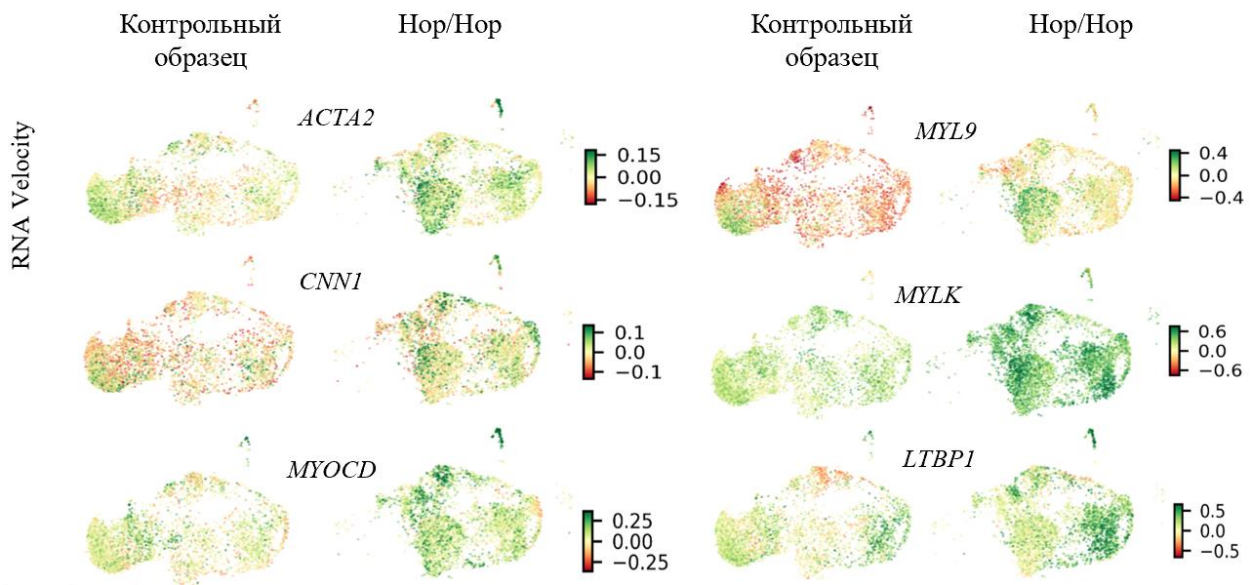
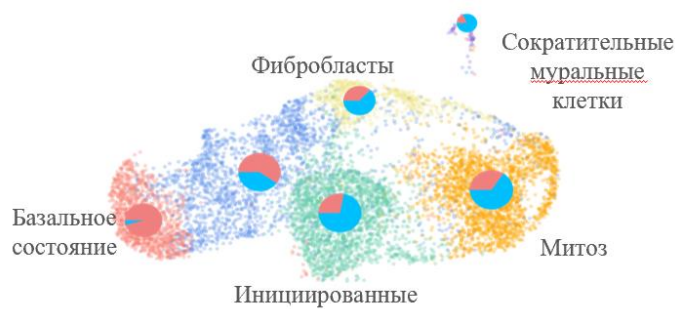


Рис. 3.39. Оценка тенденций изменения фенотипа МСК, двукратно обработанных норадреналином (Нор) при помощи расчета RNA velocity.

Кроме того, мы воспользовались биоинформатическими подходами, позволяющими посредством регулонов оценивать непосредственно активность транскрипционных факторов. Регулон – это активный транскрипционный фактор вместе с его генами-мишенями, составляющими уникальный паттерн уровня экспрессии этих генов. При помощи алгоритма SCENIC мы оценили изменение активности ассоциированных с контрактильным фенотипом транскрипционных факторов. В экспериментальном образце повысилась активность транскрипционных факторов мастер-регуляторов контрактильных клеток и миогенной дифференцировки *MEF2A* (в 2,16 раз), *NFATC3* (в 1,51 раз)

и TEAD1 (в 1,78 раз). Эти транскрипционные факторы регулируют переход малодифференцированных клеток в сократительный фенотип и ГМК [228].

Таким образом, в результате воздействия норадреналина на инициированные МСК популяция этих клеток в основном изменяла свой фенотип на более контрактильный, а небольшая группа клеток дифференцировалась в клетки, подобные гладкомышечным.

3.5.3. Проверка дифференцировки МСК в контрактильные клетки функциональными тестами

Для проверки изменения фенотипических характеристик МСК после стимуляции норадреналином инициированных клеток, которое, согласно данным scRNAseq, направляет клетки в контрактильный фенотип, мы произвели окраску клеток на α -гладкомышечный актин антителами и общий актин фаллоидином. Как видно на [Рис. 3.40](#), после индукции инициации клеток и повторной обработки норадреналином клетки приобретали более выраженный контрактильный фенотип: у них проявлялись более выраженные стресс-фибриллы, а также в культуре появлялись клетки, экспрессирующие α -гладкомышечный актин. Эти клетки могут относиться к субпопуляции контрактильных клеток, выявляемых при помощи scRNAseq. Таким образом, иммунофлуоресцентный анализ подтвердил повышение выраженности контрактильности МСК на уровне фенотипа.

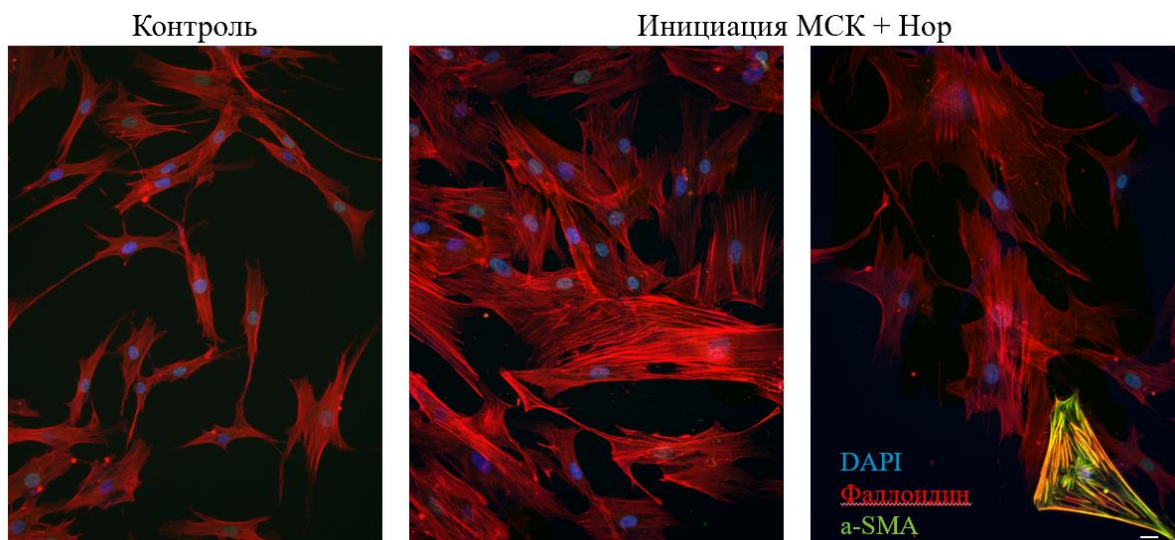


Рис. 3.40. Окраска МСК на общий актин фаллоидином и на α -гладкомышечный актин (α -SMA) специфическими антителами. Контроль – контрольные клетки, Инициация МСК+Нор – клетки, преинкубированные с $1 \mu\text{M}$ норадреналина (1 час), затем инкубированные в полной среде роста дополнительно 5 часов и повторно простимулированные $1 \mu\text{M}$ норадреналина в течение 1 часа. Окраска проводилась через 1 сутки после второй обработки клеток. Масштаб $10 \mu\text{M}$.

Далее мы проверили, как норадреналин влиял на контрактильность МСК на функциональном уровне. Для этого мы провели тест контракции МСК-коллагеновых дисков. Для этого теста МСК помещались в трехмерное окружение коллагенового матрикса, после чего полученный МСК-коллагеновый диск отрывался от подложки. МСК начинали контрактировать его, и по скорости сокращения диска можно было делать выводы о контрактильных способностях клеток. Мы произвели этот эксперимент по следующей схеме: подготавливали открепленные от подложки МСК-коллагеновые диски, после чего обрабатывали их комбинацией стимулов для инициации МСК с последующим повторным воздействием норадреналина (двукратное воздействие норадреналина в течение 1 часа с интервалом в 6 часов и тщательной отмывкой между добавками). В качестве контролей использовали следующие обработки: 1. только инициация МСК, 2. однократное воздействие норадреналина на неинициированные клетки, 3. все те же манипуляции с МСК-

коллагеновыми дисками, что и в опыте, но в растворах не было норадреналина. Далее мы проводили фотографирование дисков в разные моменты времени после обработки гормонами. Как видно на [Рис. 3.41](#), МСК-коллагеновые диски после инициации клеток с последующим воздействием норадреналина на сенситизированные $\alpha 1A$ -адренорецепторы контрактировали значительно быстрее, чем во всех остальных вариантах обработки клеток. При этом мы не наблюдали быстрого эффекта, значимая разница проявлялась через 24 часа после воздействия гормонов на клетки, что согласуется с предыдущими наблюдениями об изменении фенотипа МСК в контрактильные клетки и дифференцировке части из них в ГМК-подобные клетки. Таким образом, мы подтвердили на функциональном уровне переход МСК в контрактильный фенотип при двукратной обработке МСК норадреналином в особой комбинации, соответствующей инициации клеток с последующей стимуляцией вышедших на поверхность рецепторов.

Можно заключить, что описанный нами механизм сенситизации МСК при действии на клетки норадреналина лежал в основе дифференцировки субпопуляции этих мультипотентных клеток в гладкомышечные и приводил к общему росту контрактильных свойств популяции клеток. При этом для прохождения МСК в направлении дифференцировки гладкомышечных клеток недостаточно однократного воздействия норадреналина и прохождения непосредственно сенситизации. Была необходима стимуляция вышедших на поверхность клеток $\alpha 1A$ -адренорецепторов.

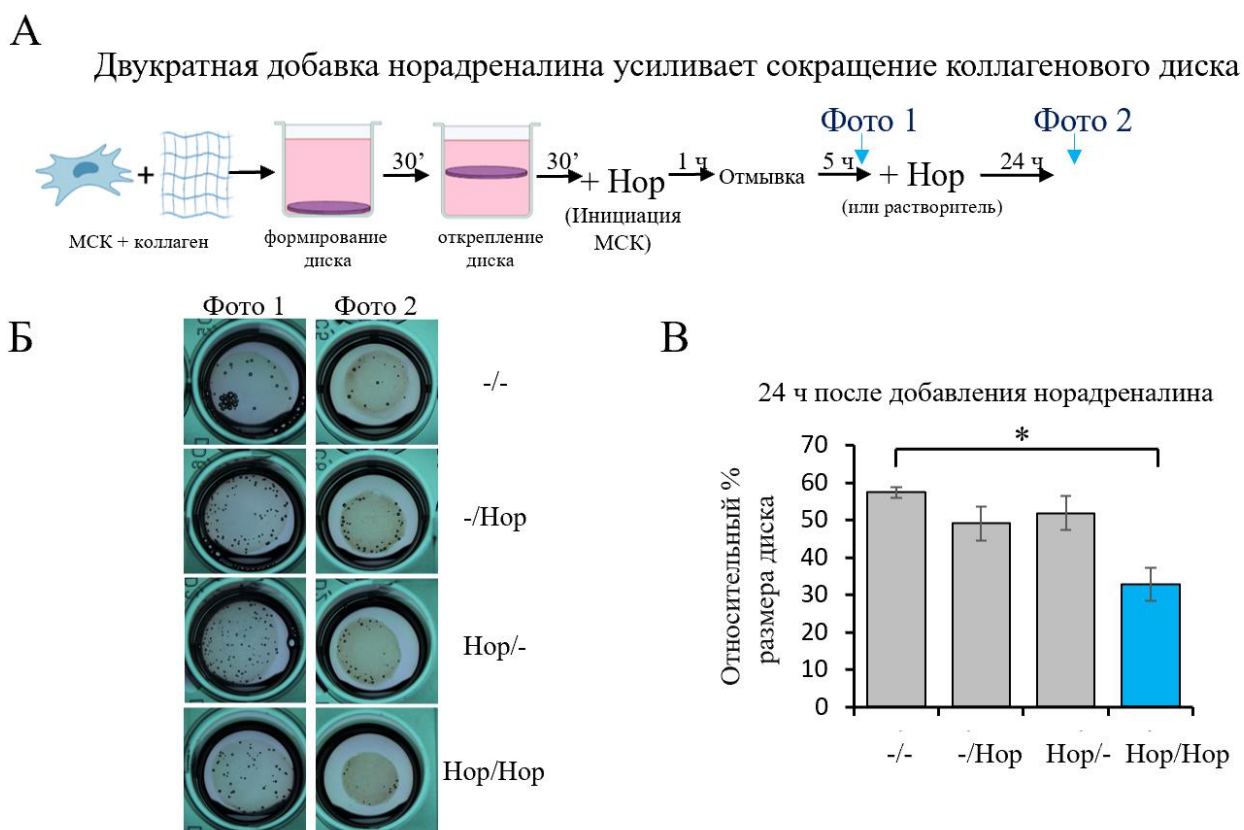


Рис. 3.41. Проверка изменения контрактильности МСК на функциональном уровне при помощи теста на контракцию МСК-коллагеновых дисков. А. – Общая схема теста на контракцию МСК-коллагеновых дисков. Б. – Схема эксперимента, проведенного нами. После заключения МСК в трехмерный коллагеновый матрикс и открепления диска от подложки клетки обрабатывались норадреналином в течение 1 часа для инициации, затем отмывались и инкубировались дополнительно в течение 5 часов, после чего повторно обрабатывались норадреналином. Съемку дисков проводили в разные временные точки после обработки гормонами. Значения = среднее +/- стандартная ошибка, 3 донора, n = 4-6, * p < 0,05.

3.5.4. Выбор модели для изучения регуляции контрактильных свойств МСК под действием норадреналина *in vivo*

Для проверки обнаруженных нами сигнальных и функциональных феноменов *in vivo*, мы выбрали физиологическую модель, в которой происходит повышение контрактильности сосудов жировой ткани в результате усиленного воздействия СНС (см. Рис. 3.42). Это жировая ткань пациентов, страдающих ожирением. При ожирении происходит стабильное повышение

активности СНС (гиперактивация СНС) в связи с целым рядом факторов, среди которых повышенное содержание адипокина лептина в крови. Лептин повышает активность СНС за счет стимуляции рецепторов нейронов гипоталамуса [229]. В условиях нормального веса тела увеличение секреции лептина жировой тканью приводит к активации термогенеза и снижению потребления пищи, а также повышению активности СНС. При ожирении же продукция лептина существенно и конститутивно возрастает (гиперлептинемия), что сопровождается развитием лептиновой резистентности ряда тканей. При этом такие клеточные эффекты как термогенез и контроль над потреблением калорий становятся лептин-независимыми, а влияние на активность СНС сохраняется [229, 230]. Вызванная ожирением избыточная активация СНС ведет к повышенной стимуляции катехоламинами $\alpha 1A$ -адренорецепторов на поверхности клеток сосудов ткани, что приводит к усилению вазоконстрикции и развитию артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Вазоконстрикция может усиливаться, во-первых, вследствие быстрой контрактильной реакции сосудистых клеток, во-вторых, из-за изменения фенотипа (дифференцировки) сосудистых МСК в контрактильные клетки. К последним относятся гладкомышечные клетки и перициты. В-третьих, из-за ремоделирования внеклеточного матрикса, окружающего кровеносный сосуд. Таким образом, жировая ткань пациентов, страдающих ожирением, является удобным модельным объектом для изучения механизмов изменения фенотипа периваскулярных МСК в контрактильный фенотип.

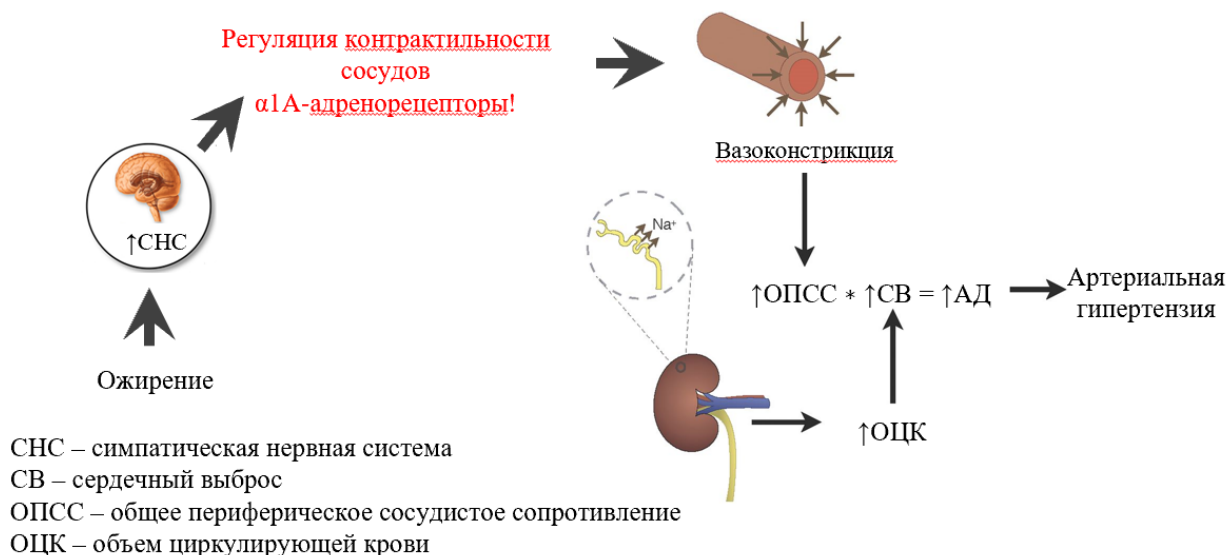


Рис. 3.42. Физиологическая модель развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Ожирение практически во всех случаях ведет к повышению активности СНС. Норадреналин из симпатических нервных волокон действует на α1A-адренорецепторы на сосудах жировой ткани, что приводит к их констрикции. В совокупности с ремоделированием матрикса и дифференцировкой МСК в ГМК, повышается общее сосудистое периферическое сопротивление (ОПСС). Повышение ОПСС приводит к развитию артериальной гипертензии.

В вышеописанном механизме имеется ряд клинических наблюдений, которые делают эту модель еще более интересной для нашей работы. При стабильном повышенном воздействии катехоламинов на МСК жировой ткани, вызванном ожирением, повышение контрактильности сосудов происходит не у всех пациентов. У ряда пациентов, страдающих ожирением, артериальное давление сохраняется на уровне здоровых пациентов. При этом, показано, что гиперактивация СНС у них развивается [231]. Можно предположить, что катехоламины в жировой ткани таких пациентов либо не действуют на периваскулярные клетки из-за отсутствия на них α1A-адренорецепторов, либо МСК не направляются в дифференцировку в контрактильные клетки.

3.5.5. Иммунофлуоресцентный анализ распределения $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани

Мы выяснили, существовала ли разница в распределении $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов в сосудах жировой ткани пациентов двух экспериментальных групп: 1. пациентов с ожирением, сопровождающимся развитием артериальной гипертензии, и 2. пациентов с ожирением, но не сопровождающимся развитием артериальной гипертензии (характеристика пациентов приведена в Табл. 4). 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 [232, 233]. Для этого мы провели иммунофлуоресцентный анализ срезов жировой ткани. Как видно на Рис. 3.43, $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессировались на клетках сосудов у всех исследованных пациентов (другие изображения и целые сканированные срезы см. Приложение 6; экспрессия других изоформ $\alpha 1$ -адренорецепторов см Приложение 7; IgG контроль – см. Приложение 8). Как и у пациентов с нормальной массой тела, у нормотензивных пациентов с ожирением $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессировались исключительно в перицитах/МСК, но не ГМК. В сосудах жировой ткани пациентов с ожирением и гипертензией представленность клеток с $\alpha 1A$ -адренорецепторами оказалась существенно более высокой, если судить по удельному количеству клеток сосуда, экспрессирующих этот рецептор (Рис. 3.43, 3). Кроме того, сосуды этих пациентов содержали $\alpha 1A$ -адренорецепторы не только в перицитах, но и на некоторых αSMA -экспрессирующих клетках, ГМК (см Рис. 3.43, Д, Ж). Этот результат указывает на потенциальную возможность второго из вышеупомянутых механизмов развития или не развития гипертензии у пациентов с ожирением. Можно предположить, что ГМК, экспрессирующие $\alpha 1A$ -адренорецепторы, появлялись в результате дифференцировки перицитов/МСК при развитии ожирения или же

они существовали в сосудах исходно, являясь фактором риска развития артериальной гипертензии при ожирении.

Можно предположить, что при развитии артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, происходила инициация МСК вследствие повышенной активности СНС (Рис. 3.44). Как следствие, на поверхность перицитов/МСК выходило дополнительное количество $\alpha 1A$ -адренорецепторов, что мы и видели на иммунофлуоресцентном окрашивании срезов жировой ткани. Кроме того, появление ГМК, положительных по экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов, можно связать с дифференцировкой МСК в ГМК, которую мы выявили при помощи scRNAseq.

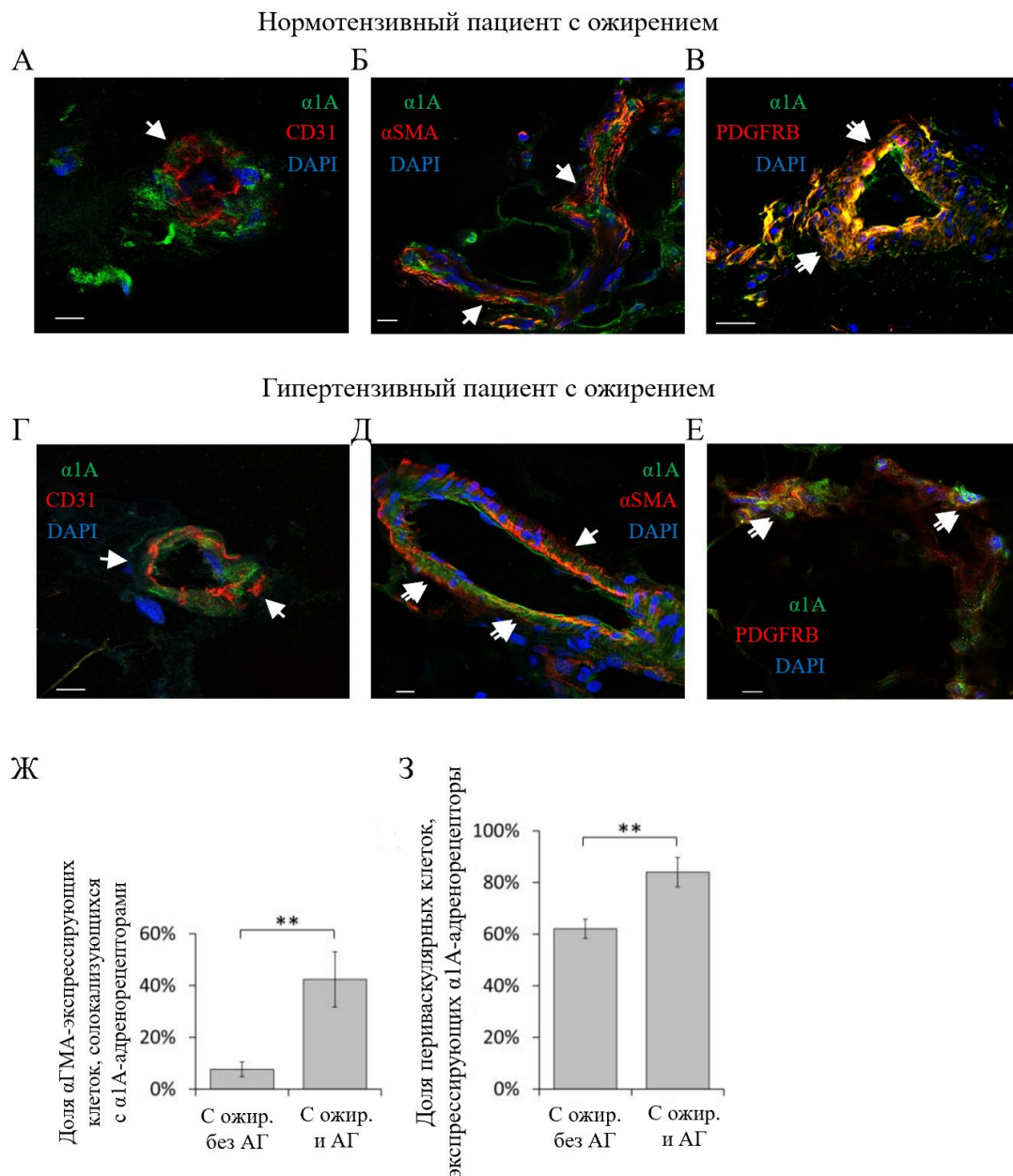


Рис. 3.43. Иммунофлуоресцентный анализ $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих или не страдающих артериальной гипертензией. Окраска $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов (зеленый) в жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии (А-В) и с артериальной гипертензией (Г-Е), красным цветом показана окраска маркеров клеточных компонентов сосудов эндотелиальных клеток (А и Г), маркер - CD31; с ГМК (Б и Д), маркер - α SMA; и с МСК (В и Е), маркер - PDGFR β . Иммунофлуоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия. Масштаб 10 μ M. Ж-З. Оценка уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в клетках сосудов жировой ткани пациентов с ожирением, сопровождающимся артериальной гипертензией (С

ожир. и АГ) и без нее (С ожир. без АГ). Проанализировано 8-17 микрофотографий сосудов от 3 пациентов в каждой группе, ** p < 0,01.

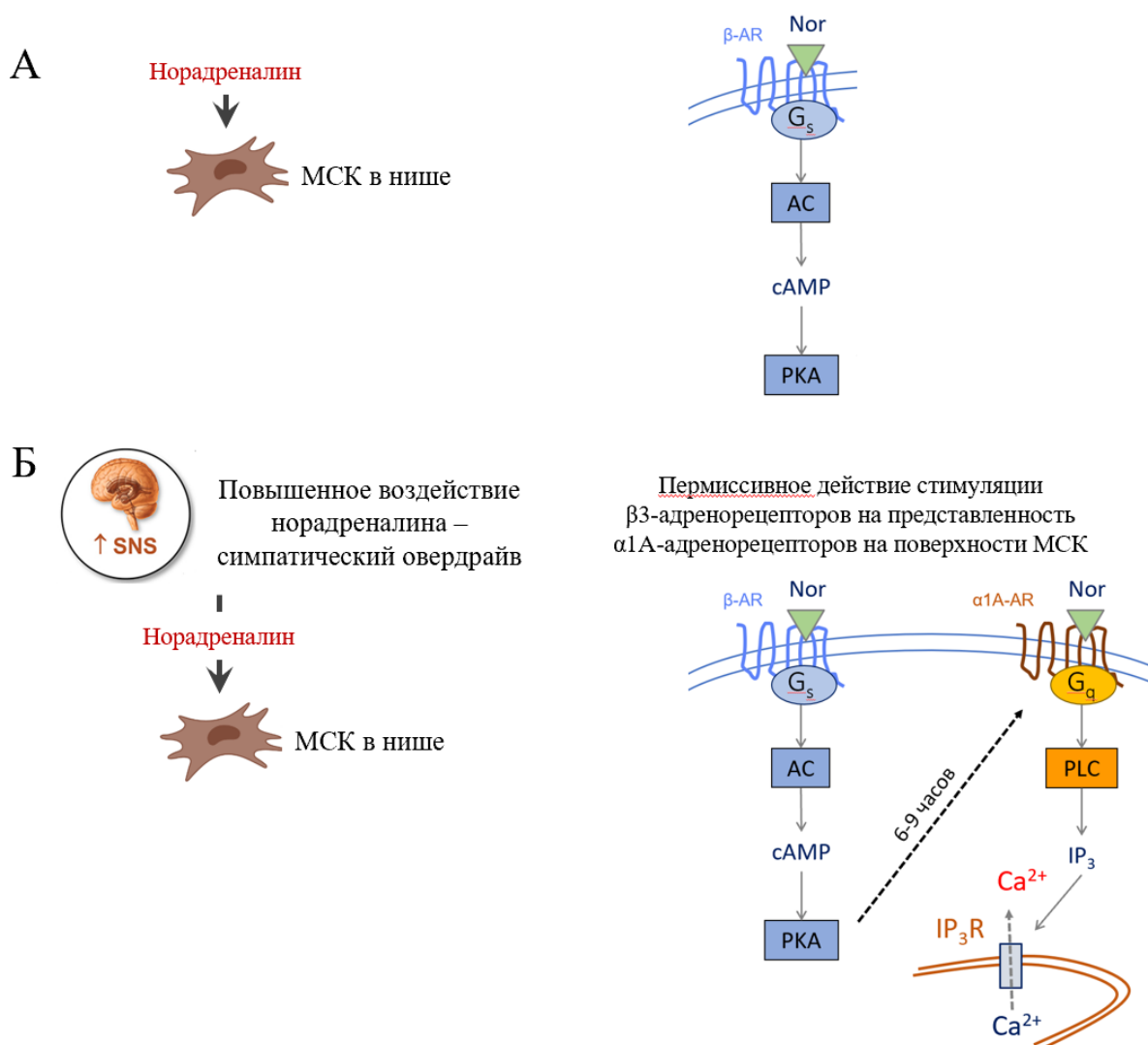


Рис. 3.44. Общая схема предположительного механизма развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением и ее связь с пермиссивным эффектом инициации МСК на представленность α 1A-адренорецепторов. А. – Кратковременное действие норадреналина приводило к активации β -адренорецепторов и цАМФ-зависимой сигнализации в ткани. Б. – при возникновении избыточной адренергической стимуляции сосудов происходила инициация МСК, что приводило к выходу на поверхность клеток α 1A-адренорецепторов. Как следствие, контрактильные свойства сосудов значительно возрастали. При продолжительном избыточном воздействии СНС на сосуды это могло приводить к развитию артериальной гипертензии.

3.5.6. Способность МСК пациентов, страдающих ожирением, к сенситизации в ответ на моделирование избыточной активации СНС, коррелирует с развитием артериальной гипертензии

Мы проверили гипотезу о связи механизма инициации МСК, ассоциированной с выходом на поверхность клеток повышенного количества $\alpha 1A$ -адренорецепторов и повышением чувствительности клеток к норадреналину, с одной стороны, и развитием артериальной гипертензии. Мы выделили МСК из пациентов двух вышеописанных групп: 1. пациентов с ожирением, сопровождающемся развитием артериальной гипертензии, и 2. пациентов с ожирением, но не сопровождающемся развитием артериальной гипертензии (характеристика пациентов приведена в [Таблице 4](#)). МСК выделили из жировой ткани 5 пациентов для каждой группы, не отличающихся существенно по возрасту и ИМТ. На выделенных МСК мы определили способность к повышению числа отвечающих на норадреналин клеток в результате моделирования избыточной активации СНС (предварительной обработки клеток норадреналином в течение 1 часа). Как видно на [Рис. 3.45](#) и в [Таблице 4](#), способность к сенситизации проявлялась только в МСК пациентов, страдающих артериальной гипертензией на фоне ожирения. МСК нормотензивных пациентов не изменяли свою чувствительность к норадреналину после предварительного воздействия на них этого гормона. Кроме того, уровень артериального давления пациентов с ожирением достоверно коррелировал с величиной относительной сенситизации клеток (этот параметр определяли как отношение числа отвечающих на норадреналин клеток после их предварительной обработки норадреналином к контрольной группе клеток, [Рис. 3.45, А-В](#)). Таким образом, возможность развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, коррелировала со способностью МСК сенситизироваться в ответ на действие норадреналина.

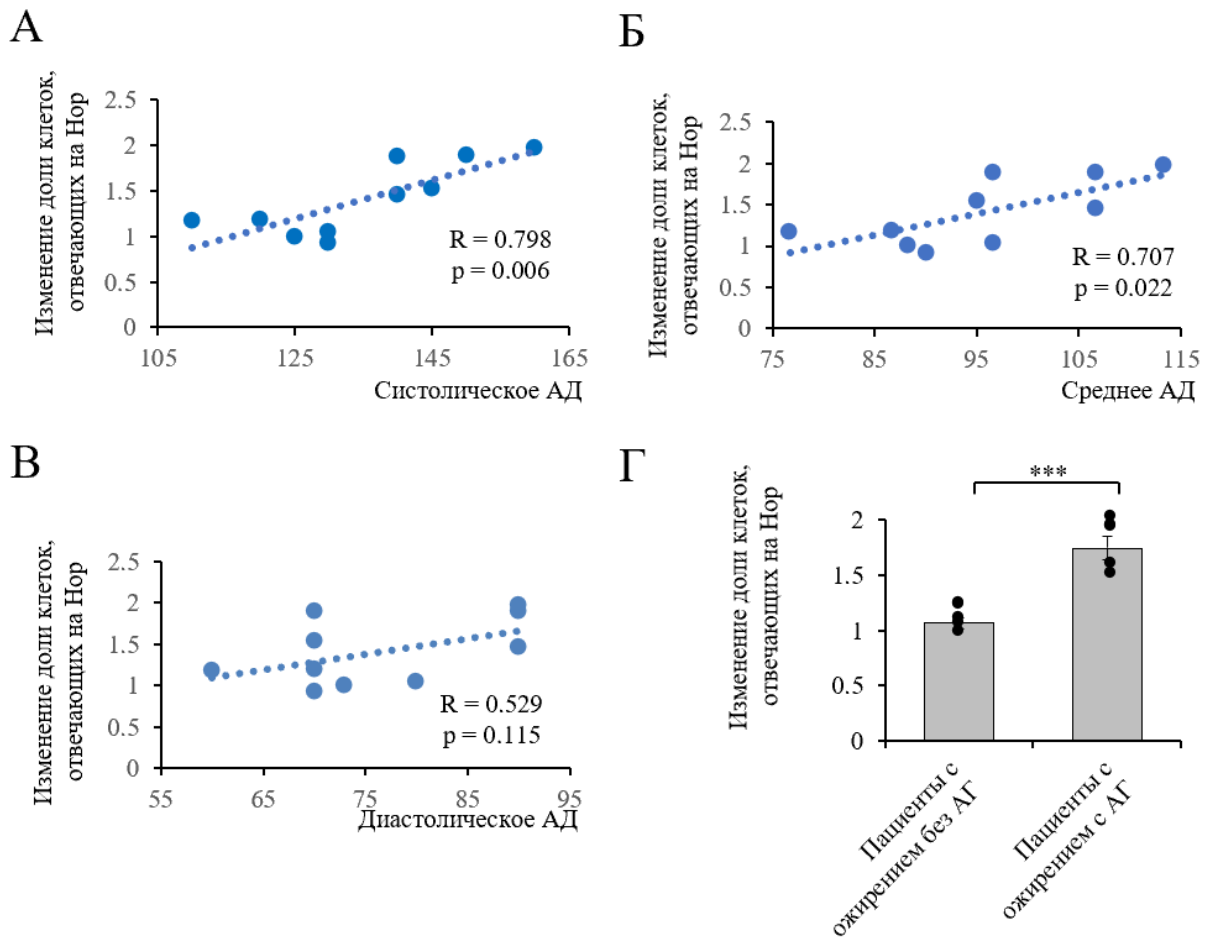


Рис. 3.45. Степень сенситизации МСК к норадреналину у пациентов с ожирением с/без артериальной гипертензией. А-В. – Уровень изменения доли клеток, отвечающих на норадреналин, коррелировал с уровнем систолического и среднего артериального давления (АД). R – коэффициент корреляции, рассчитанный по методу Пирсона; p – уровень значимости корреляции. Г. – МСК жировой ткани, выделенные у пациентов с ожирением и артериальной гипертензией, проявляли повышение доли клеток, чувствительных к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (воздействие норадреналина 1 μ M в течение 1 часа). Данные представлены как среднее \pm ст.ош. Уровень статистической значимости: *** p < 0,001.

Таблица 4. Параметры пациентов, страдающих ожирением, у которых была проанализирована способность к развитию сенситизации клеток в ответ на действие норадреналина. АГ – Артериальная гипертензия, ИМТ = масса(кг)/рост(м)². Способность к сенситизации – изменение доли клеток, отвечающих на норадреналин после моделирования симпатического овердрайва, относительно соответствующего контроля.

Пациент	Возраст	ИМТ	Пол	АГ	Способность к сенситизации
1	50	33,0	М	–	1,04
2	45	34,3	М	–	1,18
3	38	30,2	М	–	0,92
4	39	33,0	М	–	1.12
5	28	33,0	М	–	1.03
Среднее	40	32,7			
6	38	30,0	М	+	1,53
7	56	31,6	М	+	1,89
8	62	33,0	М	+	1,88
9	51	31,5	М	+	2,25
10	47	35,3	Ж	+	1,46
Среднее	50,8	32,3			

3.5.7. Обсуждение. Общая схема развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением

Общая схема развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, исходя из полученных нами результатов, выглядит следующим образом. Ожирение приводит к повышенной продукции лептина с параллельным развитием лептиновой резистентности [234]. Лептин, в свою очередь, повышает активность СНС, которая стимулирует адренергические

рецепторы в тканях, в том числе и в жировой. Поскольку при ожирении жировая ткань составляет очень существенную часть организма, составляя 30-45% от всей массы тела [235, 236], ее кровеносные сосуды вносят ключевой вклад в общее периферическое сосудистое сопротивление. Норадреналин, интенсивно выделяемый гиперактивированной СНС (состояние симпатического овердрайва), действует на β_3 -адренорецепторы на МСК/перичитах сосудов, вызывая их переход в иницированное состояние. При этом на поверхности МСК в несколько раз повышается представленность α_1A -адренорецепторов. Последние являются основными вазоконстрикторными адренорецепторами для сосудов жировой ткани. Продолжение повышенной активности СНС приводит к стимуляции α_1A -адренорецепторов на сосудах, контракции сосудов, а также к частичной дифференцировке МСК в ГМК, что еще значительно усиливает контрактильный ответ сосудов. Как итог, развивается артериальная гипертензия, ассоциированная с ожирением.

Полученные данные указывают на то, что активация β_3 -адренорецепторов является основным триггером повышения уровня α_1A -адренорецепторов в МСК, что согласуется с первичной ролью β_3 -адренорецепторов в симпатической регуляции активности МСК, наблюдаемой в костном мозге [83]. Кроме того, существуют данные, что ряд полиморфизмов β_3 -адренорецепторов ассоциирован с возникновением и поддержанием артериальной гипертензии [237]. Поскольку β_3 -адренорецепторы являются широкоиспользуемой терапевтической мишенью [238, 239], при воздействиях на него следует учитывать потенциальное влияние его антагонистов на артериальную гипертензию, связанную с ожирением.

В случае пациентов с ожирением, которое не сопровождается развитием артериальной гипертензии, можно было бы предположить, что нарушен процесс инициации МСК. В ответ на избыточное воздействие СНС у них не происходит повышение чувствительности МСК к норадреналину. Однако сосуды таких пациентов нормально работают и имеют классический клеточный

состав, что означает, что МСК у таких пациентов производят обновление клеток жировой ткани и ее сосудов. В объяснение отсутствия феномена сенситизации клеток в ответ на норадреналин можно предположить пониженную чувствительность клеток к иницирующему стимулу. В таком случае для инициации клеток требуются более высокие уровни стимуляции β -адренорецепторов, чем мы использовали в данной работе. В качестве другого возможного объяснения можно предположить, что в таких клетках не норадреналин, но другие гормоны-регуляторы переводят МСК в иницированное состояние. При этом не происходит сенситизация именно $\alpha 1A$ -адренорецепторов, но функциональная активность клеток изменяется другим образом. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

Рассматривая стимуляцию $\beta 3$ -адренорецепторов как перmissive сигнал для МСК, который служит для их перевода в иницированное состояние, можно заключить, что стимуляция $\alpha 1A$ -адренорецепторов и активируемой ими кальциевой сигнализации является инструктивным сигналом для направления МСК в контрактильный фенотип (Рис. 3.46). При этом действие на сами $\alpha 1A$ -адренорецепторы без предварительной инициации клеток не вызывает подобных эффектов, как мы показали на модели контракции МСК-коллагеновых дисков.

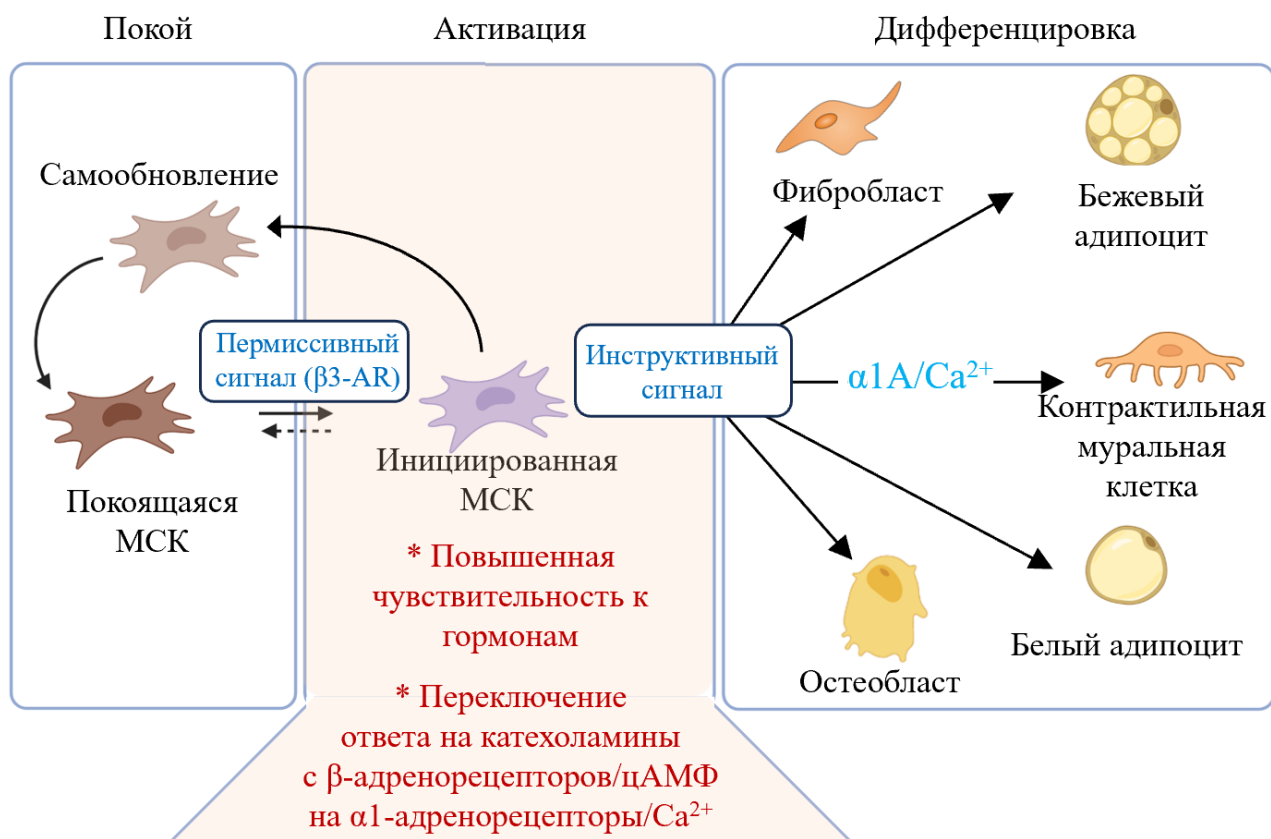


Рис. 3.46. Схема, обобщающая промежуточные итоги выяснения механизмов ранних этапов коммитирования МСК при выборе направления дифференцировки. β3-адренорецепторы служат как перmissive сигнал для МСК, который переводит их в инициированное состояние. Стимуляция α1A-адренорецепторов и активируемой ими кальциевой сигнализации является инструктивным сигналом для направления МСК в контрактильный фенотип.

3.6. Инструктивные сигналы для выбора направления адипогенной дифференцировки МСК

3.6.1. Влияние катехоламинов на адипогенную дифференцировку МСК

Следующим этапом нашей работы был поиск инструктивных сигналов, определяющих направление МСК в адипогенную дифференцировку. Для выяснения того, участвует ли механизм сенситизации МСК к катехоламинам в регуляции адипогенеза, мы индуцировали это направление дифференцировки добавлением коктейля факторов инсулин, дексаметазон и IBMX после обработки клеток норадреналином по схеме двукратной обработки с интервалом 6 часов. Как видно на [Рис. 3.47, А](#), в процессе адипогенной дифференцировки МСК накапливали жировые капли, эффективность дифференцировки достаточно высокая – порядка 80% клеток подверглось адипогенной дифференцировке. Еще один важный момент – накапливающиеся жировые капли возможно наблюдать под микроскопом без специальной окраски клеток, что мы далее использовали для наблюдения за адипогенной дифференцировкой в режиме реального времени. Норадреналин подавлял адипогенную дифференцировку. Схожим образом действовал и специфический агонист β 1- и β 2-адренорецепторов добутамин [240, 241], для которого также показана потенциальная возможность активации β 3-адренорецепторов [242]. Ингибитор ключевого сигнального каскада β -адренорецепторов, ингибитор аденилатциклаз SQ22536 полностью нивелировал эффект норадреналина, что подтвердило роль β -адренорецептор/цАМФ-зависимого сигнального каскада в подавлении адипогенеза. Эти данные полностью согласуются с литературными по участию норадреналина в подавлении адипогенеза и липогенеза и активации липолиза [212]. Агонист α 1-адренорецепторов (фенилэфрин) не проявлял никакого эффекта на адипогенез.

Двукратная стимуляция МСК норадреналином в модели инициация-стимуляция сенситизированных клеток не показала существенного изменения

эффекта однократного воздействия норадреналина [Рис. 3.47, Б-В](#). Для дополнительного контроля того, что наблюдаемые в цитоплазме дифференцирующихся клеток капли – это действительно триглицериды (нейтральные липиды), мы воспользовались красителем, специфичным к нейтральным липидам – OilRed O. Жировые капли при этом окрашивались в красный цвет ([Рис. 3.47, В](#)). Мы наблюдали подавление уровня адипогенной дифференцировки, сходное с однократным воздействием норадреналина или добутамина, если судить по плотности появления клеток с жировыми каплями. Таким образом, норадреналин снижал рост количества жировых капель при адипогенной дифференцировке МСК, действуя через β -адренорецептор/цАМФ-зависимый сигнальный путь.

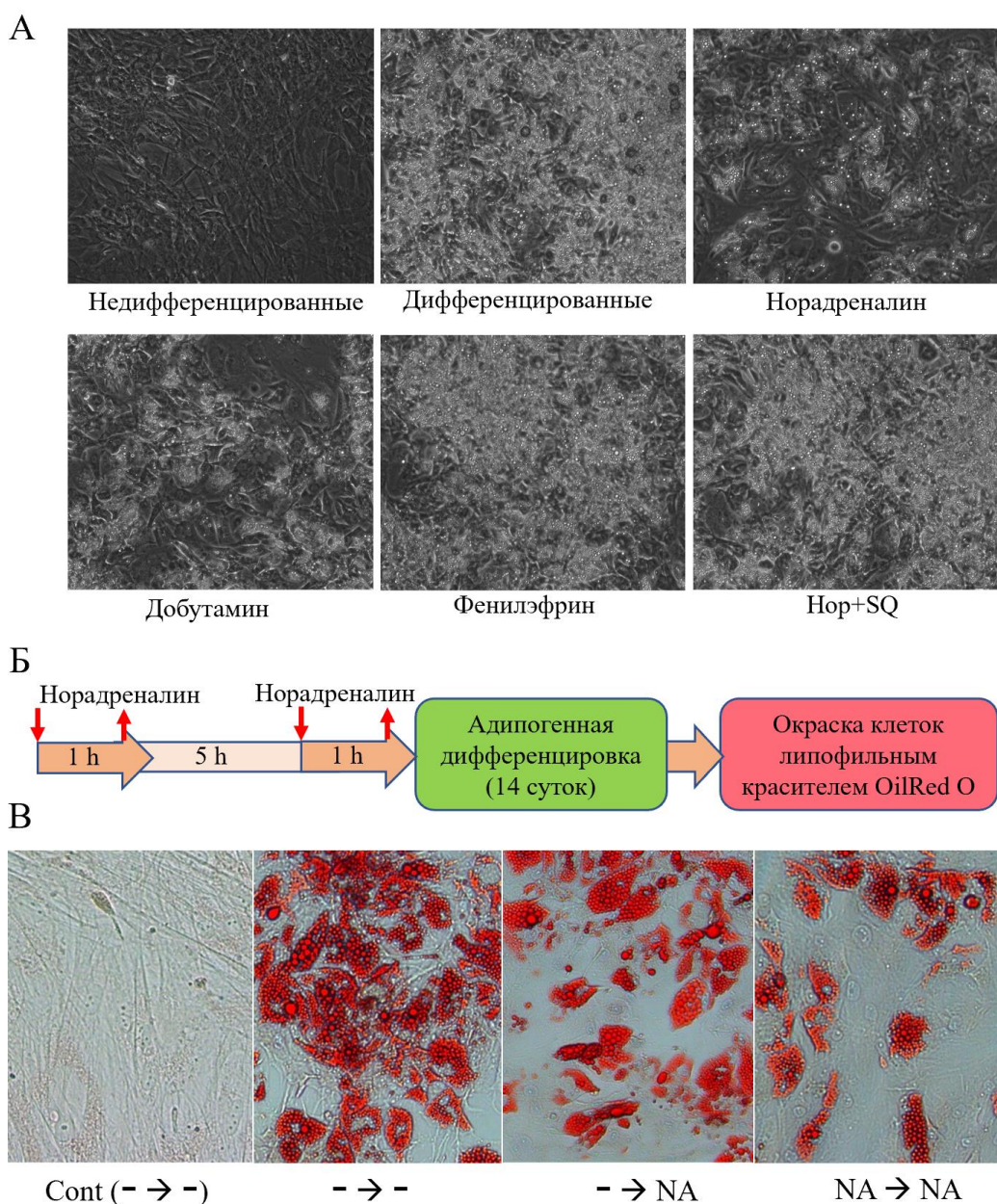


Рис. 3.47. Влияние норадреналина и агонистов адренорецепторов на адипогенную дифференцировку МСК. А. Наблюдение адипогенной дифференцировки МСК в проходящем свете микроскопа. Жировые капли хорошо видны при фазово-контрастном методе контрастирования. «Недифференцированные» – клетки находились в полной среде роста в течение 2 недель. «Дифференцированные» – МСК дифференцировались в адипогенном коктейле (инсулин, IBMX, дексаметазон, без индометацина) в течение 2 недель. Агонистами и ингибиторами клетки были обработаны перед запуском в дифференцировку в течение 1 часа (антагонисты добавлены на 30 минут раньше), после чего отмыты и запущены в адипогенную дифференцировку. Норадреналин (1 μ M), добутамин (1 μ M), фенилэфрин (100 μ M), ингибитор аденилатциклаз SQ22536 (1 μ M). Б. – Схема стимуляции клеток перед запуском адипогенной дифференцировки в пункте (В). В. – результаты адипогенной дифференцировки МСК при предварительной двукратной обработке норадреналином (1 μ M). Клетки покрашены красителем нейтральных липидов Oil Red O.

Для более точной полуколичественной оценки интенсивности адипогенной дифференцировки мы использовали ПЦР в реальном времени. Мы регистрировали появление и изменение уровня мРНК ключевых маркеров адипогенной дифференцировки: мастера-регулятора адипогенной дифференцировки PPAR γ (ген *PPARG*) и ключевого адипокина, секретируемого исключительно адипоцитами, адипонектина (ген *ADIPOQ*). В опытном образце мы обрабатывали МСК норадреналином дважды в течение 1 часа с интервалом в 5 часов между добавлениями (Рис. 3.48, А). Контрольные эксперименты были следующие: параллельная обработка растворителями гормонов (Контроль) и однократная обработка норадреналином. Далее клетки отмывали и помещали в коктейль для адипогенной дифференцировки. Коктейль меняли на свежий каждые три-четыре дня (два раза в неделю). Таким образом, норадреналин действовал на клетки только в течение короткого периода времени перед запуском дифференцировки. На первом этапе мы выяснили оптимальную временную точку регистрации уровня дифференцировки. Для этого мы останавливали дифференцировку на 1, 3 или 7 день. Как показано на Рис. 3.48, Б, уровень мРНК PPAR γ при адипогенной дифференцировке МСК повышался, но не более чем в 10 раз по сравнению с недифференцированными клетками, что согласуется с литературными данными [243]. При этом как однократная, так и двукратная предварительная стимуляция клеток норадреналином приводила к подавлению роста уровня мРНК PPAR γ . В случае мРНК адипонектина изменения оказывались гораздо значительнее. Недифференцированные МСК вообще не содержали мРНК адипонектина, на третий день она появлялась на детектируемом уровне, а уже на 7 день уровень его экспрессии более чем в сто раз превышали значения третьего дня (Рис. 3.48, В). Подавление адипогенной дифференцировки, вызываемое норадреналином, наиболее хорошо видно на 7 день дифференцировки. При этом при двукратной обработке клеток норадреналином, при которой происходила индукция сенситизации МСК с последующим воздействием на клетки норадреналина, уровень мРНК адипонектина снижался так же, как при однократной обработке

клеток норадреналином. В дальнейшем для проведения ингибиторного анализа и влияния различных изоформ адренорецепторов на уровень экспрессии маркеров адипогенеза мы лизировали клетки именно на 7 день.

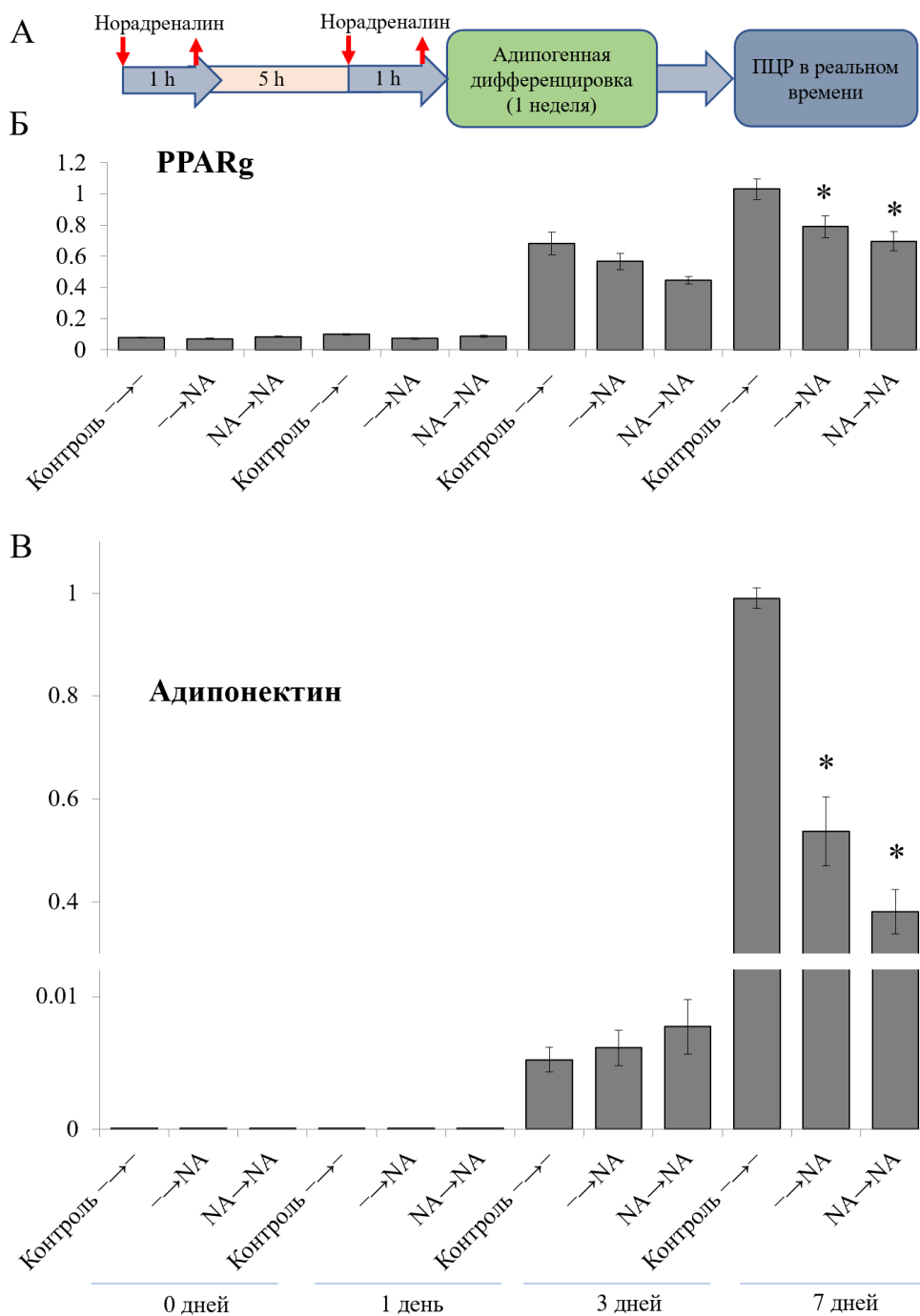


Рис. 3.48. Временная динамика адипогенной дифференцировки МСК после стимуляции норадреналином. В опытном образце мы обрабатывали МСК норадреналином дважды в течение 1 часа с интервалом в 5 часов между добавками (образец NA→NA). Контрольные эксперименты были следующие: параллельная обработка растворителями гормонов (Контроль - → -) и однократная обработка норадреналином (-- →NA). После стимуляции клетки отмывали и помещали в коктейль для адипогенной дифференцировки. А. – Схема эксперимента. Б-В. – Уровень мРНК PPARg (Б) и адипонектина (В) после однократной и двукратной обработки 1 μ M норадреналина в начале адипогенной дифференцировки (0 день), на 1, 3 и 7 дни после индукции адипогенной дифференцировки. Приведены данные 2

независимых экспериментов, среднее \pm ст.ош. Уровень статистической значимости:
* $p < 0,05$.

3.6.2. Активация β -адренорецепторов приводит к подавлению дифференцировки МСК в белые адипоциты

Как было показано выше, инициацию клеток вызывали β -адренорецепторы, а затем на поверхность клеток выходили $\alpha 1$ -адренорецепторы. Для выяснения того, как активация $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов при поочередной стимуляции в различных комбинациях повлияли на адипогенную дифференцировку МСК, мы выполнили эксперимент по последовательной стимуляции МСК норадреналином и селективными агонистами адренорецепторов в присутствии ингибиторов ключевых сигнальных путей перед запуском клеток в адипогенную дифференцировку (Рис. 3.49).

Как видно из результатов ПЦР в реальном времени, норадреналин и добутамин (агонист β -адренорецепторов) подавляли адипогенную дифференцировку МСК, тогда как активация $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином не оказывала на нее влияния. Ингибирование цАМФ-зависимого сигнального каскада ингибитором аденилатциклаз (SQ22536), так же как и ингибирование выхода кальция из внутриклеточных депо при помощи ингибитора кальциевых ИФ3 рецепторов эндоплазматического ретикулума (2APB) нивелировало подавляющий эффект норадреналина. Таким образом, норадреналин подавлял адипогенную дифференцировку МСК, действуя через β -адренорецептор/цАМФ-зависимый сигнальный путь. Инициация клеток с последующим воздействием на появившиеся $\alpha 1$ -адренорецепторы не оказывала какого-то существенно отличного от простой стимуляции β -адренорецепторов влияния на экспрессию адипонектина и PPAR γ . Влияние на экспрессию мРНК адипонектина было более выражено в связи с тем, что PPAR γ на высоком уровне экспрессируется в МСК, находящихся в базальном состоянии.

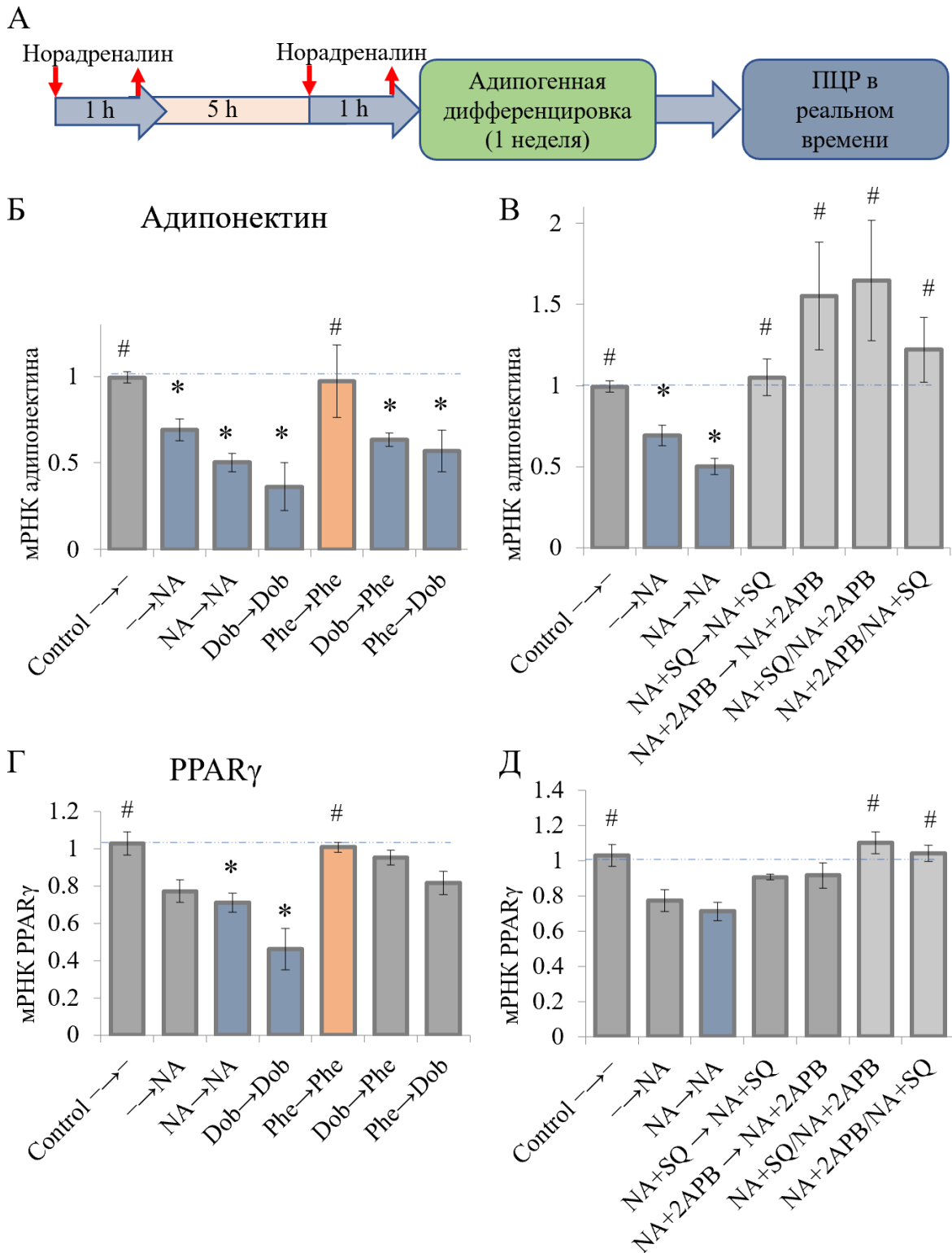


Рис. 3.49. Влияние комбинированной добавки агонистов α 1- и β -адренорецепторов, а также ингибиторов их сигнальных каскадов на адипогенную дифференцировку МСК. Клетки стимулировали агонистом α 1-адренорецепторов фенилэфрином (Phe, 100 μ M) и агонистом β -адренорецепторов добутамином (Dob, 1 μ M) с интервалом в 6 часов в различных комбинациях. В случае ингибиторного анализа клетки обрабатывали норадреналином в присутствии селективного ингибитора аденилат-циклазы SQ22536 (1 μ M), либо

норадреналином совместно с 2APB (50 μ M), ингибитором рецептора инозитол-(1,4,5)трифосфата (ИФ3-рецептора), ключевого действующего лица передачи сигнала от рецепторов, сопряженных с Gq-белком и кальциевой сигнализацией (в случае совместной с норадреналином стимуляции ингибируется сигнализация от α 1-адренорецепторов). Ингибиторы добавляли за 30 минут до стимуляции клеток норадреналином. Первая стимуляция гормонами и агонистами длилась 1 час, после чего клетки тщательно отмывали трехкратной заменой среды и помещали в полную среду роста. Через 5 часов клетки повторно стимулировали агонистами или норадреналином в присутствии ингибиторов также в течение 1 часа. Комбинации первой и второй стимуляций указаны на рисунках через стрелку под соответствующим столбиком диаграммы. * $p < 0.05$ относительно образца Control; # $p < 0.05$ относительно образца NA \rightarrow NA. Данные в виде среднего \pm СтОш.

3.6.3. Регистрация адипогенной дифференцировки МСК в режиме реального времени на уровне единичных клеток

Мы не выявили каких-то значимых изменений эффективности адипогенной дифференцировки ни при инициации МСК перед ее запуском (стимуляции β -адренорецепторов), ни при воздействии на вышедшие на поверхность клеток α 1-адренорецепторы. Тем не менее, известно, что адипоциты в белой жировой ткани представлены несколькими различными фенотипами [244]. Для детального анализа того, как инициация МСК с последующим действием норадреналина влияет непосредственно на процесс адипогенной дифференцировки МСК, а также на фенотип получающихся адипоцитов, мы произвели прямое наблюдение за процессом их дифференцировки в режиме реального времени под микроскопом. Схема эксперимента показана на [Рис. 3.50, А](#). МСК высаживали на культуральные планшеты в плотности, необходимой для прохождения адипогенной дифференцировки. При этом мы учитывали, с одной стороны, тот факт, что для адипогенной дифференцировки требуется очень плотная посадка клеток, с другой – что при плотной посадке в монослое будет сложно проследить за единичными клетками. Высаженные для дифференцировки МСК через 4 часа

после предварительной инкубации с норадреналином красили кальций-чувствительным красителем Fluo-8 (4 μ M) и непосредственно под микроскопом повторно стимулировали норадреналином (Рис. 3.50, Б-В). Индивидуальные клетки, ответившие на норадреналин кальциевой сигнализацией, указаны красными точками. Далее клетки дифференцировались в адипогенном направлении непосредственно под микроскопом в течение двух недель (Рис. 3.51, А). После окончания съемки фильма мы проследили за дифференцировочной судьбой клеток, ответивших на норадреналин кальцием. Как видно из Рис. 3.51, Б, ни одна клетка, ответившая кальцием на норадреналин, не накопила большое количество крупных жировых капель. Цитоплазма большинства клеток осталась свободной от капель. А те клетки, в которых жировые капли все же появлялись, содержали большое количество мелких жировых капель (Рис. 3.51, В). Клетки же, не отвечающие кальцием на норадреналин, хорошо дифференцировались (Рис. 3.51, Г). Таким образом, клетки, отвечающие кальциевой сигнализацией на действие норадреналина, не дифференцировались в белые адипоциты. Появление в клетках, прежде ответивших кальцием на норадреналин, мелких жировых капель могло свидетельствовать о дифференцировке этих клеток в другой тип жировых клеток белой жировой ткани – бежевые адипоциты. В следующих экспериментах мы проверили предположение о превращении МСК, отвечающих кальцием на норадреналин, в бежевые адипоциты.

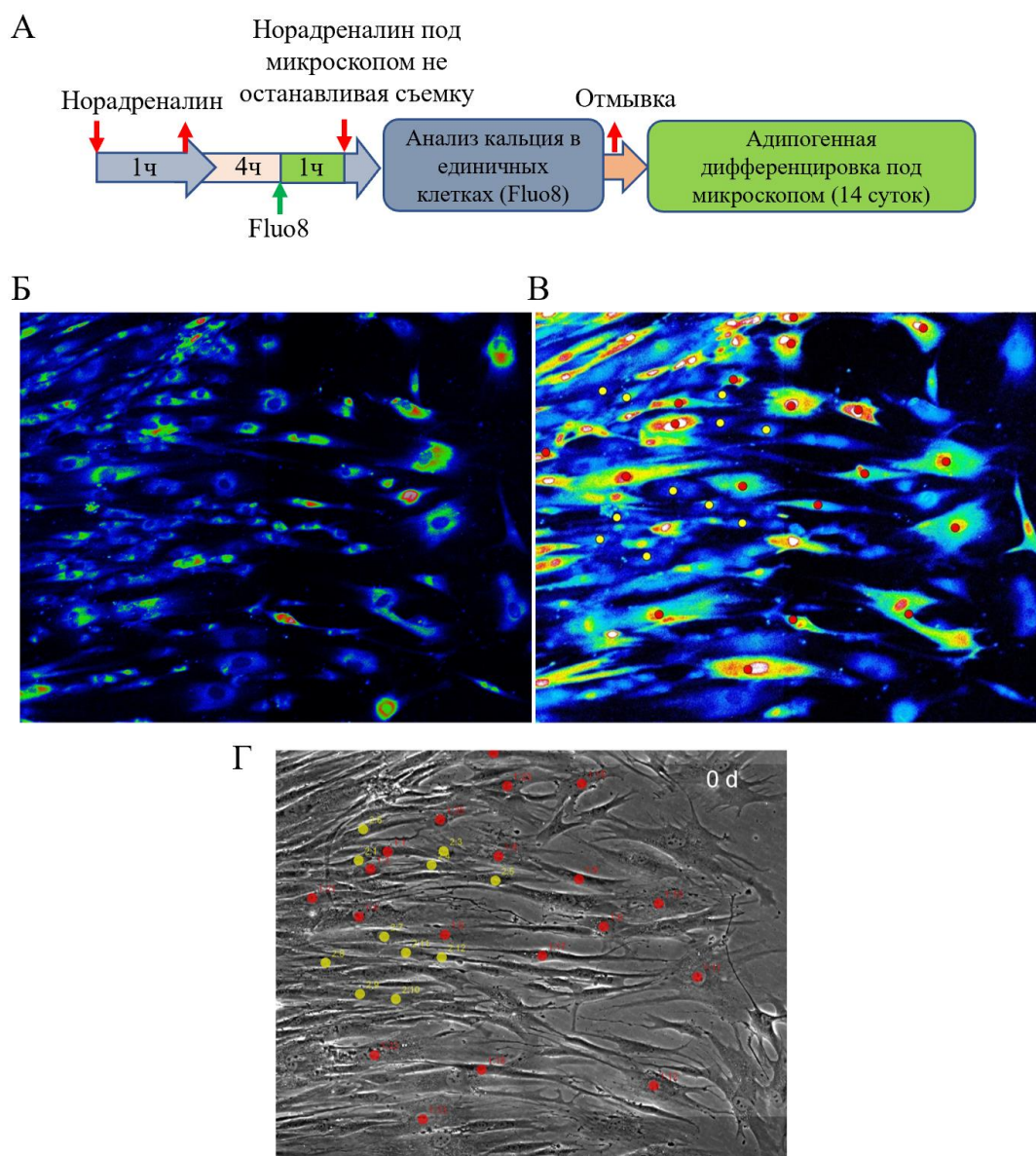


Рис. 3.50. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени после стимуляции клеток норадреналином. А. – схема эксперимента. Клетки были предварительно преинкубированы с норадреналином ($1\mu\text{M}$) в течение 1 часа, затем, через 4 часа окрашены кальциевым красителем Fluo-8 в течение дополнительного 1 часа. После этого под микроскопом клетки стимулировали норадреналином для выявления клеток, отвечающих кальцием на норадреналин. После этого клетки были направлены в адипогенную дифференцировку прямо под микроскопом. Б-В. Кальциевые ответы индивидуальных клеток в поле зрения микроскопа. Б - Флуоресценция клеток перед добавкой норадреналина. В. – флуоресценция клеток после добавки норадреналина. Флуоресценция показана в режиме проекции максимальной интенсивности клеток на протяжении всего времени после стимуляции клеток. Благодаря этому, на одном изображении видны все клетки, ответившие на добавку норадреналина одновременно. Красными точками отмечены клетки, ответившие кальцием на норадреналин, желтыми – не ответившие клетки. Г. – изображение того же поля зрения в проходящем свете.

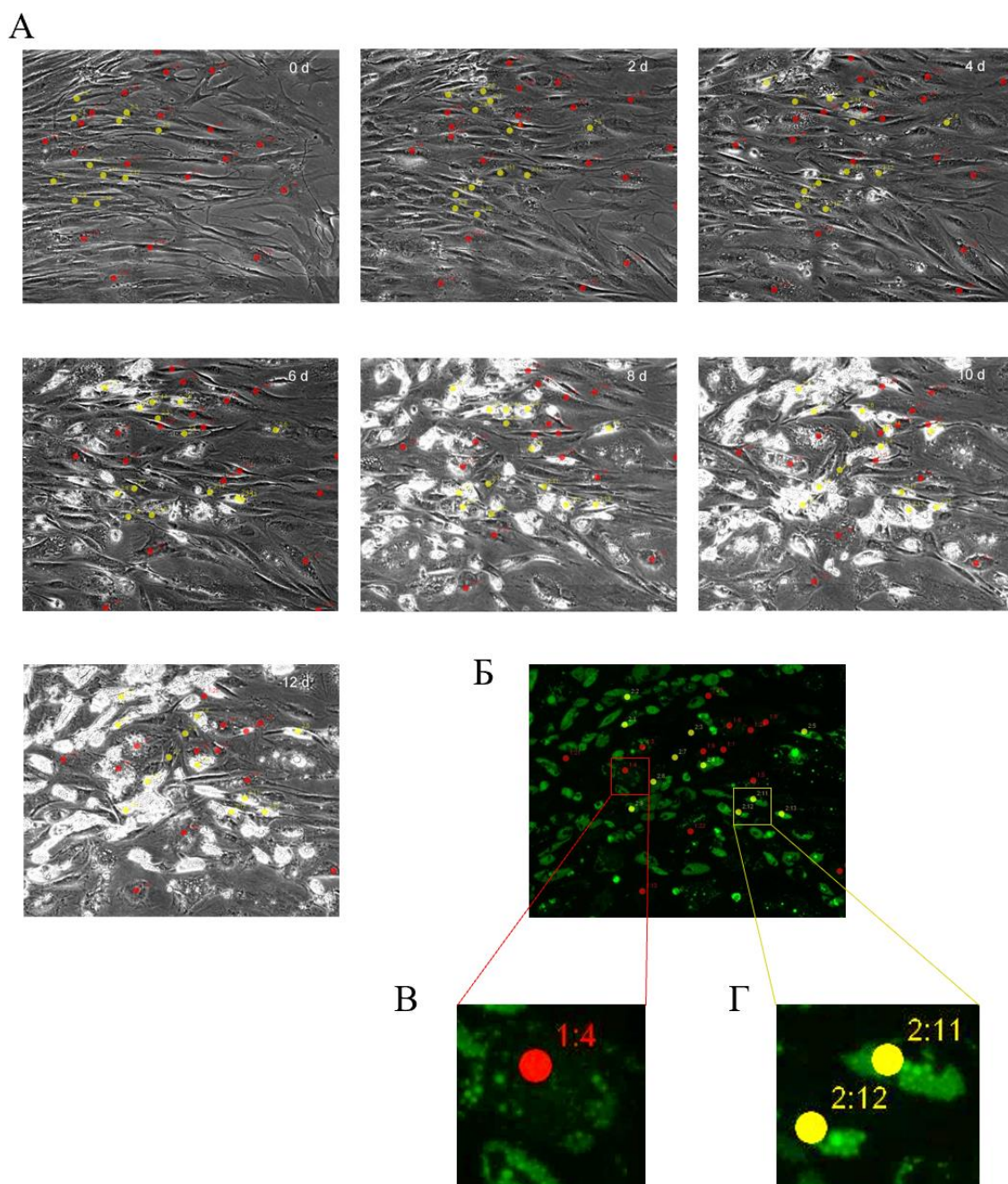


Рис. 3.51. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени на уровне единичных клеток. А. – Некоторые временные точки цейтраферного фильма, где отмечено местоположение клеток, за дифференцировочной судьбой которых проводили наблюдение. Б. – Окраска нейтральных липидов флуоресцентным красителем NileRed. В. – Пример клетки, которая отвечала кальцием на норадреналин, в ее цитоплазме выявляется большое количество жировых капелек малого размера. Г. – Пример клеток, которые не ответили кальцием на норадреналин. Их цитоплазма набита крупными жировыми каплями.

3.6.4. Последовательная стимуляция β -адренорецепторов, а затем $\alpha 1$ -адренорецепторов приводила к бежевой дифференцировке МСК

Для проверки участия норадреналин-зависимой инициации МСК и появляющихся вследствие этого на поверхности клеток $\alpha 1A$ -адренорецепторов в регуляции выбора направления дифференцировки МСК между белыми и бежевыми адипоцитами мы измерили уровень экспрессии мРНК ключевого маркера бежевых и бурых адипоцитов, разобщающего белка митохондрий, UCP1 (термогенина). Сбрасывая электрохимический потенциал на внутренней мембране митохондрий, в результате чего выделяется тепло, этот белок является специфическим маркером бурых адипоцитов бурой жировой ткани и образующихся бежевых адипоцитов белой жировой ткани [245]. Одно- и двукратная обработка МСК норадреналином показала (Рис. 3.52), что только при двукратной обработке с интервалом в 6 часов повышался уровень экспрессии UCP1. Из этого результата можно предположить, что программа по активации синтеза UCP1 запускалась только после инициации МСК с последующим воздействием на вышедший рецептор. Это существенно контрастировало с градуальным снижением уровня маркеров адипогенной дифференцировки адипонектина и PPAR γ при двукратном воздействии норадреналина (см. Рис. 3.49).

Для более специфического анализа механизмов повышения уровня UCP1 мы воспользовались ингибиторным анализом. Двукратное действие β -агониста добутамина подавляло экспрессию UCP1. Эффект двукратной обработки МСК норадреналином контрастировал с влиянием агонистов на маркеры белого жира. В случае адипонектина эффект норадреналина полностью воспроизводился β -агонистами, а в случае UCP1 эффекты двукратной обработки норадреналином и добутамином противоположные. Различные комбинации агонистов адренорецепторов при их поочередной добавке с интервалом в 6 часов показали, что только комбинация добутамин \rightarrow 6 ч \rightarrow фенилэфрин, которая специфически имитировала инициацию МСК с

последующей стимуляцией $\alpha 1$ -адренорецепторов, вызывала эффект, аналогичный двукратному действию норадреналина. При этом, возвращаясь к [Рис. 3.49](#), норадреналин подавлял дифференцировку МСК в белые адипоциты, действуя через β -адренорецепторы. Стимуляция β -адренорецепторов в любых комбинациях с $\alpha 1$ -адренорецепторами снижала уровень экспрессии маркеров белых адипоцитов адипонектина и PPAR γ , но сами $\alpha 1$ -адренорецепторы на это направление дифференцировки не влияли. Двукратная стимуляция β -адренорецепторов подавляла дифференцировку в белые адипоциты сильнее, чем однократная. Таким образом, стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов, выходящих на поверхность в результате инициации МСК, коммитировала клетки в сторону дифференцировки в бежевый фенотип адипоцитов, подавляя направление в белый фенотип.

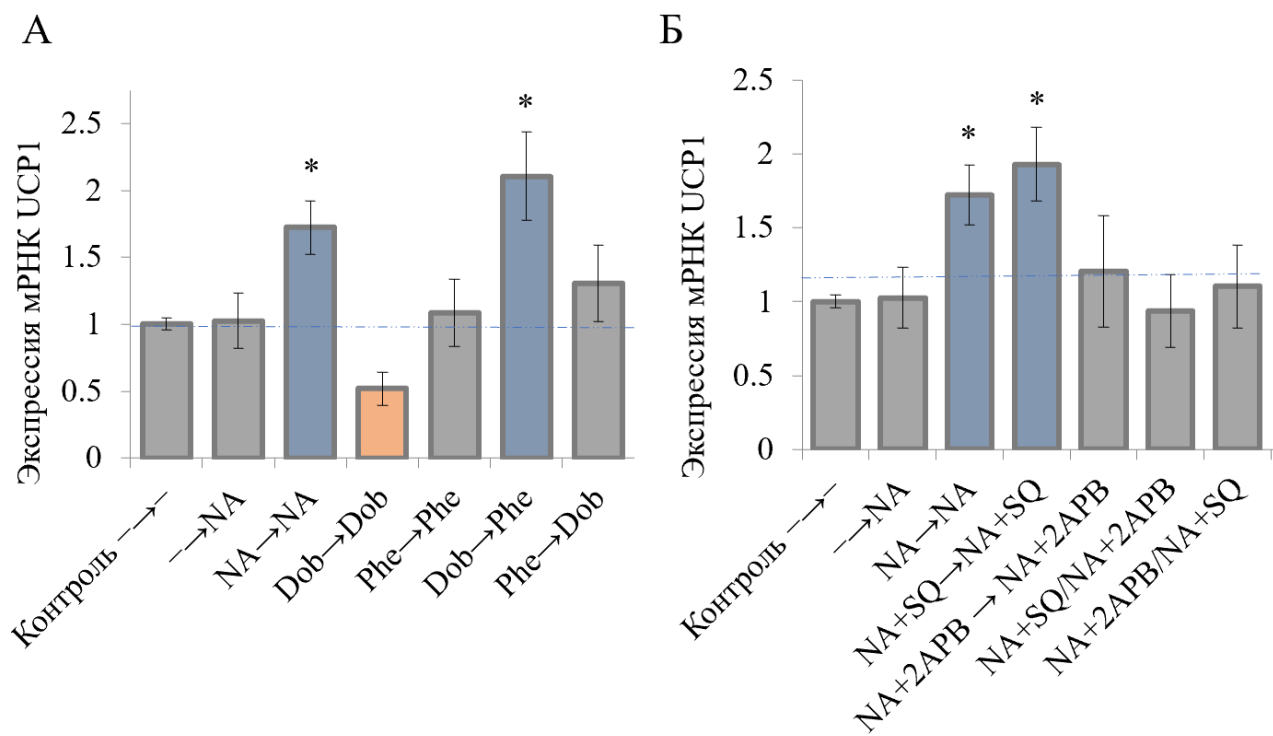


Рис. 3.52. Влияние комбинированной добавки агонистов $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов, а также ингибиторов их сигнальных каскадов на дифференцировку МСК в бежевые адипоциты по данным ПЦР в реальном времени. Показан уровень экспрессии маркера бежевых адипоцитов UCP1. Клетки стимулировали агонистом $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином (Phe, 100 μ M) и агонистом β -адренорецепторов добутамином (Dob, 1 μ M) с интервалом в 6 часов в различных комбинациях. В случае ингибиторного анализа клетки обрабатывали норадреналином в присутствии селективного ингибитора аденилат-циклазы SQ22536 (1 μ M), либо норадреналином в присутствии 2-АРВ (50 μ M, ингибитор ИФ3-рецептора), ключевого действующего лица передачи сигнала от рецепторов, сопряженных с Gq-белком и кальциевой сигнализацией (в случае совместной с норадреналином стимуляции ингибируется сигнализация от $\alpha 1$ -адренорецепторов). Ингибиторы добавляли за 30 минут до стимуляции клеток норадреналином. Первая стимуляция гормонами и агонистами длилась 1 час, после чего клетки тщательно отмывали трехкратной заменой среды и помещали в полную среду роста. Через 5 часов клетки повторно стимулировали агонистами или норадреналином в присутствии ингибиторов также в течение 1 часа. Комбинации первой и второй стимуляций указаны на рисунках через стрелку под соответствующим столбиком диаграммы. * $p < 0.05$ относительно образца Контроль. Данные в виде среднего \pm СтОш.

Использование ингибиторов ключевых сигнальных каскадов, активируемых $\alpha 1$ - и β -адренорецепторами, ингибитора выхода кальция из эндоплазматического ретикулума через ИФЗ-рецепторы (2APB) и ингибитора аденилатциклазы SQ22536 показало (Рис. 3.52, Б), что для коммитирования клеток в этом направлении требовалось действие норадреналина в присутствии подавленной активности аденилатциклазы и активации кальциевой сигнализации. При блокировании выхода кальция из эндоплазматического ретикулума стимулирующий эффект норадреналина пропадал. Ингибирование аденилатциклазы не влияло на эффективность бежевой дифференцировки, что можно трактовать по-разному. Во-первых, можно предположить, что аденилатциклаза не принимала участие в коммитировании МСК в направлении бежевой дифференцировки. Однако это противоречит результатам о возможности замены первичного воздействия норадреналина добутамином, который активирует аденилатциклазу, и возможности инициации МСК активатором аденилатциклаз форсколином (см. Рис. 3.30, А). В качестве возможного альтернативного объяснения можно предположить, что на первом этапе важную роль играло подавление активности аденилатциклазы, которое происходило после действия норадреналина вследствие десенситизации β -адренорецепторов. Согласно данным результатам с влиянием агонистов адренорецепторов на уровень экспрессии UCP1, можно предположить, что при действии норадреналина или агонистов в последовательности добутамин \rightarrow фенилэфрин ингибирование активности аденилатциклазы происходило за счет десенситизации β -адренорецепторов. Таким образом, в результате прохождения β -адренорецептор-зависимой инициации МСК и стимуляции вышедших на поверхность клеток $\alpha 1$ -адренорецепторов происходило коммитирование клеток в направлении бежевой дифференцировки.

3.6.5. Изоляция индивидуальных клеток, отвечающих кальцием на норадреналин, подтвердила коммитирование в бежевую дифференцировку

Для независимого анализа дифференцировочного потенциала клеток, отвечающих кальцием на норадреналин, мы разработали методику сортировки клеток по их чувствительности к норадреналину. Отмечу, что, как мы описывали ранее, практически все клетки популяции МСК экспрессировали $\alpha 1$ -адренорецепторы, но функционально активной оказалась лишь небольшая субпопуляция клеток (см. раздел «3.4. Механизмы перехода МСК в инициированное состояние»). Таким образом, применение стандартных методик сортировки клеток по экспрессии узнаваемого антителами поверхностного маркера оказывалось в нашем случае невозможным. Мы разработали методику сортировки клеток по кальциевому ответу на гормон. Для этого к окрашенным клеткам мы добавляли гормон непосредственно в клеточном сортере и отбирали только клетки, существенно превышающие по своей флуоресценции средний сигнал популяции. Эффективность такого сортирования была крайне низка, как это видно из [Рис. 3.53, Б и Д](#). Отрицательным контролем была проба, в которую добавили буфер без норадреналина, а положительным – иономицин, повышающий внутриклеточный уровень кальция ([Рис. 3.53, Б-В](#)). Количество клеток, регистрируемых и отделяемых после добавления норадреналина по данному протоколу, было существенно меньше, чем число отвечающих кальцием на норадреналин клеток (0,44% на сортере против 5-14% при регистрации кальциевых ответов под микроскопом). Как мы считаем, это связано с тем, что, во-первых, МСК отвечали на действие гормона несинхронно и транзиторно. Поэтому вероятность того, что момент ответа клетки кальцием и момент прохода клетки в капилляре сортера совпадут, достаточно невелика ([Рис. 3.53, А](#)). Во-вторых, под микроскопом клетки регистрировались в динамике, что позволяет увидеть изменение уровня флуоресценции каждой клетки при действии на нее гормона. В данном же

случае регистрировалась флуоресценция клетки в момент ее прохода через капилляр. И в том случае, если клетка ответила на гормон, но ее изначальная яркость была низкой, то и во время кальциевого всплеска ее флуоресценция не выходила за пределы базального облака распределения флуоресценции (черные кружки на [Рис. 3.53, Б](#)). Таким образом, в разряд анализируемых клеток попадали только те, которые на начальный момент содержали большое количество красителя (содержание красителя определяется активностью цитоплазматических эстераз, отщепляющих ацетометиловый довесок на молекуле красителя) и ответили именно в момент прохождения клетки через капилляр сортера. Кроме того, мы отдаем себе отчет в том, что в категорию «отвечающих» могли попасть и клетки, обладающие аномально высоким уровнем активности эстераз или постоянно высоким уровнем цитоплазматического кальция. К сожалению, данный метод не позволял отделять эти артефактные клетки. Тем не менее, в пользу того, что мы сортировали преимущественно отвечающие кальцием на норадреналин клетки, говорит то, что количество вылетающих из общего облака клеток увеличилось после добавления норадреналина по сравнению с контролем, в котором добавляли только буфер без норадреналина ([Рис. 3.53, В и Д](#)), а клетки сохраняли жизнеспособность после сортировки.

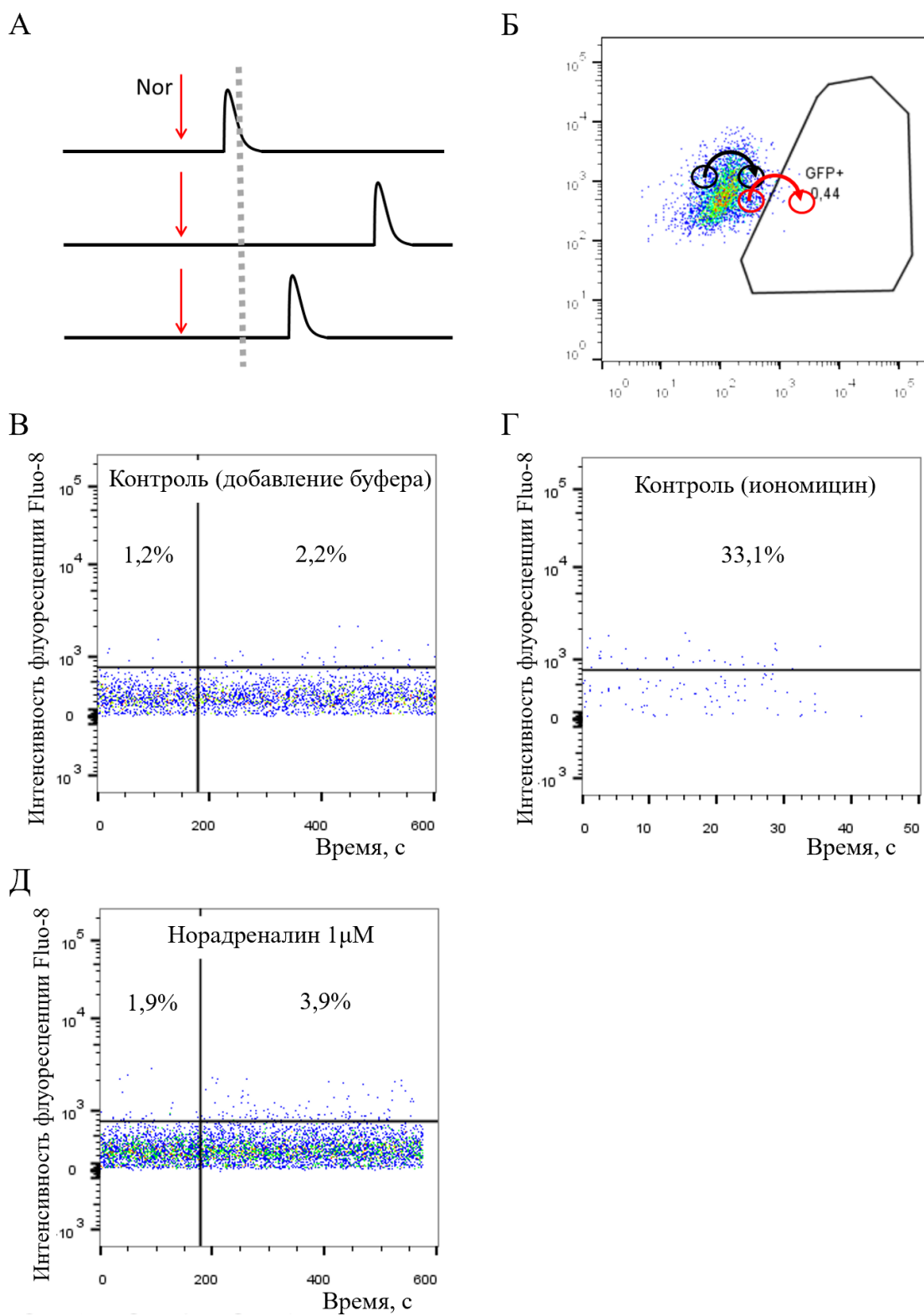


Рис. 3.53. Отделение МСК, отвечающих кальцием на норадреналин при помощи клеточного сортирования. А. – МСК отвечали кальцием на норадреналин несинхронно, в связи с чем снижается вероятность совпадения кальциевого ответа единичной клетки и момента прохождения клетки в капилляре через лазер с детектором. Б. – Репрезентативный двумерный точечный график образца клеток, окрашенных Fluor-8 с добавленным к клеткам норадреналином. Доля клеток, выходящих за пределы области «не отвечающих» клеток, составляет в данном случае 0.44% (такие клетки отмечены красным кружком). Кроме того,

здесь проиллюстрирована еще одна причина низкого количества положительных клеток в такой постановке эксперимента: МСК неоднородны по объему цитоплазмы и активности цитоплазматических эстераз. В связи с этим некоторые клетки могут иметь низкий уровень базальной флуоресценции и при кальциевом ответе не выходить за пределы облака «не отвечающих» клеток (такие клетки отмечены черным кружком). В-Д. – Временная развертка единичных событий на клеточной сортере в контрольных экспериментах и в опыте. В. – Контрольный эксперимент, в котором непосредственно перед загрузкой клеточной суспензии в сортер к клеткам был добавлен буфер, в котором растворяли норадреналин (отрицательный контроль). Г. - Контрольный эксперимент, в котором непосредственно перед загрузкой клеточной суспензии в сортер к клеткам был добавлен 1 μM иономицина, поднимающий внутриклеточный уровень кальция (положительный контроль). Д. – К клеточной суспензии был добавлен 1 μM норадреналина непосредственно перед загрузкой клеточной суспензии в сортер. Значения процентов, написанные на графиках, обозначают долю клеток, попавшую в область над горизонтальной линией в указанный интервал времени.

МСК сортировали на две группы: клетки, обладающие высоким уровнем флуоресценции и клетки из нижнего квартиля гистограммы распределения флуоресценции по яркости. В контрольную группу брали клетки низкой яркости из тех соображений, что там вероятность встречи клеток, ответивших на норадреналин, но оставшихся в пределах облака распределения, наименьшая. В контрольную группу было отсортировано клеток столько же, как и в группу опыта (около 500 клеток в каждом эксперименте в одну лунку 48-луночного планшета). Далее мы вырастили клетки до достижения ими монослоя (на это ушло примерно 3 недели) и направили в адипогенную дифференцировку. Эксперимент мы повторили 3 раза на клетках, полученных от трех различных доноров. На [Рис. 3.54](#) приведены изображения клеток после 21 дня адипогенной дифференцировки, окрашенные флуоресцентным красителем нейтральных липидов Nile Red. Как видно, клетки, отвечающие на норадреналин, не дифференцировались в адипоциты характерного фенотипа. Клетки либо вообще не содержали жировых капель, либо жировые капли маленькие и многочисленные ([Рис. 3.54, Б](#)). В контрольной группе большинство клеток дифференцировалось в адипоциты, содержащие большие жировые капли. Таким образом, клетки, отвечающие кальцием на норадреналин, не дифференцировались в белые адипоциты, но приобретали фенотип, схожий с бежевыми адипоцитами, что согласуется с данными дифференцировки МСК в реальном времени под микроскопом. Результаты этого эксперимента позволили сделать еще одно важное наблюдение: коммитирование МСК в бежевую дифференцировку после стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов поддерживалось на протяжении долгого времени. Мы культивировали ответившие клетки в течение нескольких недель, прежде чем направить в адипогенную дифференцировку. При этом коммитированность клеток между белыми и бежевыми жировыми клетками сохранялась.

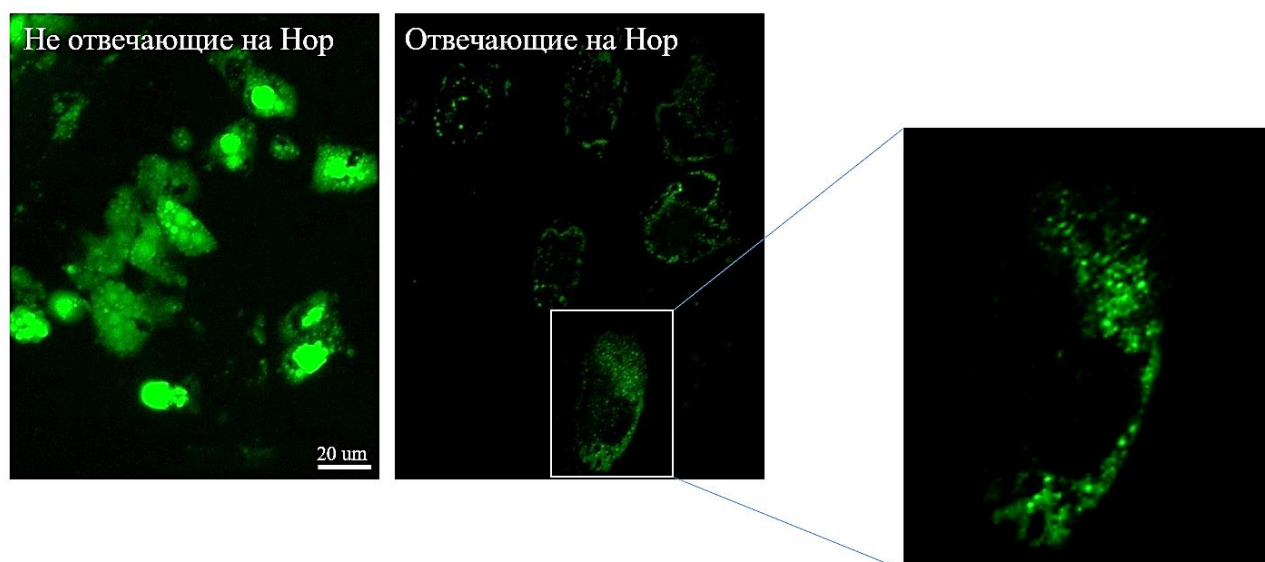


Рис. 3.54. Изображения клеток после сортировки по ответу на норадреналин по окончании 21 дня адипогенной дифференцировки, окрашенные флуоресцентным красителем нейтральных липидов Nile Red.

3.6.6. Треккинг дифференцировки МСК непосредственно в UCP1-экспрессирующие бежевые адипоциты

Для того чтобы напрямую проверить, превращаются ли МСК, инициированные норадреналином с последующим воздействием на вышедшие на поверхность клеток $\alpha 1A$ -адренорецепторы, в бежевые адипоциты, мы усложнили описанный выше эксперимент по наблюдению за дифференцировкой МСК в режиме реального времени. Как показано на [Рис. 3.55, А](#), перед регистрацией кальциевой сигнализации под микроскопом мы предварительно инициировали клетки обработкой норадреналином (либо β -агонистом добутамином) за 6 часов до повторной стимуляции. Повторную стимуляцию клеток норадреналином или $\alpha 1$ -агонистом фенилэфрином мы проводили уже под микроскопом с регистрацией внутриклеточных кальциевых событий при помощи красителя Fluo-8. На [Рис. 3.55, Б](#) показаны две репрезентативные клетки, ответившие кальцием на норадреналин. На [Рис. 3.56, А](#) показаны первый и последний кадры съемки клеток в процессе адипогенной дифференцировки под микроскопом, где красным и желтым

обозначены траектории движения, соответственно, клеток 1 и 2 на протяжении всего времени регистрации дифференцировки. После завершения адипогенной дифференцировки в течение 14 суток, мы зафиксировали клетки и осуществили иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер адипогенной дифференцировки адипонектин (зеленый цвет, [Рис. 3.56, Б](#)) и маркер бежевых и бурых адипоцитов UCP1 (красный цвет, на [Рис. 3.56, В](#)). Как видно на микрофотографиях, клетки, отвечающие кальцием на норадреналин после инициации норадреналином, имеют повышенный уровень экспрессии UCP1 и сниженную экспрессию адипонектина, что свидетельствует о том, что эти клетки дифференцировались в бежевые адипоциты.

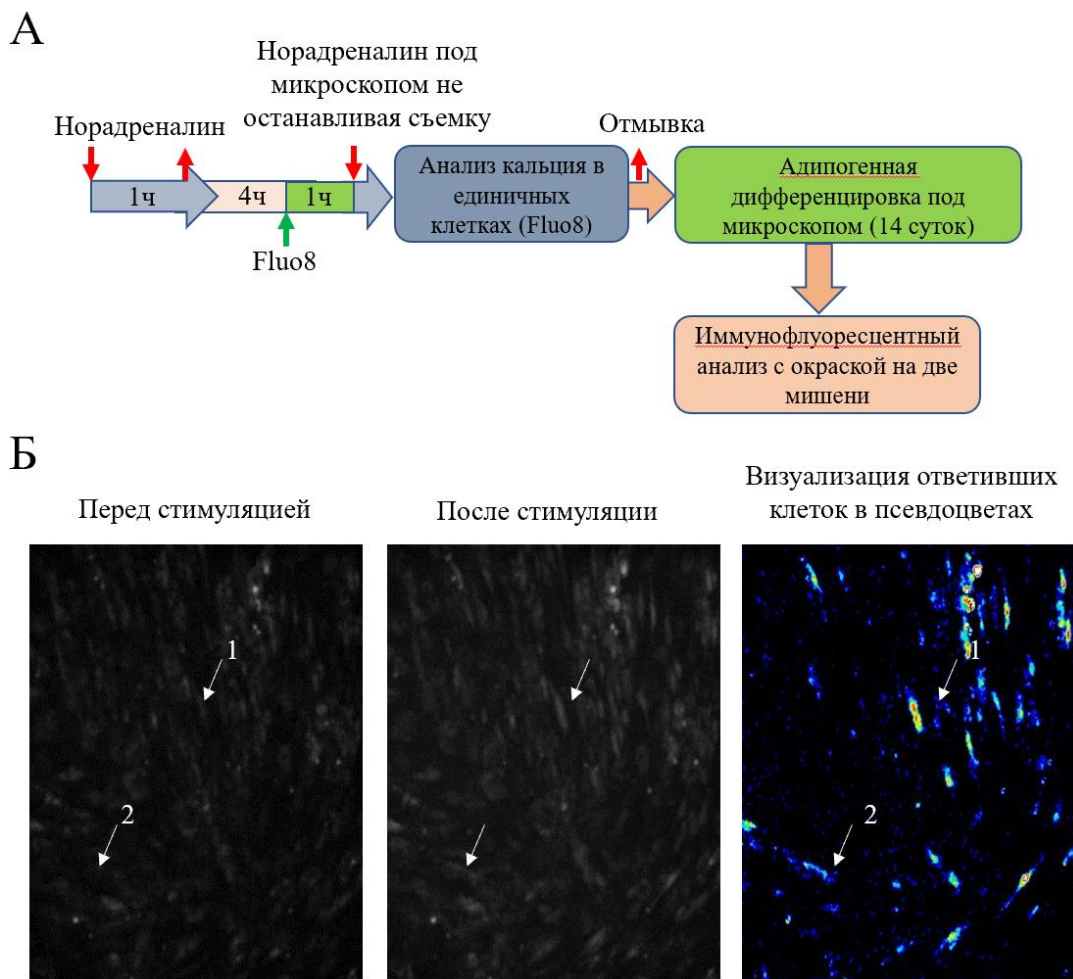


Рис. 3.55. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени после стимуляции клеток норадреналином с последующей окраской клеток на маркеры адипогенеза. А. – схема эксперимента. Б. – Кальциевые ответы индивидуальных клеток в поле зрения микроскопа, дифференцировочная судьба которых впоследствии была отслежена.

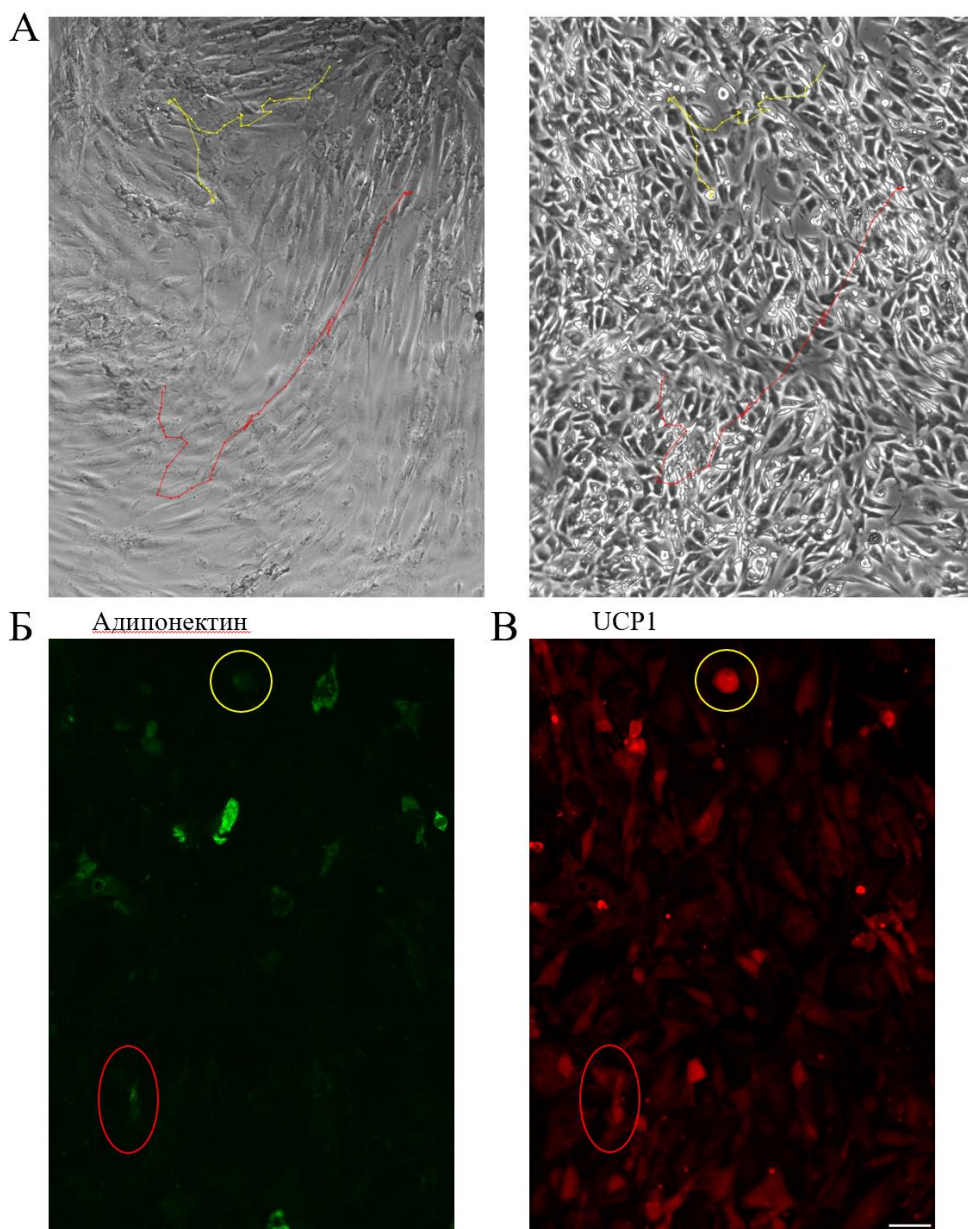


Рис. 3.56. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени после стимуляции клеток норадреналином с последующей окраской клеток на адипонектин и UCP1. А. – Выбранные клетки с визуализированными траекториями их перемещений на протяжении времени дифференцировки. Начальный и конечный моменты дифференцировки. Б. – Окраска выбранных полей зрения на адипонектин. В. – Окраска выбранных полей зрения на UCP1.

3.6.7. Метаболические изменения в дифференцирующихся адипоцитах вследствие их коммитирования в бежевом направлении

Бежевые и бурые адипоциты образуют тепло за счет значительных метаболических перестроек: разобщение дыхательной цепи под влиянием UCP1 приводит к тому, что митохондрии снижают свою роль в качестве основных источников АТФ, но не уменьшают, а, наоборот, усиливают интенсивность дыхательной цепи. Это неизбежно сказывается на интенсивности гликолиза. Для того чтобы проверить, изменяется ли метаболизм в МСК, направленных в адипогенную дифференцировку после обработки катехоламинами по схеме инициация → стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов, мы использовали метод измерения клеточного метаболизма при помощи прибора SeaHorse. Этот прибор измеряет закисление среды для регистрации интенсивности гликолиза (Рис. 3.57, А) и потребление кислорода для измерения интенсивности дыхания (Рис. 3.58, А). При этом к клеткам можно добавлять до трех различных химических агентов для измерения параметров метаболизма.

На Рис. 3.57, Б показаны результаты измерения интенсивности гликолиза в клетках, которые перед запуском адипогенной дифференцировки были подвергнуты двукратной обработке норадреналином (Нор-Нор) либо последовательно агонистами β -адренорецепторов добутамином и затем через 6 часов агонистом $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином (график Доб-Фен), либо в контроле растворителями агонистов. Как видно, МСК, подвергнутые стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов после инициации демонстрировали повышенную емкость гликолиза и его работу в базальных условиях на максимальном уровне. О том, что уровень гликолиза максимальный уже при базальной активности клеток, говорит то, что после добавления олигомицина повышения интенсивности гликолиза не наблюдали. Это согласуется с теоретическими изменениями в интенсивности гликолиза, которые происходили при бежевой дифференцировке клеток. На Рис. 3.58, Б показаны

результаты измерения интенсивности дыхания в клетках, которые перед запуском адипогенной дифференцировки были подвергнуты тем же обработкам. Видно, что в дыхательной цепи повышалась утечка H^+ , что полностью согласуется с активностью UCP1, а также повышался максимум дыхания, что может свидетельствовать либо об увеличении числа митохондрий в клетках, либо об увеличении эффективности их работы [246]. В целом, данные по оценке изменения метаболизма МСК, направленных в адипогенную дифференцировку, подтвердили участие стимуляции выходящих при инициации $\alpha 1A$ -адренорецепторов на коммитирование клеток в бежевую дифференцировку. Достаточно слабая выраженность наблюдаемых эффектов могла быть связана с тем, что, как мы видели в экспериментах по дифференцировке клеток в реальном времени, в бежевую дифференцировку направлялась лишь малая часть клеток популяции. По-видимому, изменение их метаболизма размывалось на фоне клеток, дифференцированных в белые адипоциты и на фоне недифференцированных клеток.

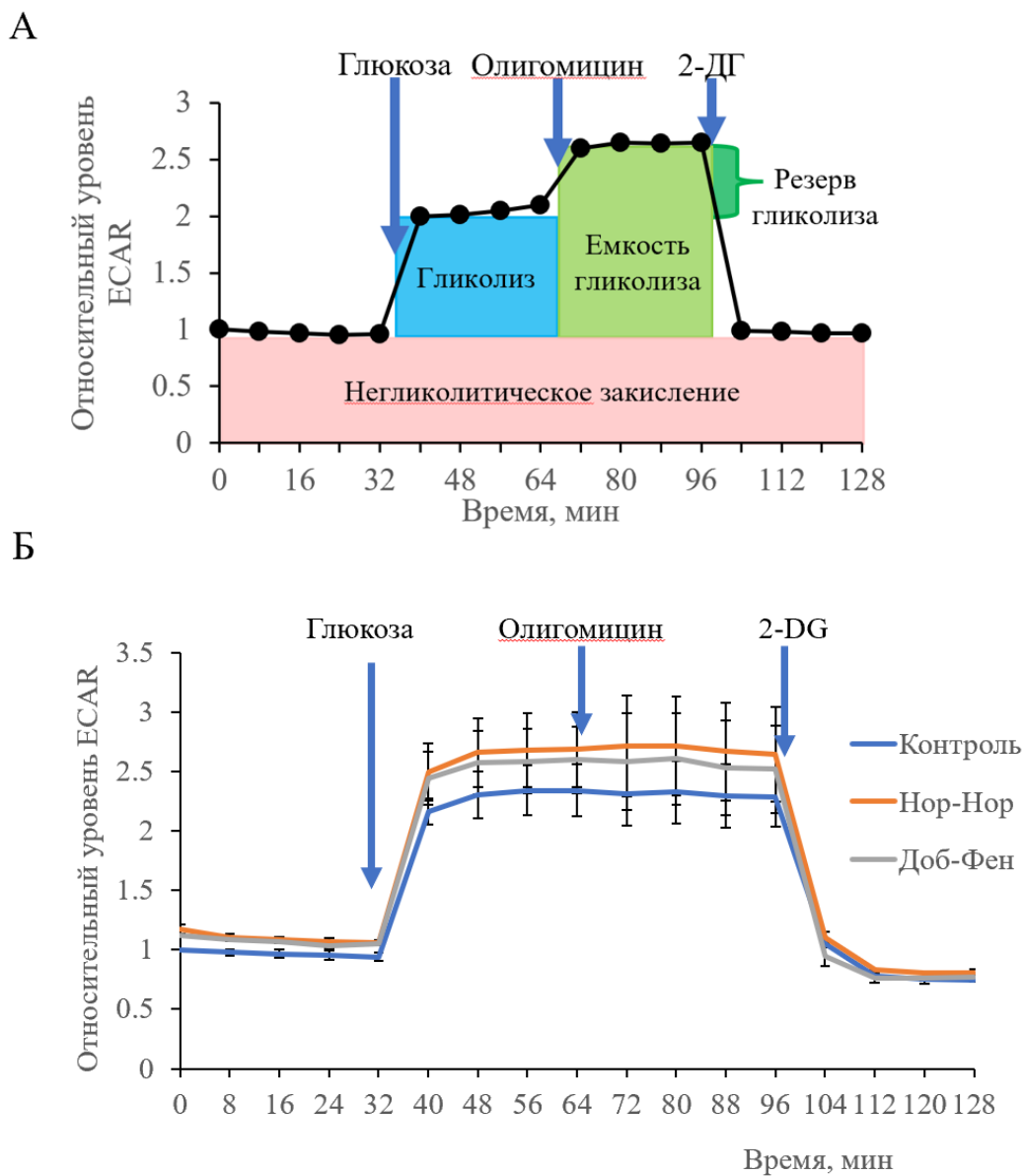


Рис. 3.57. Определение параметров гликолиза при помощи прибора SeaHorse (измеряется закисление среды). А. – Схема измеряемых параметров гликолиза при помещении клеток в безглюкозную среду (для измерения негликолитического закисления среды). Далее добавляется глюкоза для запуска гликолиза. Затем добавляется олигомицин для выключения дыхания, в результате чего гликолиз достигает своих максимальных значений. И, наконец, выключается гликолиз при помощи 2-дезоксиглюкозы, что является дополнительным контролем всей системы, которая должна вернуться к уровню негликолитического закисления. Б. – Клетки были подвергнуты двукратной обработке 1 μ M норадреналина (Нор-Нор) либо последовательно агонистами β -адренорецепторов добутамином (1 μ M) и затем через 6 часов агонистом α 1-адренорецепторов фенилэфрином (100 μ M) (график Доб-Фен). Затем клетки были направлены в адипогенную дифференцировку стандартным дифференцировочным коктейлем. Через 14 дней измеряли параметры метаболизма. Данные получены в 2 независимых экспериментах, один из которых приведен здесь.

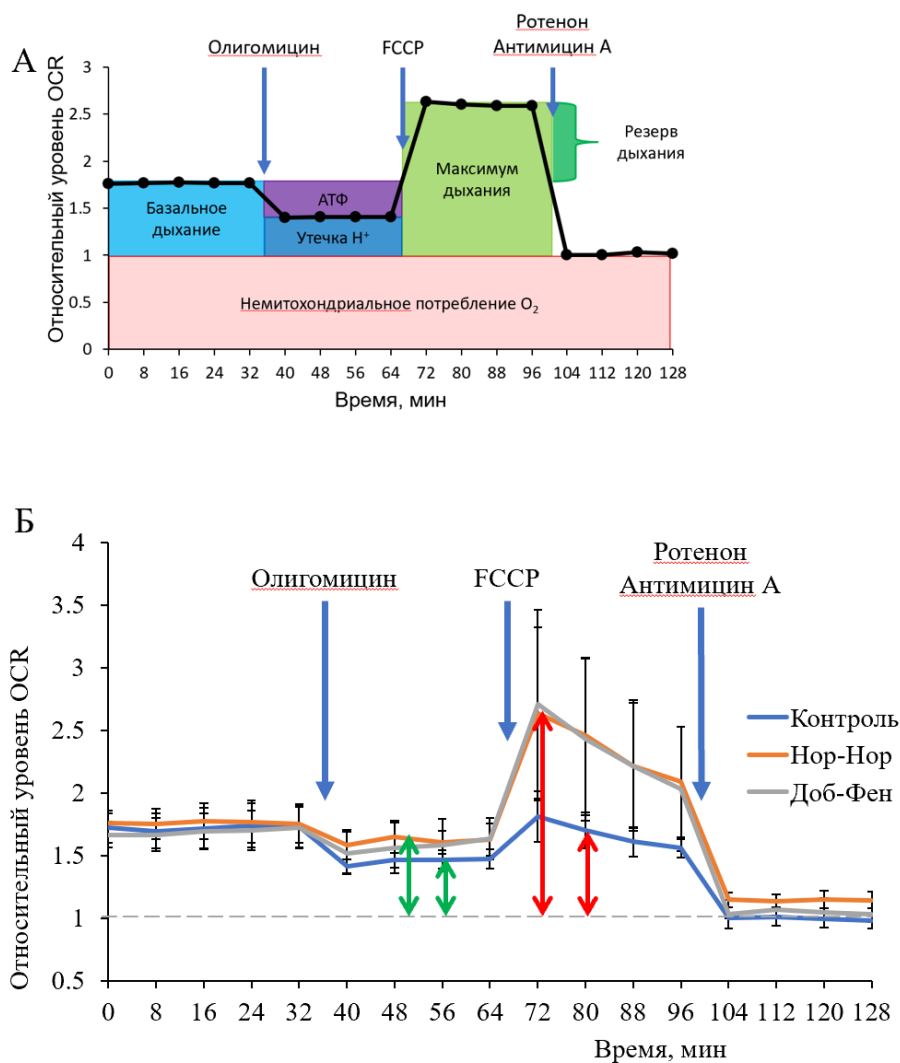


Рис. 3.58. Определение параметров дыхания при помощи прибора SeaHorse (измеряется потребление кислорода). А. – Схема измеряемых параметров дыхания при помещении клеток в среду, содержащую глюкозу (для измерения базального дыхания). Далее добавляется олигомицин для ингибирования АТФ-синтазы и, соответственно, подавления дыхания из-за гиперполяризации. Затем добавляется разобщитель дыхательной цепи FCCP. При этом дыхание включается на максимальном уровне для поддержания мембранного потенциала. В результате дыхание достигает своих максимальных значений. И, наконец, выключается дыхание при помощи смеси ротенона и антимицина А, блокаторов, соответственно, I и III комплексов дыхательной цепи. После этого регистрируется недыхательное потребление кислорода. Б. – Клетки были подвергнуты двукратной обработке 1 μ M норадреналина (Нор-Нор) либо последовательно агонистами β -адренорецепторов добутамином (1 μ M) и затем через 6 часов агонистом α 1-адренорецепторов фенилэфрином (100 μ M) (график Доб-Фен). Затем клетки были направлены в адипогенную дифференцировку стандартным дифференцировочным коктейлем. Через 14 дней измеряли параметры метаболизма. Зелеными стрелками показано изменение интенсивности утечки протонов в митохондриях в результате инициации-стимуляции клеток перед запуском адипогенной дифференцировки. Красными стрелками показано изменение максимального уровня дыхания. Данные получены в 2 независимых экспериментах, один из которых приведен здесь.

3.6.8. Обсуждение метаболических изменений в МСК после их инициации и направления в адипогенную дифференцировку

Таким образом, в результате инициации МСК под действием стимуляции β 3-адренорецепторов на поверхность клеток выходили α 1A-адренорецепторы, стимуляция которых приводила, во-первых, к подавлению дифференцировки МСК в белые адипоциты, которая выражалась в снижении уровня экспрессии белка адипонектина и блокировке накопления жировых капель в цитоплазме. Подавление уровня белка адипонектина мы наблюдали при отслеживании дифференцировочной судьбы единичных клеток. Однако эти данные кажутся противоречащим результатам анализа уровня мРНК адипонектина после двукратной обработки клеток норадреналином. Данная нестыковка может объясняться тем, что клеток, направленных в бежевую дифференцировку, в популяции достаточно мало (учитывая, что порядка 10-20% клеток отвечали кальцием на норадреналин, можно предположить, что уровень дифференцировки МСК в бежевые адипоциты не превышал эти значения). При лизировании тотальной популяции дифференцированных клеток для ПЦР-анализа понижение уровня экспрессии адипонектина в малой фракции клеток могло быть незаметным. Во-вторых, стимуляция выходящих на поверхность клеток α 1A-адренорецепторов вела к коммитированию МСК в бежевые адипоциты. Последняя выражалась в повышении уровня экспрессии UCP1, подавлении накопления крупных жировых капель и изменении клеточного метаболизма.

3.6.9. Проверка вклада инициации МСК в выбор направления адипогенной дифференцировки *in vivo*

Для проверки *in vivo* наблюдаемого нами феномена коммитирования МСК в направлении бежевой дифференцировки мы обратились к моделям индукции побурения белой жировой ткани у мышей. В настоящее время существует две

основных модели повышения представленности бежевых адипоцитов в жировой ткани мышей: во-первых, это помещение мыши в нетермонейтральные условия, когда на организм на протяжении длительного времени воздействует холод [247]. Во-вторых, как позже было установлено, эффект длительного охлаждения организма мыши полностью воспроизводится в случае системного или внутрибрюшинного введения $\beta 3$ -агониста С1-316243 в течение достаточно длительного времени (1-2 недели) [248, 249]. В этом случае побурение белой жировой ткани происходит даже в термонейтральных условиях обитания животных. Большинство групп считает, что введение $\beta 3$ -агониста имитирует системное действие адреналина, продукция которого повышается при стабильном воздействии холода на организм [250]. Стоит отметить, что $\beta 3$ -адренорецепторы показывают схожее сродство к норадреналину и к адреналину [251]. Однако в ряде работ была показана ключевая роль СНС и локально продуцируемого ей норадреналина в реализации побурения белой жировой ткани [252]. На основе наших находок мы предложили модель коммитирования МСК в направлении бежевых адипоцитов, которая решает имеющиеся в литературе разногласия.

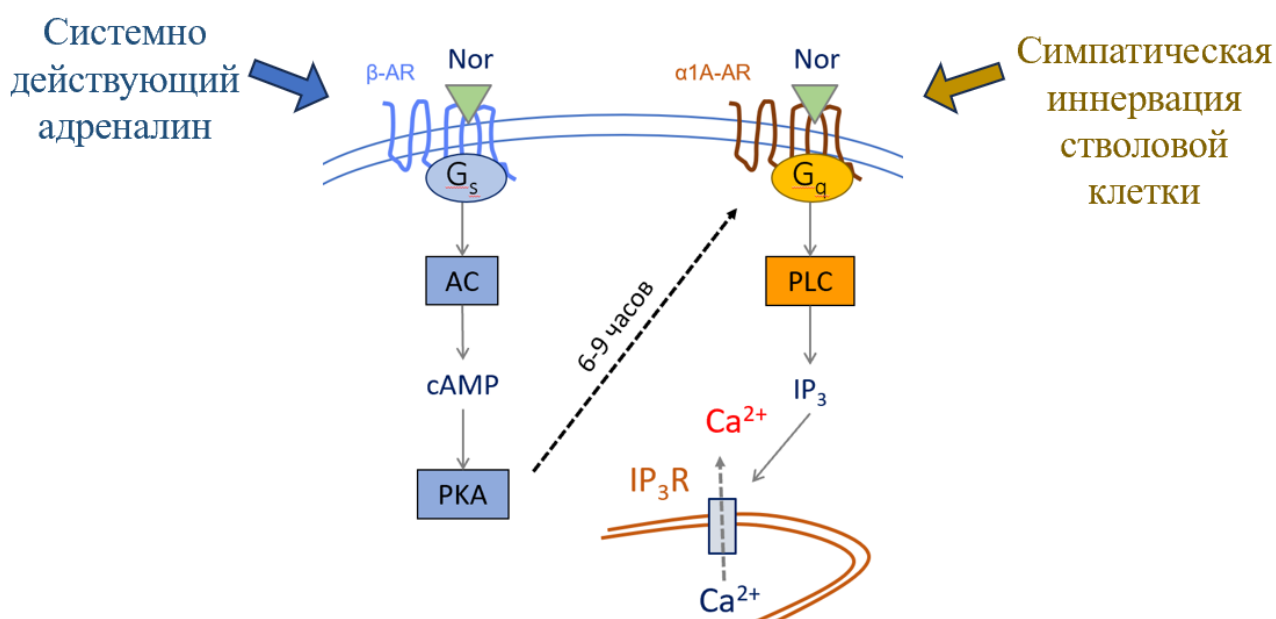


Рис. 3.59. Предполагаемый механизм действия адреналина и СНС в коммитировании МСК в направлении дифференцировки в сторону бежевых адипоцитов.

Согласно нашему предположению, для коммитирования МСК в бежевые адипоциты требуется первичная стимуляция МСК под действием системно действующего адреналина. Этот гормон имеет преимущественное сродство к β -адренорецепторам. Адреналин инициирует МСК, воздействуя на β -адренорецепторы, приводя к выходу на поверхность клеток α 1А-адренорецепторов. Далее на клетку должен прийти сигнал от СНС, нейромедиатор которой норадреналин имеет преимущественное сродство к α 1-адренорецепторам. Последние запускают кальциевый сигнальный каскад, приводящий уже к коммитированию стволовых клеток в направлении бежевой дифференцировки (Рис. 3.59).

Для проверки данной модели *in vivo* мы сделали следующий эксперимент: мы проверили, будет ли происходить побурение симпатэктомизированной белой жировой ткани мыши при помощи внутрибрюшинно введенного β 3-агониста С1-316243. Насколько мы знаем, такой эксперимент до сих пор в литературе не встречался. С точки зрения имеющихся моделей побурения белой жировой ткани он кажется абсурдным: мы убираем катехоламины, действующие на ткань локально (путем секретиции из симпатических волокон) и добавляем их системно (путем введения С1-316243). Тем не менее, согласно нашей гипотезе, эти два акта действия на клетки катехоламинов участвуют в различных этапах коммитирования клеток в бежевые адипоциты. Для повышения достоверности получаемых данных мы усложнили модель введением внутреннего контроля в мышцах. Уровень симпатической иннервации жировых депо, концентрация норадреналина, а также базальный уровень экспрессии UCP1 может варьировать в достаточно широких пределах от мыши к мышце даже внутри одной линии (см. Рис. 3.63). В связи с этим, симпатэктомию мы делали локально для одного из парных эпидидимальных жировых депо. Второе интактное депо (туда закалывали растворитель химического агента) выступало в данном случае в качестве внутреннего контроля. Мы отработали несколько вариантов введения ключевых используемых на сегодняшний день

симпатэктомизирующих агентов 6-гидроксидофамина (6-OHDA) и гуанетидина. Первый активно и эффективно используется для химической симпатэктомии у мышей [253], однако практически нет данных о его использовании для локальной симпатэктомии. Второй описан для эффективного проведения локальной симпатэктомии у хомяков, но, по заявлению авторов, на мышах этот агент не работает [198]. Мы проверили оба этих агента при их локальном введении в одно из парных эпидидимальных жировых депо мыши (Рис. 3.60). Мы протестировали два способа введения химических агентов – менее инвазивный через кожу и более точный с полостным доступом. Как видно, введение через кожу не показало эффективности. Полостное введение 6-OHDA привело к симпатэктомии, но, видимо, он действует не совсем локально, поскольку снизился уровень норадреналина и в контрольном депо. Наилучшие результаты показало локальное введение гуанетидина в одно из парных эпидидимальных жировых депо после вскрытия брюшной полости (Рис. 3.60, четвертая модель).

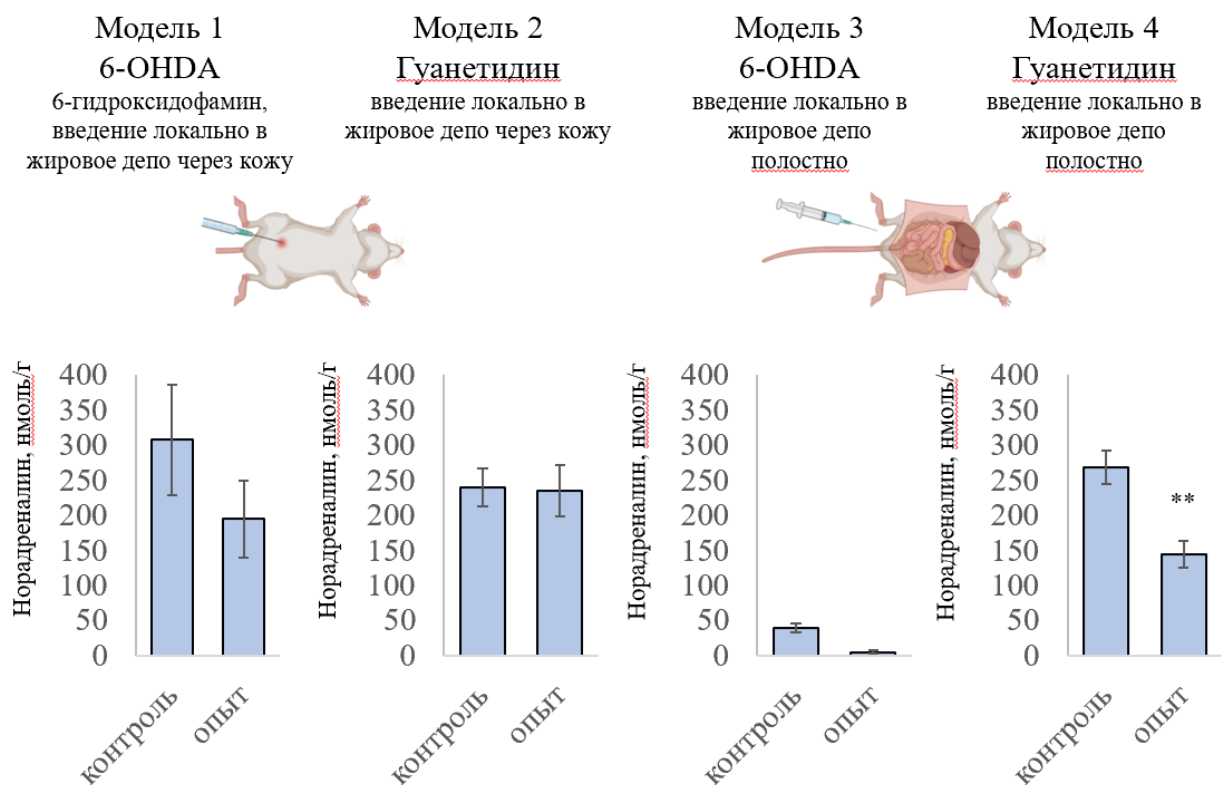
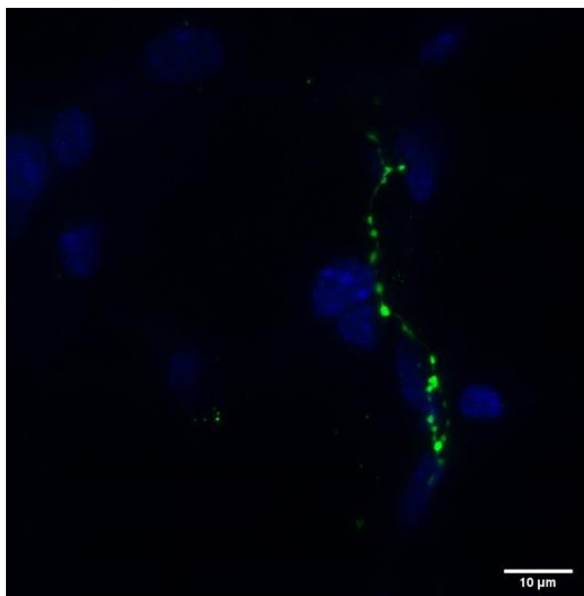


Рис. 3.60. Отработка условий локальной симпатэктомии одного из парных эпидидимальных жировых депо мыши. Химические симпатэктомизирующие агенты 6-гидроксидофамин (6-OHDA, 12 инъекций по периметру жирового депо по 3,3 мкл. 9 мг/мл 6-OHDA) и гуанетидин (12 инъекций по периметру жирового депо по 3,3 мкл. 10 мг/мл гуанетидина) закалывали непосредственно в жировое депо либо через кожу, либо после вскрытия брюшной полости. Контроль локальной симпатэктомии проводили путем хроматографического измерения концентрации норадреналина в ткани после ее забора у мыши. $n=3$ в каждой группе, ** $p<0.01$ относительно соответствующего образца Контроль. Данные в виде среднего \pm СтОш.

Эффективность произведенной локальной симпатэктомии мы проверили иммунофлуоресцентно путем покраски срезов контрольного и опытного депо жировой ткани на симпатические волокна (маркер адренергических нервных волокон тирозин-гидроксилаза). Как видно на Рис. 3.61, если в контрольных депо выявлялись симпатические волокна, то после симпатэктомии в ткани окрашивались лишь отдельные точки, не выстроенные в цельные волокна. Таким образом, введение гуанетидина позволило эффективно произвести локальную симпатэктомию в одном из эпидидимальных жировых депо мыши.

Срез интактной жировой ткани



Срез жировой ткани после симпатэктомии гуанетидином

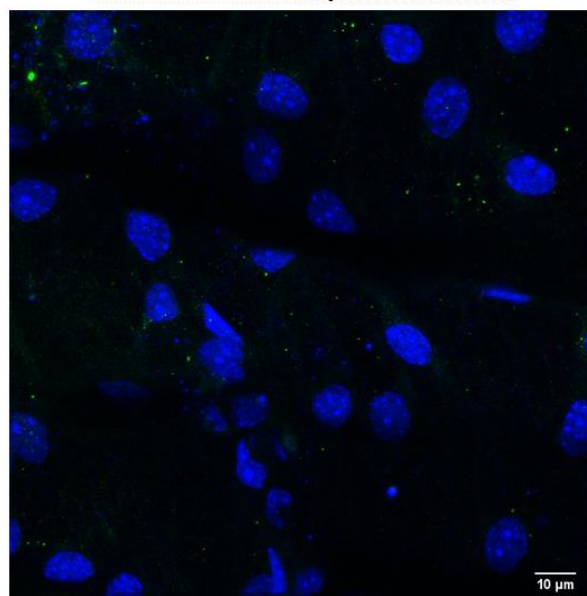


Рис. 3.61. Проверка эффективности локальной симпатэктомии в эпидидимальных жировых депо мышей при введении гуанетидина после вскрытия брюшной полости. Иммунофлуоресцентная окраска срезов опытного (локальное введение гуанетидина 10 мкг/мкл, мелкими инъекциями по 3,3 мкл. по периметру жирового депо, 12 инъекций) и контрольного (введение растворителя химического агента) депо жировой ткани на симпатические волокна (маркер катехоламин-продуцирующих клеток тирозин-гидроксилаза). Образец жировой ткани забирали через 14 дней после введения гуанетидина. Масштаб 10 μМ.

В параллельном эксперименте мы наладили методику проведения побурения белой жировой ткани у мышей при помощи внутрибрюшинного введения $\beta 3$ -агониста С1-316243. Как видно на Рис. 3.62, в результате индукции побурения в белой жировой ткани появлялись очаги более мелких клеток, интенсивнее окрашиваемых при окраске гематоксилином – группы бежевых адипоцитов.

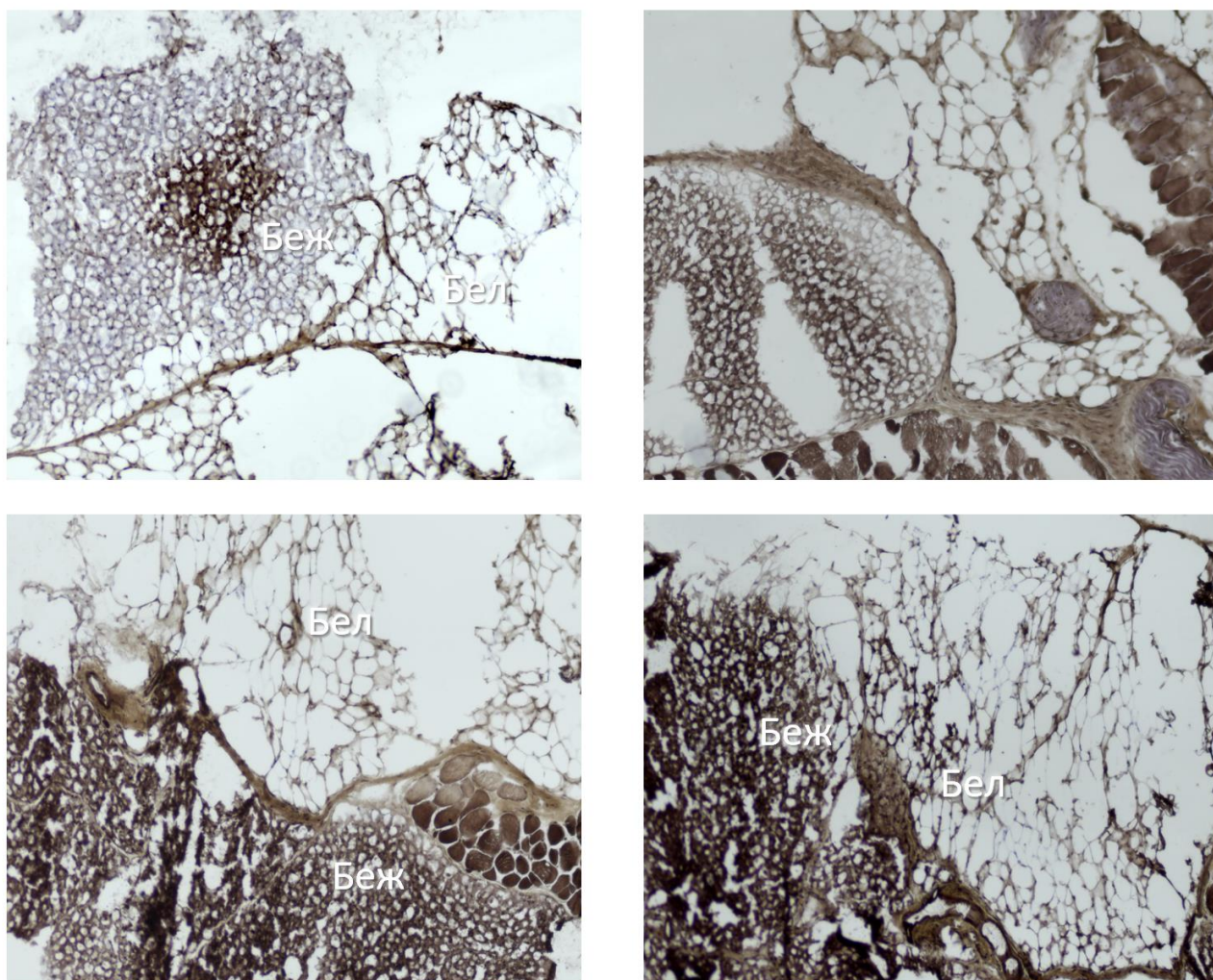


Рис. 3.62. При индукции побурения в белой жировой ткани (обозначение Бел на фотографиях) появлялись очаги бежевого жира (обозначение Беж на фотографиях). Покраска гематоксилином. Масштаб 50 μ М.

В качестве контроля на равномерность представленности ключевого маркера бежевых адипоцитов белка UCP1 мы сравнили уровень экспрессии этого белка в парных жировых депо после проведения локальной симпатэктомии (Рис. 3.63, первые 4 дорожки мембраны вестерн-блоттинга) и индукции побурения (Рис. 3.63, последние 4 дорожки мембраны вестерн-блоттинга). Как видно, от мыши к мышке варьировал уровень экспрессии UCP1, как и интенсивность ответа на индукцию побурения, но внутри одной мыши при сравнении парных

депо экспрессия этого белка была достаточно стабильна. Кроме того, локальная симпатэктомия сама по себе не влияла на уровень экспрессии UCP1 (Рис. 3.63, первые 4 дорожки мембраны вестерн-блоттинга).

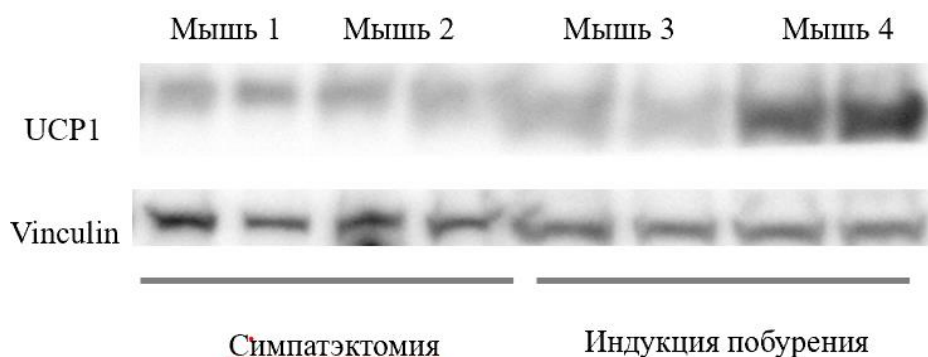


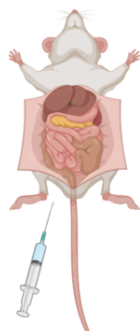
Рис. 3.63. Влияние локальной симпатэктомии и индукции побурения на уровень экспрессии маркера бежевых адипоцитов UCP1.

Для проверки участия механизма инициации МСК с последующим воздействием на сенситизированные $\alpha 1A$ -адренорецепторы *in vivo* в коммитировании клеток в бежевое направление дифференцировки мы сделали эксперимент, схема которого представлена на Рис. 3.64, А. Имитацией системного действия норадреналина служило введение $\beta 3$ -агониста С1-316243. Смоделировать локальное действие СНС на конкретное жировое депо представляется достаточно проблематичным, поэтому в данном случае мы пошли обратным путем и провели локальную симпатэктомию. При этом мы предотвратили действие на стволовые клетки второго предполагаемого сигнала, никак не нарушив доступность первого сигнала (адреналина или С1-316243). После проведения локальной симпатэктомии мы индуцировали побурение белой жировой ткани в течение 1 недели. На Рис. 3.64, Б показаны результаты измерения концентрации норадреналина в парных жировых депо индивидуальных мышей и соответствующий им уровень экспрессии UCP1 в тех же образцах. На Рис. 3.64, Б приведены репрезентативные результаты сравнения концентрации норадреналина в парных жировых депо и уровня

экспрессии UCP1. На диаграмме на [Рис. 3.65, А-Б](#) приведены все результаты взаимного измерения концентрации норадреналина в парных жировых депо и уровня экспрессии UCP1. Видно, что относительный уровень экспрессии UCP1 прямо пропорционален разнице в локальном уровне норадреналина в парных депо. Стоит отметить, что не у всех мышей симпатэктомированное депо показывало сниженный уровень норадреналина. Нередко в этом депо концентрация норадреналина была повышенной. Это может быть связано с компенсаторными реакциями *in vivo*, в результате которых после симпатэктомии проходило восстановление иннервации с повышенным уровнем активности СНС на первых этапах регенерации. Тем не менее, и у таких животных строго соблюдалась корреляция: чем выше локальный уровень норадреналина в жировом депо, тем выше экспрессия UCP1 [Рис. 3.65, А-Б](#). Эта закономерность соблюдалась при сравнении парных жировых депо в рамках индивидуальных мышей. При этом какой-либо зависимости уровня экспрессии UCP1 от концентрации норадреналина при рассмотрении независимо от сравнения парных депо мы не выявили ([Рис.3.64, В](#)). Та ким образом, *in vivo* подтверждается гипотеза о том, что для индукции бежевой дифференцировки МСК требуется поступление двух сигналов: системного сигнала адреналина и локального воздействия норадреналина.

А Локальная симпатэктомия

После вскрытия брюшной полости введение гуанетидина в одно из парных депо eWAT 12 инъекций по периметру жирового депо по 3,3 мкл. раствора гуанетидина концентрацией 10 мг/мл



14 дней

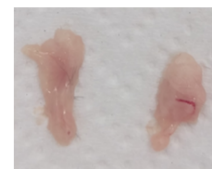
Индукция побурения

Введение C1-316243 внутривнутрибрюшинно 0,1 мг/кг массы тела (объем около 100 мкл на мышшь) ежедневно в течение 7 дней.



7 дней ежедневно

Изоляция жировых депо



Б

	Мышь 1		Мышь 2		Мышь 3	
	Контр	СЭ	Контр	СЭ	Контр	СЭ
Норадреналин, нмоль/г	615	299	2242	309	396	208
UCP1						
Винкулин						
Денситометрия	1.57	0.23	1.10	0.63	3.25	2.65

Рис. 3.64. Эксперимент по проверке гипотезы о необходимости поступления двух сигналов системного и локального для коммитирования МСК в направлении бежевой дифференцировки. А. – Схема эксперимента. Б. – Репрезентативные результаты измерения концентрации норадреналина в парных жировых депо, одно из которых было симпатэктомизировано (синий блок в каждой паре). Ниже представлены соответствующие мембраны вестерн-блоттинг анализа уровня экспрессии UCP1 в этих жировых депо.

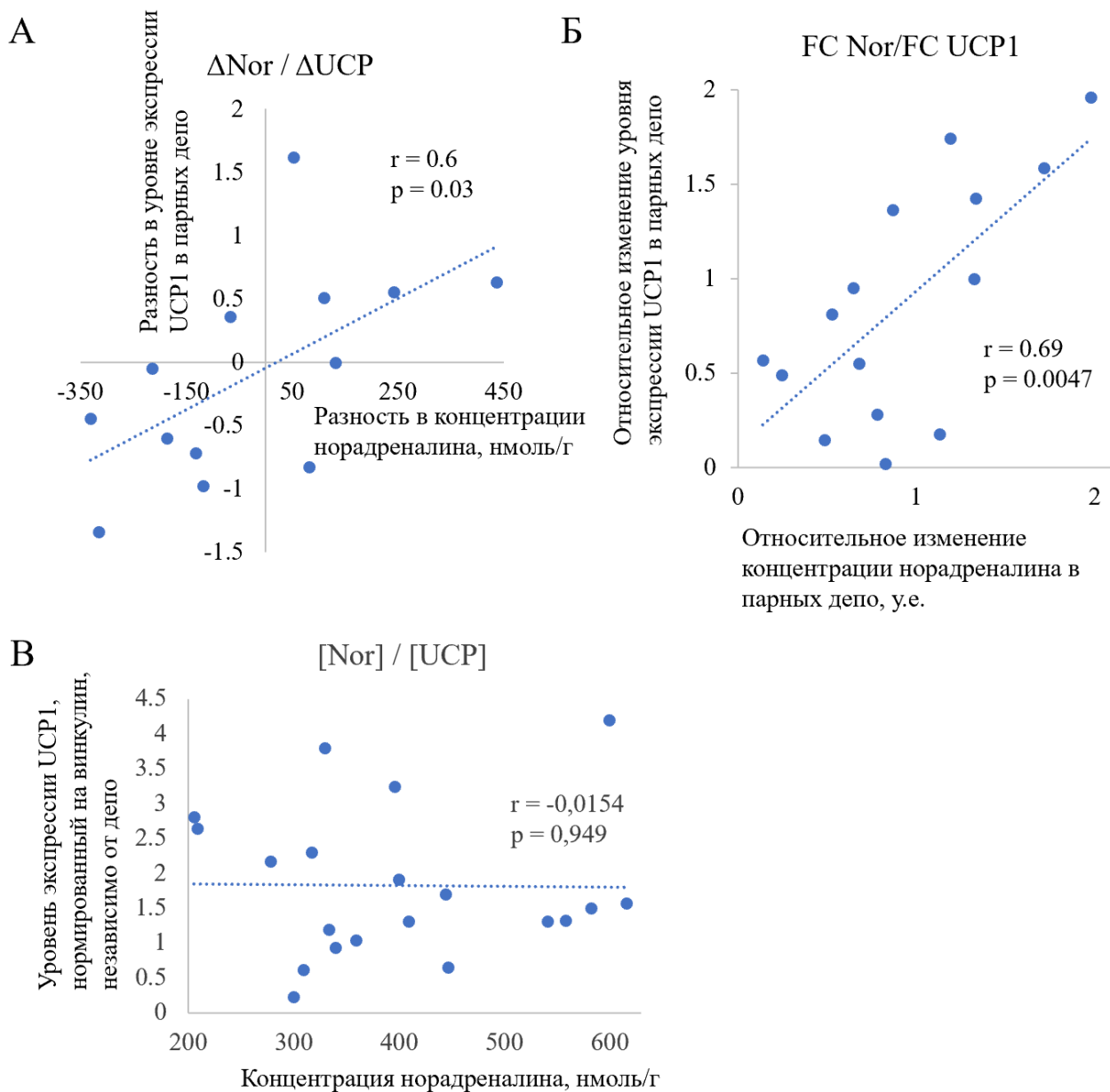


Рис. 3.65. Зависимость уровня экспрессии UCP1 от локальной концентрации норадреналина в парных жировых депо. А. – Зависимость разности в уровне экспрессии UCP1 между парными жировыми депо одного организма от разности в концентрации норадреналина в тех же депо. Б. – Зависимость относительного изменения уровня UCP1 ((экспрессия UCP1_{опыт}) / (экспрессия UCP1_{контроль})) между парными жировыми депо одного организма от соотношения концентраций норадреналина в тех же депо. В. – Зависимость уровня экспрессии UCP1 независимо от жирового депо от абсолютного значения концентрации норадреналина в тех же депо. r – коэффициент корреляции Пирсона, p – вероятность нахождения корреляции там, где ее нет.

4. Заключение

Обобщая полученные в данной работе результаты (см. схему на [Рис. 4.1](#)), можно заключить, что на первом этапе активации МСК переходили в особое функциональное состояние, в котором клетка готова воспринимать сигнал, направляющий ее в дифференцировку. Это транзитное функциональное состояние мы назвали иницированным состоянием. В нем клетки характеризовались измененной восприимчивостью к гормональным стимулам. Например, в нем клетки проявляли тенденцию к снижению чувствительности к агонистам β -адренорецепторов, которые являются ключевыми сенсорами катехоламинов в базальном состоянии. При этом клетки существенно сенситизировались к $\alpha 1$ -агонистам. Это привело к тому, что в таком состоянии МСК по итогу повышали свою чувствительность к норадреналину, но активируемые сигнальные каскады переключались с цАМФ-зависимых на Ca^{2+} -зависимые. Сигналы, переводящие МСК в иницированное состояние по аналогии с эмбриональным развитием, могут характеризоваться как перmissive. Мы показали, что таким перmissive сигналом могла выступать стимуляция $\beta 3$ -адренорецепторов, но, вероятно, существуют и другие перmissive сигналы для МСК. Например, при направлении МСК в дифференцировку в белые адипоциты или же в миофибробласты в профиброзном окружении $\beta 3$ -адренорецепторы не активируются, но клетки переходили в иницированное состояние, из которого далее в дифференцировку.

Далее, находясь в иницированном состоянии, МСК могли воспринять инструктивный сигнал, который и определял итоговое направление дифференцировки. Без получения инструктивного сигнала стволовая клетка возвращалась из иницированного состояния в базальное с возвращением гормональной чувствительности к исходной. Инструктивным сигналом для контрактальной дифференцировки являлась $\alpha 1\text{A}$ -адренорецептор-зависимая

кальциевая сигнализация. Воздействие инсулина на МСК приводило к их дифференцировке в направлении белых адипоцитов. А вот если на клетках, инициированных воздействием β_3 -агониста, сперва простимулировать вышедшие на поверхность α_1A -адренорецепторы, а затем подействовать инсулином, то они коммитировались в направлении бежевых адипоцитов. Эта траектория дифференцировки перекликается с путем коммитирования бурых адипоцитов, которые происходят из миогенных $Muf5^+$ предшественников [202]. Можно предположить, что и в случае бежевой дифференцировки требуется первоначальное коммитирование в направлении контрактильного фенотипа с последующей индукцией адипогенной дифференцировки.

Важный вывод, который можно сделать из полученных результатов, это то, что сигналом для выбора МСК направления дифференцировки являлся не какой-то отдельный гормональный стимул и даже не просто комбинация стимулов, а комбинация стимулов, действующая в определенной последовательности. Если α_1 -агонист действовал перед или даже вместе с β -агонистом, а также с отличным от требуемого временным интервалом, то коммитирования в контрактильный фенотип и в бежевую дифференцировку не происходило, поскольку клетки не успевали пройти инициирование и не успевали наработать α_1A -адренорецепторы. После воздействия каждого предыдущего стимула в требуемой последовательности стволовая клетка меняла свое функциональное состояние, приобретая способность воспринять следующий сигнал.

Таким образом, на ранних этапах активации МСК выбирали направление дифференцировки путем перехода в особое функциональное инициированное состояние, в котором воспринимали инструктивный сигнал. Инструктивным сигналом для МСК являлась комбинация и последовательность подействовавших с определенными временными интервалами гормональных стимулов.

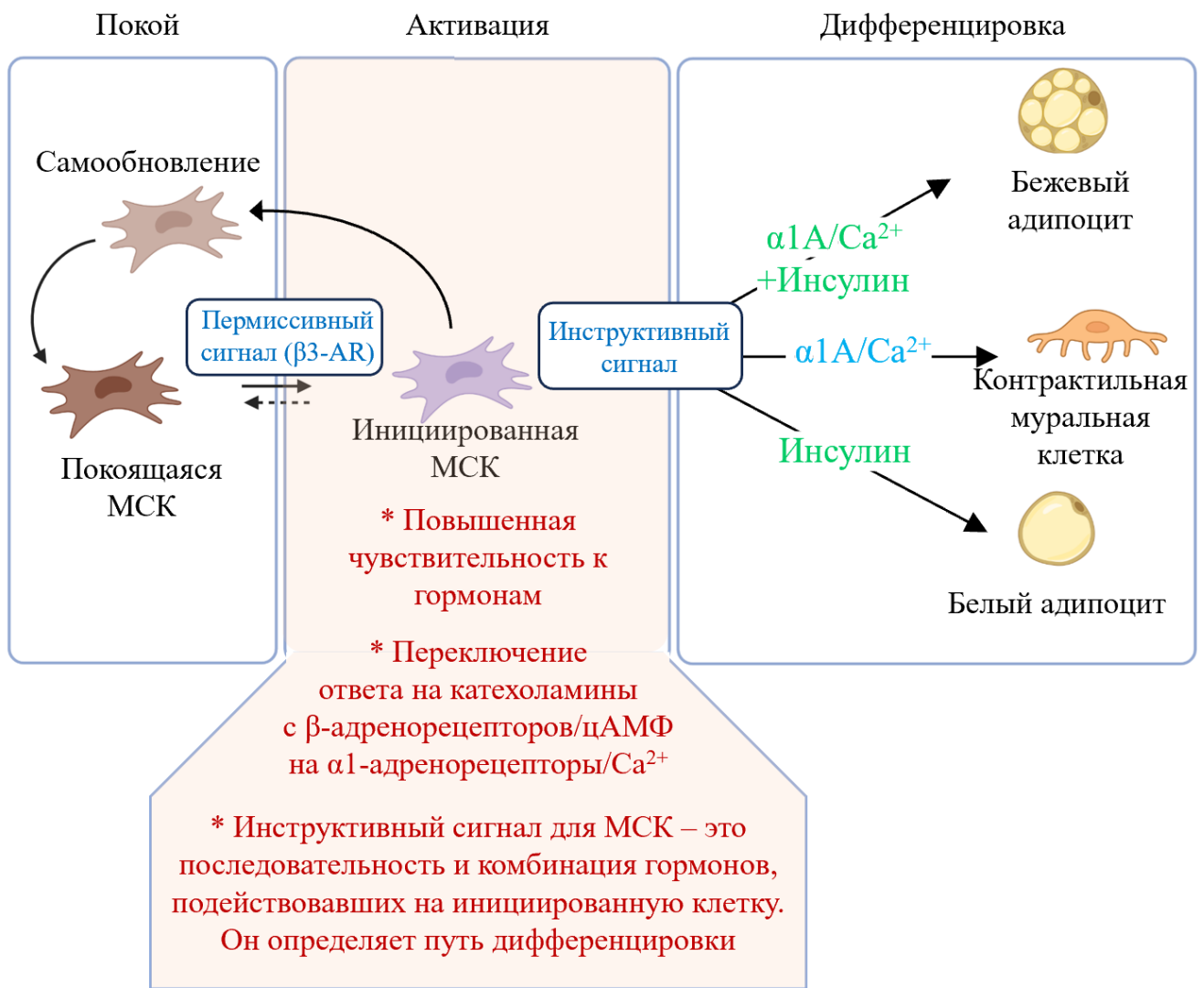


Рис. 4.1. Итоговая схема модели ранних этапов выбора направления дифференцировки МСК.

Выводы

1. Регистрация чувствительности МСК к различным гормонам на уровне одиночных клеток показала, что эти клетки проявляют высокую функциональную гетерогенность как по Ca^{2+} -зависимой, так и по цАМФ-зависимой сигнализации.
2. При стимуляции МСК в сторону адипогенной, контрактальной и фиброзной дифференцировок эти клетки переходят в особое функциональное состояние (инициированное). Анализ РНК-секвенирования на уровне одиночных клеток показал, что у инициированных клеток наблюдается одинаковый транскрипционный профиль вне зависимости от направления последующей дифференцировки (адипогенная, контрактальная или фиброзная). Переход в инициированное состояние транзиторный: уже через 24 часа клетки возвращаются в исходное базальное состояние.
3. В пролиферацию и самообновление МСК направляются также из инициированного состояния. Тромбоцитарный фактор роста усиливает пролиферацию МСК путем редокс-зависимой активации PI3-киназного сигнального каскада и редокс-независимой активации MAP/Erk1/2-зависимого сигнального каскада.
4. Выяснение молекулярных механизмов перехода МСК в инициированное состояние, проведенное на уровне одиночных клеток, показало ключевую роль адренергической регуляции в этом процессе. Стимуляция β 3-адренорецепторов приводит к синтезу цАМФ, активации протеинкиназы А, зависит от трансляции белка, но не связан с активацией неканонического пути действия цАМФ (белок Ерас), а также не зависит от регуляции транскрипции генов. При этом синтезируются и экспонируются на поверхности клетки α 1A-адренорецепторы, что приводит к повышению чувствительности МСК к норадреналину.
5. Дифференцировка МСК в направлении гладкомышечных клеток (контрактальный фенотип) достигается путем β 3-адренорецептор-

зависимой инициации клеток с последующей стимуляцией вышедших на поверхность клеток $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Степень артериальной гипертензии у пациентов, страдающих ожирением, коррелирует со способностью их МСК к повышению чувствительности к норадреналину в ответ на предварительную инкубацию клеток с норадреналином.

6. Дифференцировка МСК в направлении белых адипоцитов также осуществляется через иницированное состояние, однако адренергическая стимуляция МСК путем цАФМ-зависимой стимуляции β -адренорецепторов подавляет это направление дифференцировки. Кроме того, клетки, отвечающие кальций-зависимым образом на действие норадреналина, не дифференцируются в белые адипоциты.
7. В отличие от белых адипоцитов, направление МСК по пути дифференцировки в бежевые адипоциты достигается путем $\beta 3$ -адренорецептор-зависимой инициации клеток с последующей стимуляцией $\alpha 1A$ -адренорецепторов, экспонированных на поверхности МСК, и запуском адипогенной дифференцировки. Клетки, отвечающие кальций-зависимым образом на действие норадреналина, дифференцируются в бежевые адипоциты. При локальной симпатэктомии у мышей одного из парных жировых депо (эпидидимального) с последующей индукцией бежевой дифференцировки при помощи внутрибрюшинного введения $\beta 3$ -агониста получены указания на вклад данного механизма в формирование бежевого жира *in vivo*.

Список литературы

1. Maximow, A., *The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals*. Folia Haematologica, 1909. **8**(3): p. 125-134.
2. Jopling, C., S. Boue, and J.C.I. Belmonte, *Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration*. Nature reviews Molecular cell biology, 2011. **12**(2): p. 79-89.
3. Cornier, M.-A., et al., *The metabolic syndrome*. Endocrine reviews, 2008. **29**(7): p. 777-822.
4. Viswanathan, S., et al., *Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature*. Cytotherapy, 2019. **21**(10): p. 1019-1024.
5. Bourin, P., et al., *Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Cytotherapy, 2013. **15**(6): p. 641-8.
6. Friedenstein, A.J., J. Gorskaja, and N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Experimental hematology, 1976. **4**(5): p. 267-274.
7. Гилберт, С.Ф. and М.Д.Ф. Барреси, *Биология развития*. 12 ed. Vol. 1. 2022: Лаборатория знаний. 803.
8. Giffin, J.L., D. Gaitor, and T.A. Franz-Odenaal, *The forgotten skeletogenic condensations: a comparison of early skeletal development amongst vertebrates*. Journal of developmental biology, 2019. **7**(1): p. 4.

9. Aharonov, A., et al., *ERBB2 drives YAP activation and EMT-like processes during cardiac regeneration*. Nature cell biology, 2020. **22**(11): p. 1346-1356.
10. Liesveld, J.L., N. Sharma, and O.S. Aljitawi, *Stem cell homing: From physiology to therapeutics*. Stem Cells, 2020. **38**(10): p. 1241-1253.
11. Pedersen, R.A., K. Wu, and H. Balakier, *Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection*. Dev Biol, 1986. **117**(2): p. 581-95.
12. Ferrer-Vaquer, A., M. Viotti, and A.-K. Hadjantonakis, *Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo*. Cell adhesion & migration, 2010. **4**(3): p. 447-457.
13. Ryall, J.G., et al., *Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(6): p. 651-662.
14. Rodgers, J.T., et al., *mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert*. Nature, 2014. **510**(7505): p. 393-396.
15. Der Vartanian, A., et al., *PAX3 confers functional heterogeneity in skeletal muscle stem cell responses to environmental stress*. Cell stem cell, 2019. **24**(6): p. 958-973. e9.
16. Oburoglu, L., et al., *Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation*. Curr Opin Hematol, 2016. **23**(3): p. 198-205.
17. Encinas, J.M., et al., *Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell stem cell, 2011. **8**(5): p. 566-579.
18. Song, J., et al., *Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 150-154.
19. Clayton, E., et al., *A single type of progenitor cell maintains normal epidermis*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 185-189.
20. Leushacke, M., et al., *Lgr5+ gastric stem cells divide symmetrically to effect epithelial homeostasis in the pylorus*. Cell reports, 2013. **5**(2): p. 349-356.

21. Tata, P.R., et al., *Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo*. *Nature*, 2013. **503**(7475): p. 218-223.
22. Stange, D.E., et al., *Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 357-368.
23. Clevers, H., *What is an adult stem cell?* *Science*, 2015. **350**(6266): p. 1319-1320.
24. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. *Annual review of physiology*, 2013. **75**: p. 685-705.
25. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(20): p. 9363-9367.
26. Young, A.R. and M. Narita, *SASP reflects senescence*. *EMBO reports*, 2009. **10**(3): p. 228-230.
27. Kopp, J.L., M. Grompe, and M. Sander, *Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration*. *Nature cell biology*, 2016. **18**(3): p. 238-245.
28. Raj, A. and A. Van Oudenaarden, *Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences*. *Cell*, 2008. **135**(2): p. 216-226.
29. Sunadome, K., et al., *Antagonism between the master regulators of differentiation ensures the discreteness and robustness of cell fates*. *Molecular cell*, 2014. **54**(3): p. 526-535.
30. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor*. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1147-1156.
31. Bäckdahl, J., et al., *Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin*. *Cell metabolism*, 2021. **33**(9): p. 1869-1882. e6.
32. Merrick, D., et al., *Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue*. *Science*, 2019. **364**(6438).

33. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
34. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell metabolism, 2006. **4**(4): p. 263-273.
35. Wu, Z., et al., *Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Molecular cell, 1999. **3**(2): p. 151-158.
36. Chen, Q., et al., *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?* Cell Death & Differentiation, 2016. **23**(7): p. 1128-1139.
37. Huang, H. and D.J. Tindall, *Dynamic FoxO transcription factors*. Journal of cell science, 2007. **120**(15): p. 2479-2487.
38. Bennett, C.N., et al., *Regulation of Wnt signaling during adipogenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30998-1004.
39. Yeh, W.C., et al., *Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins*. Genes Dev, 1995. **9**(2): p. 168-81.
40. Zhang, J.-W., et al., *Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein β gene during adipogenesis*. Journal of biological chemistry, 2004. **279**(6): p. 4471-4478.
41. Tzamelis, I., et al., *Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 36093-102.
42. Wu, Z., N.L. Bucher, and S.R. Farmer, *Induction of peroxisome proliferator-activated receptor γ during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP β , C/EBP δ , and glucocorticoids*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(8): p. 4128-4136.
43. Быков, В.Л., *Цитология и общая гистология*. Функциональная морфология клеток и тканей человека. Учеб. для ст. мед. инст. С-Пб.: Сотис, 2002. **520**.

44. Perry, R.L. and M.A. Rudnick, *Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation*. *Frontiers in Bioscience-landmark*, 2000. **5**(3): p. 750-767.
45. Jang, K.-J., et al., *Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates*. *Nature communications*, 2015. **6**(1): p. 6750.
46. Levine, A.J. and A.H. Brivanlou, *Proposal of a model of mammalian neural induction*. *Developmental biology*, 2007. **308**(2): p. 247-256.
47. Kumar, M., et al., *Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate*. *Developmental biology*, 2003. **259**(1): p. 109-122.
48. Ahmed, M. and C. Ffrench-Constant, *Extracellular matrix regulation of stem cell behavior*. *Current stem cell reports*, 2016. **2**: p. 197-206.
49. Martin, K.L. and H.J. Leese, *Role of glucose in mouse preimplantation embryo development*. *Mol Reprod Dev*, 1995. **40**(4): p. 436-43.
50. Houghton, F.D., et al., *Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo*. *Mol Reprod Dev*, 1996. **44**(4): p. 476-85.
51. Prigione, A. and J. Adjaye, *Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(11-12): p. 1729-41.
52. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 598-611.
53. Нимирицкий, П., et al., *НИША СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ*. *Цитология*, 2018. **60**(8).
54. Meacham, C.E., A.W. DeVilbiss, and S.J. Morrison, *Metabolic regulation of somatic stem cells in vivo*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022. **23**(6): p. 428-443.
55. Kim, H.J., et al., *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 34-42.

56. Inoue, J., et al., *Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(5): p. 1157-61.
57. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 255-66.
58. Wellen, K.E., et al., *ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1076-80.
59. Ryall, J.G., *The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012. **15**(6): p. 561-6.
60. Canto, C., K.J. Menzies, and J. Auwerx, *NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus*. *Cell Metab*, 2015. **22**(1): p. 31-53.
61. Rivera, L.B. and G. Bergers, *Angiogenesis. Targeting vascular sprouts*. *Science*, 2014. **344**(6191): p. 1449-50.
62. Schieke, S.M., et al., *Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(42): p. 28506-12.
63. Mandal, S., et al., *Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2011. **29**(3): p. 486-495.
64. Scott, M.A., et al., *Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. *Stem cells and development*, 2011. **20**(10): p. 1793-1804.
65. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. *Stem cell research & therapy*, 2013. **4**(5): p. 1-7.
66. Kim, W., et al., *RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(46): p. 16389-16394.

67. Bhaskar, B., et al., *Role of signaling pathways in mesenchymal stem cell differentiation*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014. **9**(6): p. 508-512.
68. Новоселецкая, Е., et al., *Внеклеточный матрикс в регуляции дифференцировки стволовых клеток*. *Биохимия*, 2019. **84**(3): p. 343-353.
69. Egeblad, M., M.G. Rasch, and V.M. Weaver, *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. *Current opinion in cell biology*, 2010. **22**(5): p. 697-706.
70. Yurchenco, P.D., *Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011. **3**(2): p. a004911.
71. Fujiwara, H., et al., *The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche*. *Cell*, 2011. **144**(4): p. 577-589.
72. Miner, J.H. and P.D. Yurchenco, *Laminin functions in tissue morphogenesis*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2004. **20**: p. 255-284.
73. Rodin, S., et al., *Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment*. *Nature communications*, 2014. **5**(1): p. 3195.
74. Morgner, J., et al., *Integrin-linked kinase regulates the niche of quiescent epidermal stem cells*. *Nature communications*, 2015. **6**(1): p. 8198.
75. Olaniru, O.E. and S.J. Persaud, *Adhesion G-protein coupled receptors: Implications for metabolic function*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019. **198**: p. 123-134.
76. Brizzi, M.F., G. Tarone, and P. Defilippi, *Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche*. *Current opinion in cell biology*, 2012. **24**(5): p. 645-651.
77. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. *Blood cells*, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
78. Donnelly, H., M. Salmeron-Sanchez, and M.J. Dalby, *Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal*. *Journal of the Royal Society Interface*, 2018. **15**(145): p. 20180388.

79. Sugimura, R., et al., *Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche*. *Cell*, 2012. **150**(2): p. 351-365.
80. Zhao, M., et al., *N-cadherin-expressing bone and marrow stromal progenitor cells maintain reserve hematopoietic stem cells*. *Cell reports*, 2019. **26**(3): p. 652-669. e6.
81. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. *Nature Reviews Immunology*, 2006. **6**(2): p. 93-106.
82. Kalinina, N., et al., *Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes*. *Stem Cell Res Ther*, 2015. **6**: p. 221.
83. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
84. He, X.C., et al., *BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling*. *Nature genetics*, 2004. **36**(10): p. 1117-1121.
85. Goldman, D.C., et al., *BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2009. **114**(20): p. 4393-4401.
86. Muroyama, Y., H. Kondoh, and S. Takada, *Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004. **313**(4): p. 915-921.
87. Pinto, D. and H. Clevers, *Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium*. *Experimental cell research*, 2005. **306**(2): p. 357-363.
88. Pires, A.O., et al., *Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis*. *Stem cells and development*, 2016. **25**(14): p. 1073-1083.
89. Fang, S., et al., *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the*

- transforming growth factor- β /SMAD2 pathway during wound healing*. Stem cells translational medicine, 2016. **5**(10): p. 1425-1439.
90. Nakamura, Y., et al., *Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration*. FEBS letters, 2015. **589**(11): p. 1257-1265.
 91. Watt, F.M. and W.T. Huck, *Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate*. Nature reviews Molecular cell biology, 2013. **14**(8): p. 467-473.
 92. Gilbert, P.M., et al., *Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture*. Science, 2010. **329**(5995): p. 1078-1081.
 93. Tetteh, P.W., et al., *Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters*. Cell stem cell, 2016. **18**(2): p. 203-213.
 94. Simsek, T., et al., *The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 380-90.
 95. Ito, K., et al., *A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1350-8.
 96. Kulebyakin, K.Y., P.P. Nimiritsky, and P.I. Makarevich, *Growth factors in regeneration and regenerative medicine: "the cure and the cause"*. Frontiers in Endocrinology, 2020. **11**.
 97. Yamazaki, K. and T.D. Allen, *Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: The "neuro-reticular complex"*. American Journal of Anatomy, 1990. **187**(3): p. 261-276.
 98. Muller-Sieburg, C.E., et al., *Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4111-4118.
 99. Benz, C., et al., *Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs*. Cell stem cell, 2012. **10**(3): p. 273-283.

100. Challen, G.A., et al., *Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells*. *Cell stem cell*, 2014. **15**(3): p. 350-364.
101. Goodell, M.A., H. Nguyen, and N. Shroyer, *Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2015. **16**(5): p. 299-309.
102. Dykstra, B., et al., *Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo*. *Cell stem cell*, 2007. **1**(2): p. 218-229.
103. Sun, J., et al., *Clonal dynamics of native haematopoiesis*. *Nature*, 2014. **514**(7522): p. 322-327.
104. Rompolas, P., K.R. Mesa, and V. Greco, *Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate*. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 513-518.
105. Hsu, Y.-C., H.A. Pasolli, and E. Fuchs, *Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle*. *Cell*, 2011. **144**(1): p. 92-105.
106. Relaix, F., et al., *Perspectives on skeletal muscle stem cells*. *Nature communications*, 2021. **12**(1): p. 692.
107. Ferrero, R., P. Rainer, and B. Deplancke, *Toward a consensus view of mammalian adipocyte stem and progenitor cell heterogeneity*. *Trends in Cell Biology*, 2020. **30**(12): p. 937-950.
108. Schwalie, P.C., et al., *A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots*. *Nature*, 2018. **559**(7712): p. 103-108.
109. Danielyan, L., et al., *Cell motility and migration as determinants of stem cell efficacy*. *EBioMedicine*, 2020. **60**.
110. Caplan, A.I., *New MSC: MSCs as pericytes are sentinels and gatekeepers*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2017. **35**(6): p. 1151-1159.
111. Gurevich, V.V. and E.V. Gurevich, *GPCR signaling regulation: the role of GRKs and arrestins*. *Frontiers in pharmacology*, 2019. **10**: p. 125.
112. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 206-212.
113. Lin, F., H.-y. Wang, and C.C. Malbon, *Gravin-mediated formation of signaling complexes in β 2-adrenergic receptor desensitization and*

- resensitization*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(25): p. 19025-19034.
114. Ferrandon, S., et al., *Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis*. Nature Chemical Biology, 2009. **5**(10): p. 734.
115. Wehbi, V.L., et al., *Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gbetagamma complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1530-5.
116. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
117. Feinstein, T.N., et al., *Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors*. Nature chemical biology, 2011. **7**(5): p. 278-284.
118. Pignolo, R.J., et al., *Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(11): p. 2647-2655.
119. Daaka, Y., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, *Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 88-91.
120. Hajifathali, A., et al., *The role of catecholamines in mesenchymal stem cell fate*. Cell and tissue research, 2014. **358**(3): p. 651-665.
121. Kitamura, T., et al., *Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**(9): p. 6286-6296.
122. Broadbent, D., et al., *Roles of NHERF family of PDZ-binding proteins in regulating GPCR functions*. Advances in immunology, 2017. **136**: p. 353-385.
123. Wang, B., et al., *Na/H exchanger regulatory factors control parathyroid hormone receptor signaling by facilitating differential activation of Ga*

- protein subunits*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(35): p. 26976-26986.
124. Luttrell, L.M., et al., *Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2449-54.
125. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction*. Trends in pharmacological sciences, 2011. **32**(9): p. 521-533.
126. Peterson, Y.K. and L.M. Luttrell, *The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling*. Pharmacol Rev, 2017. **69**(3): p. 256-297.
127. Perry, S.J., et al., *Targeting of cyclic AMP degradation to β 2-adrenergic receptors by β -arrestins*. Science, 2002. **298**(5594): p. 834-836.
128. Luttrell, L.M. and D. Gesty-Palmer, *Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling*. Pharmacological reviews, 2010. **62**(2): p. 305-330.
129. Riedel, K., et al., *Estrogen determines sex differences in adrenergic vessel tone by regulation of endothelial β -adrenoceptor expression*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2019. **317**(2): p. H243-H254.
130. Yildiz, O., J. Smith, and R. Purdy, *Serotonin and vasoconstrictor synergism*. Life sciences, 1998. **62**(19): p. 1723-1732.
131. Isern, J. and S. Mendez-Ferrer, *Stem cell interactions in a bone marrow niche*. Curr Osteoporos Rep, 2011. **9**(4): p. 210-8.
132. Pauklin, S. and L. Vallier, *The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity*. Cell, 2013. **155**(1): p. 135-147.
133. Dalton, S., *Linking the cell cycle to cell fate decisions*. Trends in cell biology, 2015. **25**(10): p. 592-600.

134. Thomson, I., et al., *The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1*. *Current biology*, 2004. **14**(2): p. 166-172.
135. Tumber, T. and A.S. Belmont, *Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator*. *Nature cell biology*, 2001. **3**(2): p. 134-139.
136. Singh, A.M., et al., *Cell-cycle control of developmentally regulated transcription factors accounts for heterogeneity in human pluripotent cells*. *Stem cell reports*, 2013. **1**(6): p. 532-544.
137. Ali, F., et al., *Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis*. *Development*, 2011. **138**(19): p. 4267-4277.
138. Ning, K., et al., *Functional heterogeneity of bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations in physiology and pathology*. *International journal of molecular sciences*, 2022. **23**(19): p. 11928.
139. Shen, B., et al., *A mechanosensitive peri-arteriolar niche for osteogenesis and lymphopoiesis*. *Nature*, 2021. **591**(7850): p. 438-444.
140. Severe, N., et al., *Stress-induced changes in bone marrow stromal cell populations revealed through single-cell protein expression mapping*. *Cell Stem Cell*, 2019. **25**(4): p. 570-583. e7.
141. Duchamp de Lageneste, O., et al., *Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin*. *Nature communications*, 2018. **9**(1): p. 773.
142. Baccin, C., et al., *Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization*. *Nature cell biology*, 2020. **22**(1): p. 38-48.
143. Mo, C., et al., *Single-cell transcriptomics of LepR-positive skeletal cells reveals heterogeneous stress-dependent stem and progenitor pools*. *The EMBO Journal*, 2022. **41**(4): p. e108415.

144. Buettmann, E.G., et al., *VEGFA from early osteoblast lineage cells (Osterix+) is required in mice for fracture healing*. Journal of Bone and Mineral Research, 2019. **34**(9): p. 1690-1706.
145. Collette, N.M., et al., *Sostdc1 deficiency accelerates fracture healing by promoting the expansion of periosteal mesenchymal stem cells*. Bone, 2016. **88**: p. 20-30.
146. Roff, D., *Spatial heterogeneity and the persistence of populations*. Oecologia, 1974. **15**: p. 245-258.
147. Oliver, T., et al., *Heterogeneous landscapes promote population stability*. Ecology letters, 2010. **13**(4): p. 473-484.
148. Калинина, Н., et al., *Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей*. Acta Naturae, 2011. **3**(4).
149. Murray, I.R., et al., *Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(8): p. 1353-74.
150. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*. Acta Naturae, 2012. **4**(1): p. 23-31.
151. Lopatina, T., et al., *Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential*. Cell Commun Signal, 2014. **12**: p. 26.
152. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
153. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
154. Wang, J., et al., *Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine*. Tissue and cell, 2020. **64**: p. 101330.

155. Sagaradze, G.D., et al., *Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020. **8**: p. 576176.
156. Najar, M., et al., *Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells*. *Cytotherapy*, 2016. **18**(2): p. 160-171.
157. Rubtsov, Y., et al., *Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1*. *Stem Cells International*, 2017. **2017**.
158. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis research & therapy*, 2007. **9**: p. 1-10.
159. Fraser, J.K., et al., *Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes*. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2006. **3**(Suppl 1): p. S33-S37.
160. Fu, Y.-S., et al., *Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro*. *Journal of biomedical science*, 2004. **11**: p. 652-660.
161. Karp, J.M. and G.S.L. Teo, *Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details*. *Cell stem cell*, 2009. **4**(3): p. 206-216.
162. Naji, A., et al., *Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019. **76**(17): p. 3323-3348.
163. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells: time to change the name!* *Stem cells translational medicine*, 2017. **6**(6): p. 1445-1451.
164. Bhartiya, D., *The need to revisit the definition of mesenchymal and adult stem cells based on their functional attributes*. *Stem cell research & therapy*, 2018. **9**(1): p. 1-3.
165. Zannettino, A., et al., *Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo*. *Journal of cellular physiology*, 2008. **214**(2): p. 413-421.

166. Shi, S. and S. Gronthos, *Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp*. Journal of bone and mineral research, 2003. **18**(4): p. 696-704.
167. Dellavalle, A., et al., *Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells*. Nature cell biology, 2007. **9**(3): p. 255-267.
168. Rouget, C., *Memoire sur les development, la structure et la proprietes physiologiques des capillaires sanguines et lymphatiques*. Arch Physiol, 1873: p. 603-663.
169. Zimmermann, K.W., *Der feinere bau der blutcapillaren*. Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 1923. **68**: p. 29-109.
170. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
171. Supakul, S., et al., *Pericytes as a source of osteogenic cells in bone fracture healing*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(5): p. 1079.
172. Corselli, M., et al., *The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells*. Stem cells and development, 2012. **21**(8): p. 1299-1308.
173. Pattappa, G., et al., *The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation*. J Cell Physiol, 2011. **226**(10): p. 2562-70.
174. Mylotte, L.A., et al., *Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment*. Stem Cells, 2008. **26**(5): p. 1325-36.
175. Liu, Y. and T. Ma, *Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application*. Biotechnol Prog, 2015. **31**(2): p. 468-81.
176. Hsu, Y.C., et al., *Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: From cellular differentiation to mitochondrial transfer*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **52**: p. 119-31.
177. Palomaki, S., et al., *HIF-1alpha is upregulated in human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2013. **31**(9): p. 1902-9.

178. Рылова, Ю., et al., *Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток in vitro*. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2012(3): p. 148-151.
179. Zhang, Y., et al., *Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. PLoS ONE, 2013. **8**(10): p. e77077.
180. Chen, C.T., et al., *Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 960-968.
181. Shum, L.C., et al., *Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation*. Stem Cells Dev, 2016. **25**(2): p. 114-22.
182. Mushahary, D., et al., *Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells*. Cytometry Part A, 2018. **93**(1): p. 19-31.
183. Grigorieva, O., et al., *Novel Potential Markers of Myofibroblast Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing Analysis of Mesenchymal Stromal Cells in Profibrotic and Adipogenic Conditions*. Biomedicines, 2023. **11**(3): p. 840.
184. Hao, Y., et al., *Integrated analysis of multimodal single-cell data*. Cell, 2021. **184**(13): p. 3573-3587. e29.
185. Waltman, L. and N.J. Van Eck, *A smart local moving algorithm for large-scale modularity-based community detection*. The European physical journal B, 2013. **86**: p. 1-14.
186. Raudvere, U., et al., *g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)*. Nucleic acids research, 2019. **47**(W1): p. W191-W198.
187. La Manno, G., et al., *RNA velocity of single cells*. Nature, 2018. **560**(7719): p. 494-498.
188. Bergen, V., et al., *Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling*. Nature biotechnology, 2020. **38**(12): p. 1408-1414.

189. Saelens, W., et al., *A comparison of single-cell trajectory inference methods*. Nature biotechnology, 2019. **37**(5): p. 547-554.
190. Wolf, F.A., et al., *PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells*. Genome biology, 2019. **20**(1): p. 1-9.
191. Aibar, S., et al., *SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering*. Nature methods, 2017. **14**(11): p. 1083-1086.
192. Ngo, P., et al., *Collagen gel contraction assay*. Cell-Cell Interactions, 2006: p. 103-109.
193. Ragni, E., et al., *What is beyond aq RT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes*. Journal of cellular and molecular medicine, 2013. **17**(1): p. 168-180.
194. Longo, P.A., et al., *Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)*, in *Methods in Enzymology*. 2013, Elsevier. p. 227-240.
195. Becker, T., D.H. Rapoport, and A.M. Mamlouk, *Adaptive Mitosis Detection in Large in vitro Stem Cell Populations using Timelapse Microscopy*. Bildverarbeitung für die Medizin 2011, 2011: p. 49-53.
196. Zhang, Q., et al., *Visualizing Dynamics of Cell Signaling In Vivo with a Phase Separation-Based Kinase Reporter*. Mol Cell, 2018. **69**(2): p. 347.
197. Kotova, P.D., et al., *Coupling of P2Y receptors to Ca²⁺ mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue*. Cell Calcium, 2018. **71**: p. 1-14.
198. Demas, G.E., Bartness, T.J., *Novel method for localized, functional sympathetic nervous system denervation of peripheral tissue using guanethidine*. Journal of Neuroscience Methods, 2001. **112**: p. 21-28.
199. Russell, K.C., et al., *Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(11): p. 2716-26.

200. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. Journal of cell science, 2000. **113**(7): p. 1161-1166.
201. Ylöstalo, J., N. Bazhanov, and D.J. Prockop, *Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies*. Experimental hematology, 2008. **36**(10): p. 1390-1402.
202. Rodgers, A. and A.N. Sferruzzi-Perri, *Developmental programming of offspring adipose tissue biology and obesity risk*. International Journal of Obesity, 2021. **45**(6): p. 1170-1192.
203. Hiew, V.V., S.F.B. Simat, and P.L. Teoh, *The advancement of biomaterials in regulating stem cell fate*. Stem Cell Reviews and Reports, 2018. **14**: p. 43-57.
204. Kulebyakina, M., et al., *Balance between Pro-and Antifibrotic Proteins in Mesenchymal Stromal Cell Secretome Fractions Revealed by Proteome and Cell Subpopulation Analysis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **25**(1): p. 290.
205. Marinkovic, M., et al., *Native extracellular matrix, synthesized ex vivo by bone marrow or adipose stromal cells, faithfully directs mesenchymal stem cell differentiation*. Matrix Biology Plus, 2020. **8**: p. 100044.
206. Singh, A., et al., *Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells*. European Journal of Cell Biology, 2019. **98**(2-4): p. 65-73.
207. Kuhn, N.Z. and R.S. Tuan, *Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis*. Journal of cellular physiology, 2010. **222**(2): p. 268-277.
208. Altenhofer, S., et al., *Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(5): p. 406-27.
209. Viau, A.T., et al., *Safety evaluation of free radical scavengers PEG-catalase and PEG-superoxide dismutase*. J Free Radic Biol Med, 1986. **2**(4): p. 283-8.

210. Jones, S.M. and A. Kazlauskas, *Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 165-72.
211. Plotnikov, A., et al., *The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(9): p. 1619-33.
212. Li, H., et al., *Beta-adrenergic signals regulate adipogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA pathway*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **323**(2): p. 201-7.
213. Li, H., et al., *beta2- and beta3-, but not beta1-adrenergic receptors are involved in osteogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA signaling*. Arch Biochem Biophys, 2010. **496**(2): p. 77-83.
214. Cottingham, C., et al., *Genetic variations of alpha2-adrenergic receptors illuminate the diversity of receptor functions*. Current topics in membranes, 2011. **67**: p. 161-190.
215. Dorn, G.W., 2nd, et al., *Alpha 2A-adrenergic receptor stimulated calcium release is transduced by Gi-associated G(beta gamma)-mediated activation of phospholipase C*. Biochemistry, 1997. **36**(21): p. 6415-23.
216. von Zastrow, M., *Endocytosis and downregulation of G protein-coupled receptors*. Parkinsonism Relat Disord, 2001. **7**(3): p. 265-271.
217. Zeiders, J.L., et al., *Ontogeny of cardiac beta-adrenoceptor desensitization mechanisms: agonist treatment enhances receptor/G-protein transduction rather than eliciting uncoupling*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(2): p. 413-23.
218. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
219. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
220. Ellis-Davies, G.C., *Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology*. Nature methods, 2007. **4**(8): p. 619-628.
221. Wallukat, G., *The beta-adrenergic receptors*. Herz, 2002. **27**(7): p. 683-90.

222. Fujinaga, M. and J.C. Scott, *Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes and beta adrenoceptor subtypes during rat embryogenesis*. *Neurosci Lett*, 1997. **231**(2): p. 108-12.
223. Slotkin, T.A., J.T. Auman, and F.J. Seidler, *Ontogenesis of beta-adrenoceptor signaling: implications for perinatal physiology and for fetal effects of tocolytic drugs*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **306**(1): p. 1-7.
224. Rudner, X.L., et al., *Subtype specific regulation of human vascular $\alpha 1$ -adrenergic receptors by vessel bed and age*. *Circulation*, 1999. **100**(23): p. 2336-2343.
225. Piasecik, M.T. and D.M. Perez, *$\alpha 1$ -Adrenergic receptors: new insights and directions*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001. **298**(2): p. 403-410.
226. Hildreth, A.D., et al., *Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity*. *Nature immunology*, 2021. **22**(5): p. 639-653.
227. Podzolkov, V.I., N.N. Nebieridze, and T.A. Safronova, *Transforming growth factor- $\beta 1$, arterial stiffness and vascular age in patients with uncontrolled arterial hypertension*. *Heart, Lung and Circulation*, 2021. **30**(11): p. 1769-1777.
228. Mack, C.P., *Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011. **31**(7): p. 1495-1505.
229. Kalil, G.Z. and W.G. Haynes, *Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications*. *Hypertension Research*, 2012. **35**(1): p. 4-16.
230. Grassi, G., et al., *Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives*. *Journal of hypertension*, 2004. **22**(12): p. 2363-2369.

231. Kotchen, T.A., *Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management*. American journal of hypertension, 2010. **23**(11): p. 1170-1178.
232. Кобалава, Ж., et al., *Артериальная гипертензия у взрослых. Клинические рекомендации 2020*. Российский кардиологический журнал, 2020(3): p. 149-218.
233. Williams, B., et al., *2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension*. Blood pressure, 2018. **27**(6): p. 314-340.
234. López-Jaramillo, P., et al., *The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes*. Hormone molecular biology and clinical investigation, 2014. **18**(1): p. 37-45.
235. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.
236. Salans, L.B., S.W. Cushman, and R.E. Weismann, *Studies of Human Adipose Tissue adipose cell size and number in nonobese and obese patients*. The Journal of clinical investigation, 1973. **52**(4): p. 929-941.
237. Pausova, Z., et al., *A genealogical study of essential hypertension with and without obesity in French Canadians*. Obesity research, 2002. **10**(6): p. 463-470.
238. Dessy, C. and J.-L. Balligand, *Beta3-adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues: emerging concepts and therapeutic perspectives*. Advances in pharmacology, 2010. **59**: p. 135-163.
239. Michel, L.Y., C. Farah, and J.-L. Balligand, *The Beta3 adrenergic receptor in healthy and pathological cardiovascular tissues*. Cells, 2020. **9**(12): p. 2584.
240. Ruffolo, R., et al., *Alpha and beta adrenergic effects of the stereoisomers of dobutamine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1981. **219**(2): p. 447-452.

241. Waldeck, B., “*The β 1-selective adrenoceptor agonist dobutamine*”: *A fallacy being perpetuated*. Chirality, 2011. **23**(1): p. 63-64.
242. Rødland, L., et al., *The β 3 adrenergic receptor antagonist L-748,337 attenuates dobutamine-induced cardiac inefficiency while preserving inotropy in anesthetized pigs*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 2021. **26**(6): p. 714-723.
243. Robey, P., “*Mesenchymal stem cells*”: *fact or fiction, and implications in their therapeutic use*. F1000Research, 2017. **6**.
244. Durandt, C., et al., *Novel flow cytometric approach for the detection of adipocyte subpopulations during adipogenesis [S]*. Journal of lipid research, 2016. **57**(4): p. 729-742.
245. Dempersmier, J., et al., *Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat*. Mol Cell, 2015. **57**(2): p. 235-46.
246. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. Trends in biochemical sciences, 2000. **25**(7): p. 319-324.
247. Young, P., J.R. Arch, and M. Ashwell, *Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse*. FEBS Lett, 1984. **167**(1): p. 10-4.
248. Cousin, B., et al., *Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 4): p. 931-42.
249. Ghorbani, M. and J. Himms-Hagen, *Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats*. International journal of obesity, 1997. **21**(6): p. 465-475.
250. Dronjak, S., et al., *Effects of noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors on pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullar system of adult rats*. Neuro Endocrinol Lett, 2007. **28**(5): p. 614-20.
251. Ritter, J.M., et al., *Rang & Dale's pharmacology*. Ninth Edition ed. 2020: Elsevier Health Sciences.

252. Contreras, G.A., et al., *Inducible brown adipocytes in subcutaneous inguinal white fat: the role of continuous sympathetic stimulation*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. **307**(9): p. E793-9.
253. Thoenen, H. and J. Tranzer, *Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine*. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 1968. **261**: p. 271-288.

Приложения

Приложение 1. Данные о пациентах, жировая ткань из которых использовалась в экспериментах по контрактильной дифференцировке МСК

№	Этничность	Возраст (лет)	ИМТ (kg/m ²)	Пол	Инфекционные болезни
1	Европеоид	50	32.96	М	-
2	Европеоид	45	34.26	М	-
3	Европеоид	38	30.19	М	-
4	Европеоид	39	33.00	М	-
5	Европеоид	28	33.00	М	-
6	Европеоид	38	30.00	М	-
7	Европеоид	56	31.56	М	-
8	Европеоид	62	32.95	М	-
9	Европеоид	38	38.51	М	-
10	Европеоид	47	35.32	Ж	-
11	Европеоид	63	25.00	Ж	-
12	Европеоид	51	31.51	М	-
13	Европеоид	42	32.00	Ж	-
14	Европеоид	26	25.00	М	-
15	Европеоид	73	44.00	Ж	-
16	Европеоид	49	25.00	М	-

17	Европеоид	50	31.21	М	-
18	Европеоид	41	26.00	М	-
19	Европеоид	30	29.00	Ж	-
20	Европеоид	39	24.31	М	-
21	Европеоид	27	20.80	Ж	-
22	Европеоид	34	24.00	Ж	-
23	Европеоид	36	23.00	М	-
24	Европеоид	55	25.61	Ж	-
25	Европеоид	35	30.00	Ж	-
26	Европеоид	36	22.22	М	-
27	Европеоид	30	25.00	Ж	-
	Mean	42.89	29.46		
	SEM	1.98	0.90		

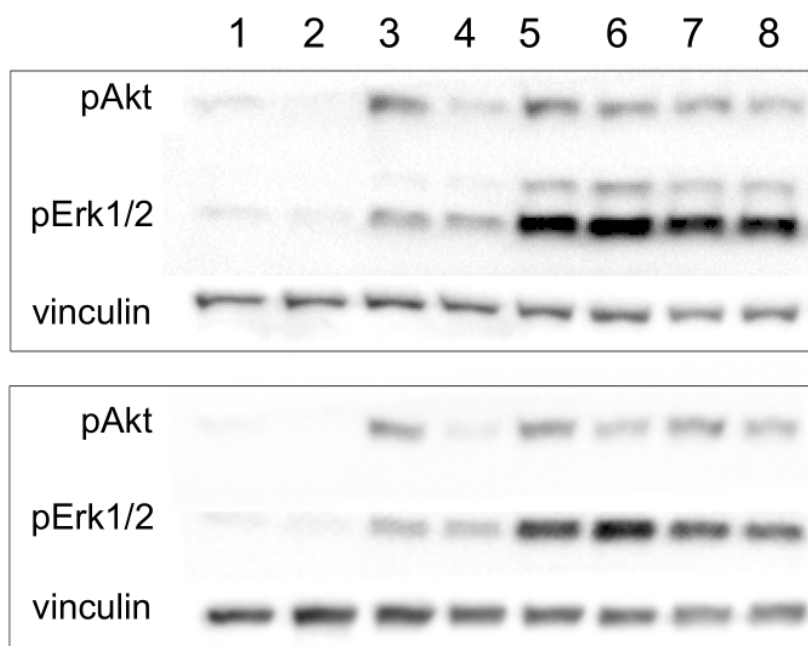
Приложение 2. Данные о пациентах, жировая ткань из которых использовалась в экспериментах по выяснению механизмов инициации МСК и регуляции адипогенной дифференцировки МСК (пропущенные ячейки означают, что эти данные не были предоставлены хирургами).

№	Этничность	Возраст (лет)	ИМТ (kg/m ²)	Пол	Диагноз
1	Европеоид	31	25	М	Грыжа
2	Европеоид	27	24	М	Пузырно-толстокишечный свищ, пузырно-холедохеальный свищ, калькулезный холецистит
3	Европеоид	65	21	Ж	Грыжа белой линии живота
4	Европеоид	74		Ж	
5	Европеоид	40	25	Ж	Здорова
6	Европеоид	83	21	М	Аденома простаты. Камни мочевого пузыря
7	Европеоид	56	23	М	Паховая грыжа
8	Европеоид	62	24	М	Пупочная грыжа неущемленная
9	Европеоид	68	24	М	аденома простаты, хронический простатит вне обострения
10	Европеоид	82	24	М	аденома простаты, хронический простатит вне обострения
11	Европеоид	81	23	Ж	аденома простаты, хронический простатит вне обострения. Камень мочевого пузыря.
12	Европеоид	27	20	Ж	пупочная грыжка, диастаз прямых мышц живота
13	Европеоид	63	25	Ж	Послеопер вентр грыжа, после холицистектомии, резекции сегм. Печени, сахарн диабет 2 типа среднетяж формы, субкомпенсация
14	Европеоид	35	31	Ж	

15	Европеоид	68	28	Ж	грыжа передней брюшной стенки без непроходимости или гангрены
16	Европеоид	38	31	М	Пупочная грыжа без непроходимости или гангрены
17	Европеоид	38		М	осторонняя или неуточненная паховая грыжа без непроходимости или гангрены
18	Европеоид	30	25	Ж	диастаз прямых мышц живота? Грыжа передней брюшной стенки без непроходимости или гангрены
19	Европеоид	53	26	М	осторонняя или неуточненная паховая грыжа без непроходимости или гангрены
20	Европеоид	48	24	Ж	Наличие колостомы
21	Европеоид	50	33	М	Пупочная грыжа без непроходимости или гангрены
22	Европеоид	32	35	Ж	грыжа
23	Европеоид	62	30,8	М	Правосторонняя паховая грыжа
24	Европеоид	37	17,2	Ж	закрытие имостомы
25	Европеоид	70		М	Пупочная грыжа
26	Европеоид	74	26,6	М	Пупочная грыжа
27	Европеоид	30	23.82	М	
28	Европеоид	24	22.5	М	
29	Европеоид	62	30.04	ж	
30	Европеоид	26	24.7	м	
31	Европеоид	28	23.4	м	
32	Европеоид	40		м	
33	Европеоид	28	25	м	
34	Европеоид	48	25	м	

35	Европеоид	18	21	м	Посттравматический деформирующий артроз 1 стадии
36	Европеоид	38	25	м	Посттравматический остеоартроз 1 стадии, комбинированная контрактура левого плечевого сустава, хроническая передне-нижняя нестабильность левого плечевого сустава
37	Европеоид	50		ж	Приобретенная деформация левой нижней конечности в виде посттравматического деформирующего медиального артроза 2
38	Европеоид	50	25	м	здоров, травма при спортнагрузке
39	Европеоид	49	25	м	
40	Европеоид	49	25	м	
41	Европеоид	40		м	
42	Европеоид	41	30	м	
43	Европеоид	41	30	м	
44	Европеоид	24	25	м	Здоров, травма колена, пластика крестообразной связки
45	Европеоид	41	28	м	
46	Европеоид	41	28	м	
47	Европеоид	41	26	м	
48	Европеоид	41	26	м	
		46.75	25.65282		

Приложение 3. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня сигнальных каскадов в ответ на PDGF

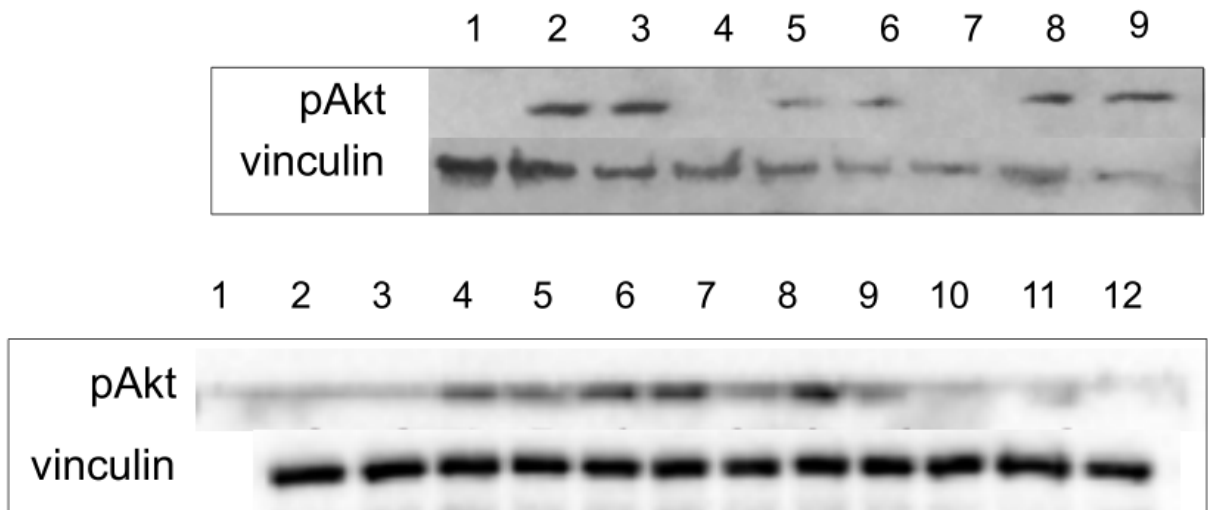


Gel 4A (1)

Lane #	Description
1	No addition
2	Apo
3	10' PDGF
4	10' PDGF+Apo
5	30' PDGF
6	30' PDGF+Apo
7	60' PDGF
8	60' PDGF+Apo

Gel 4A (2)

Lane #	Description
1	No addition
2	Apo
3	10' PDGF
4	10' PDGF+Apo
5	30' PDGF
6	30' PDGF+Apo
7	60' PDGF
8	60' PDGF+Apo

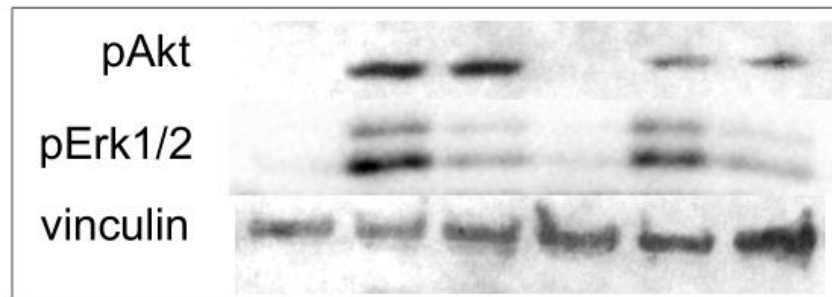
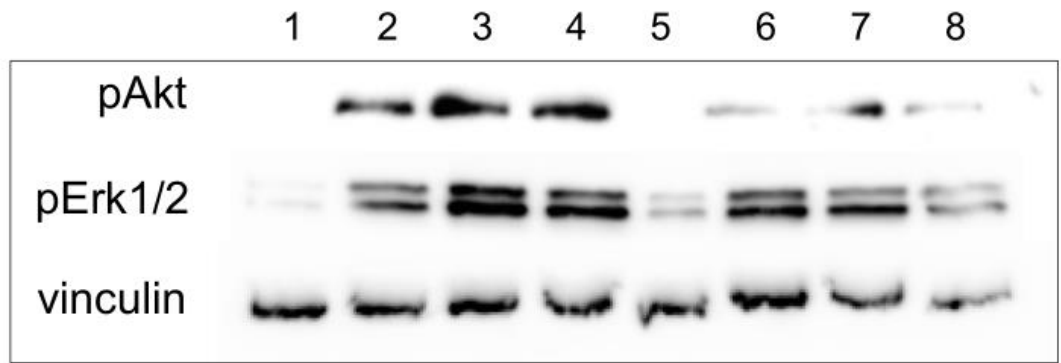


Gel 4A (4) / 4B (1)

Lane #	Description
1	No addition
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	Apo
5	10' PDGF+Apo
6	30' PDGF+Apo
7	Cat
8	10' PDGF+Cat
9	30' PDGF+Cat

Gel 4A (5) / 4B (2)

Lane #	Description
1	No addition
2	Apo
3	Cat
4	10' PDGF
5	10' PDGF+Apo
6	10' PDGF+Cat
7	30' PDGF
8	30' PDGF+Apo
9	30' PDGF+Cat
10	60' PDGF
11	60' PDGF+Apo
12	60' PDGF+Cat

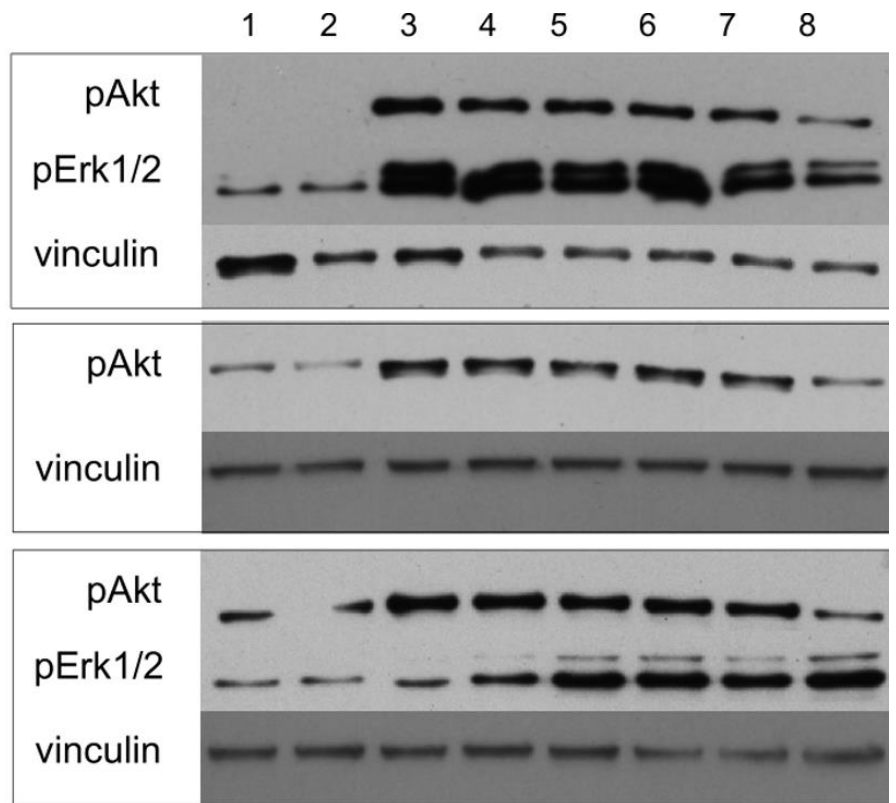


Gel 4B (3)

Lane #	Description
1	No addition
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	60' PDGF
5	Cat
6	10' PDGF+Cat
7	30' PDGF+Cat
8	60' PDGF+Cat

Gel 4B (4)

Lane #	Description
1	No addition
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	Cat
5	10' PDGF+Cat
6	30' PDGF+Cat



Gel 4E (1)

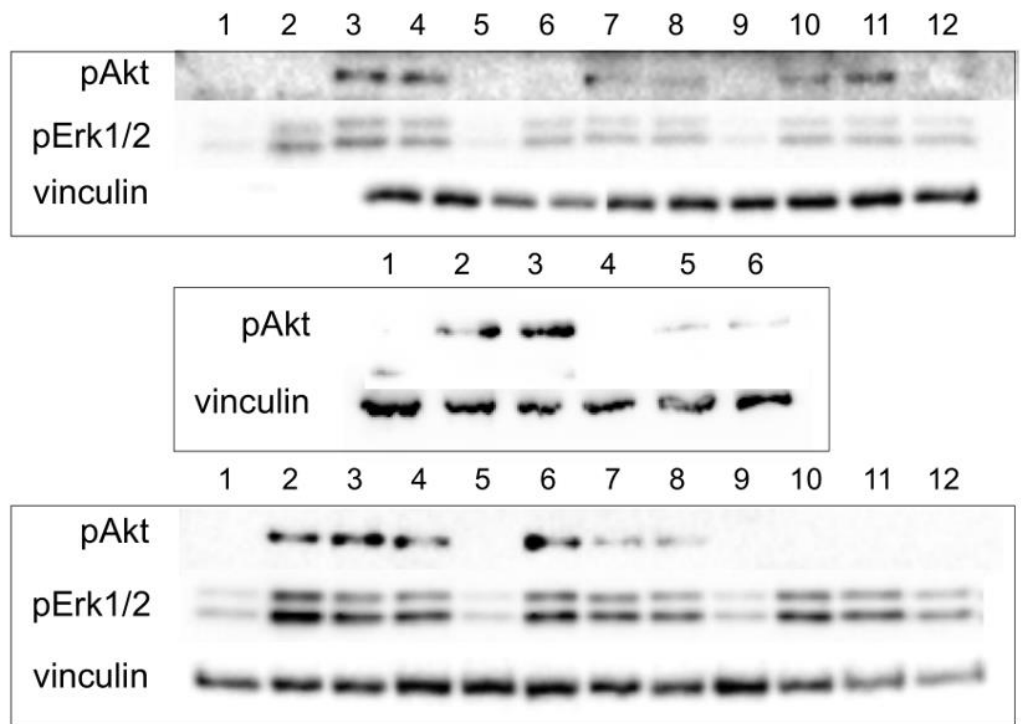
Lane #	Description
1	No add
2	Apo
3	60' PDGF
4	60' PDGF+Apo
5	30' PDGF
6	30' PDGF+Apo
7	10' PDGF
8	10' PDGF+Apo

Gel 4E (2)

Lane #	Description
1	No add
2	Apo
3	60' PDGF
4	60' PDGF+Apo
5	30' PDGF
6	30' PDGF+Apo
7	10' PDGF
8	10' PDGF+Apo

Gel 4E (3)

Lane #	Description
1	No add
2	Apo
3	60' PDGF
4	60' PDGF+Apo
5	30' PDGF
6	30' PDGF+Apo
7	10' PDGF
8	10' PDGF+Apo



Gel 4E (4) / 4F (1)

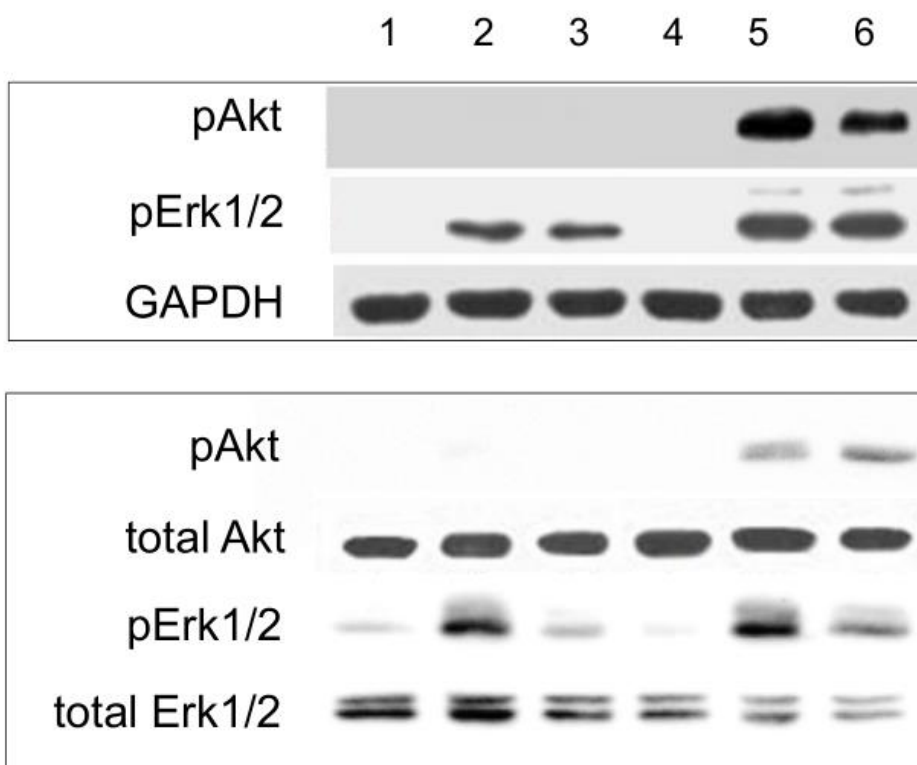
Lane #	Description
1	No Add
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	60' PDGF
5	Cat
6	10' PDGF+Cat
7	30' PDGF+Cat
8	60' PDGF+Cat
9	Apo
10	10' PDGF+Apo
11	30' PDGF+Apo
12	60' PDGF+Apo

Gel 4F (2)

Lane #	Description
1	No Add
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	Cat
5	10' PDGF+Cat
6	30' PDGF+Cat

Gel 4F (3) / 4J (1)

Lane #	Description
1	No Add
2	10' PDGF
3	30' PDGF
4	60' PDGF
5	Cat
6	10' PDGF+Cat
7	30' PDGF+Cat
8	60' PDGF+Cat
9	No Add
10	10' EGF
11	30' EGF
12	60' EGF



Gel 4I (1)

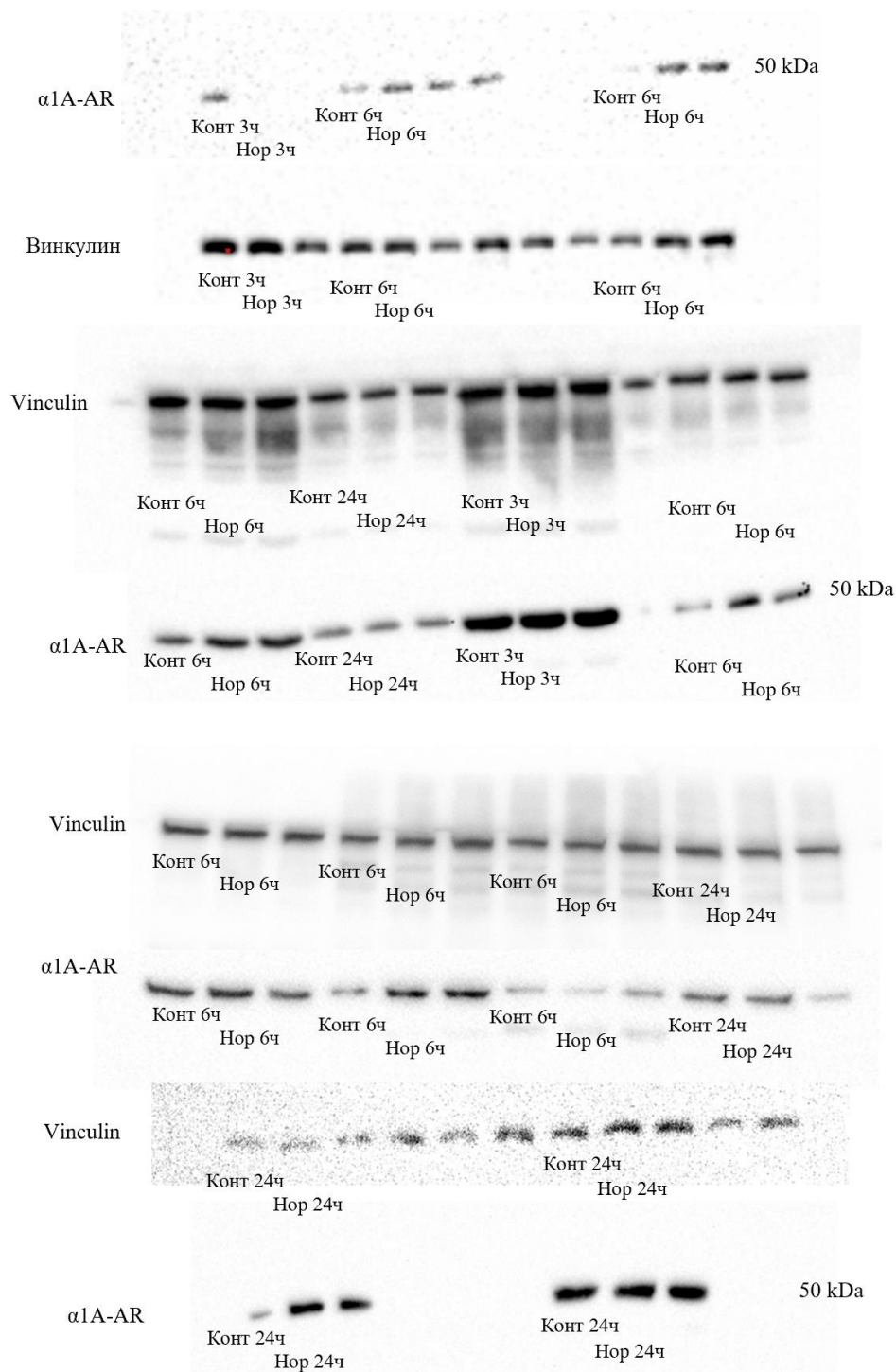
Lane #	Description
1	No Add
2	10' EGF
3	30' EGF
4	No Add
5	10' PDGF
6	30' PDGF

Gel 4I (2)

Lane #	Description
1	No Add
2	10' EGF
3	30' EGF
4	No Add
5	10' PDGF
6	30' PDGF

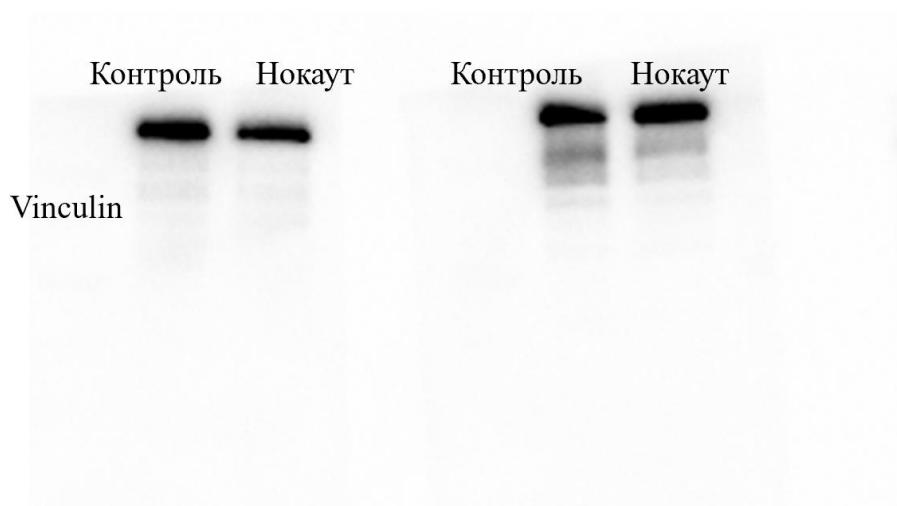
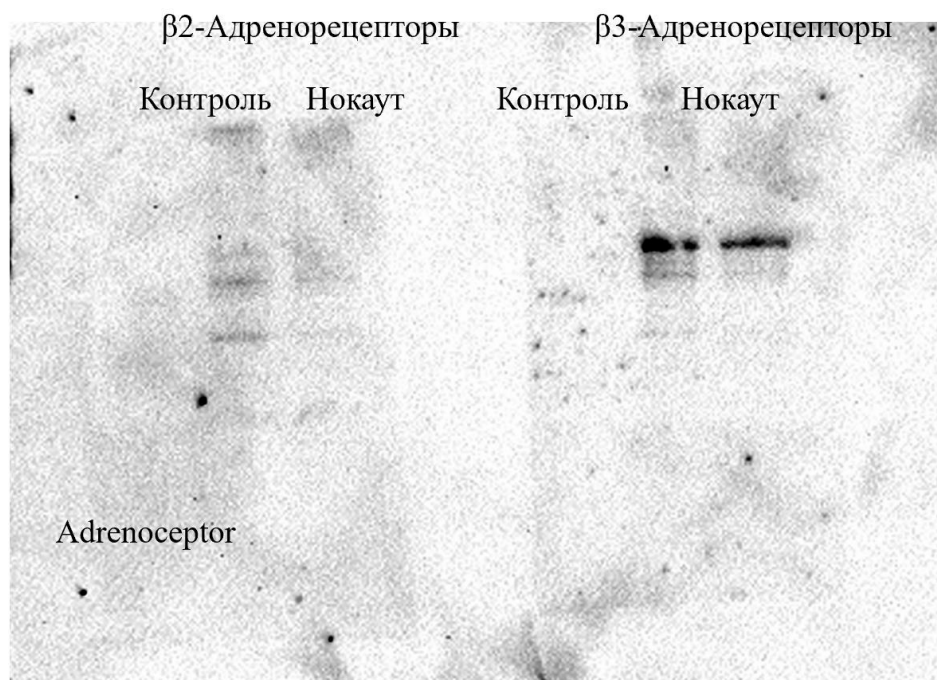
Приложение Рис. 1. Полные мембраны вестерн-блот анализа уровня фосфорилирования протеинкиназы Akt (pAkt) и Erk1/2 (pErk1/2). Расшифровка дорожек дана ниже изображений мембран

Приложение 4. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов



Приложение Рис. 2. Полные мембраны вестерн-блот анализа уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов после 3,6, и 24 часов преинкубации с норадреналином

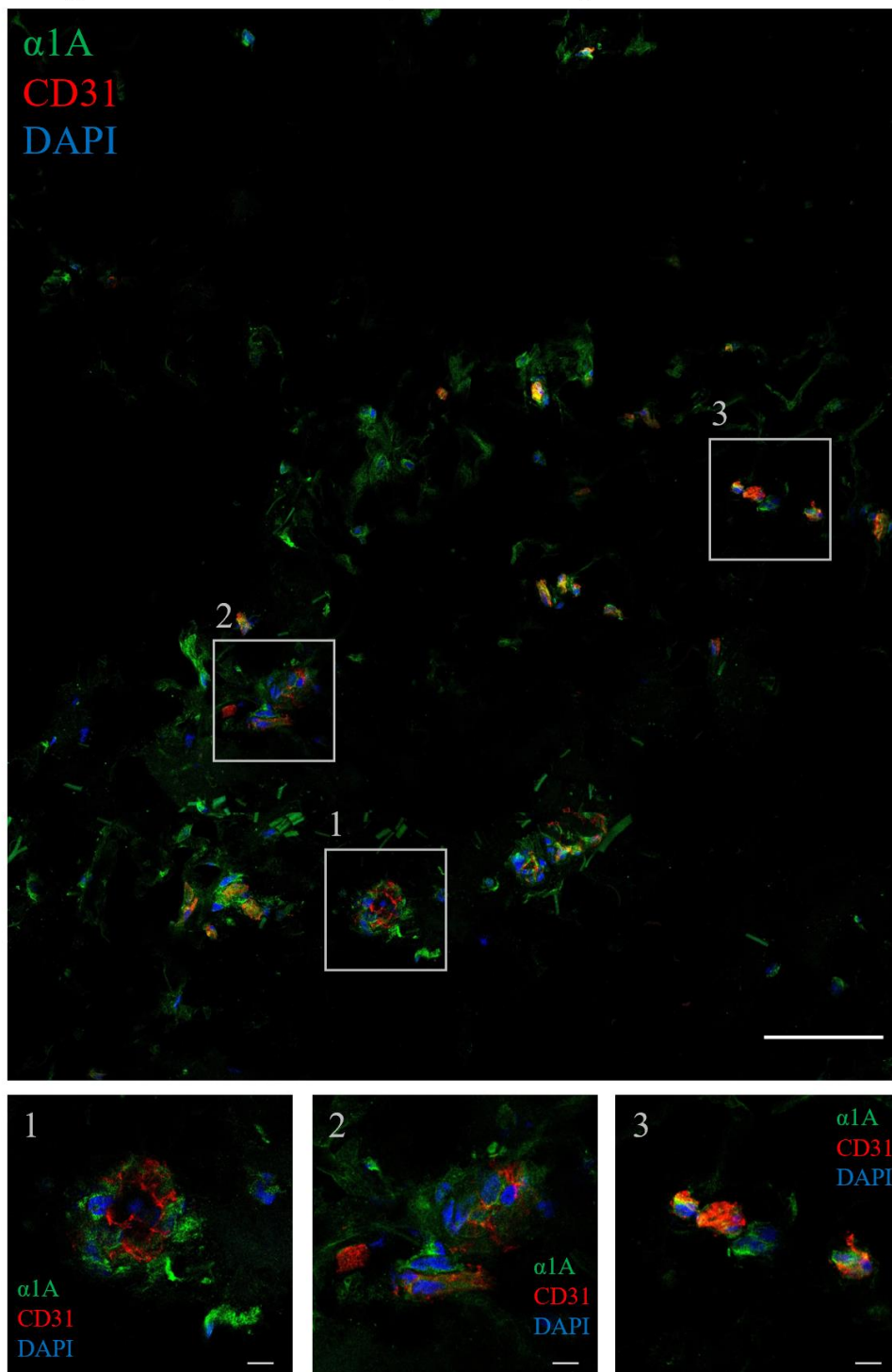
Приложение 5. Оригинальные мембраны вестерн-блоттинга по измерению уровня экспрессии β -адренорецепторов после нокаута



Приложение Рис. 3. Полные мембраны вестерн-блот анализа уровня экспрессии бета2 и бета3-адренорецепторов после CRISPR/Cas9-опосредованного подавления их экспрессии

Приложение 6. Срезы жировой ткани, окрашенные на $\alpha 1A$ -адренорецепторы

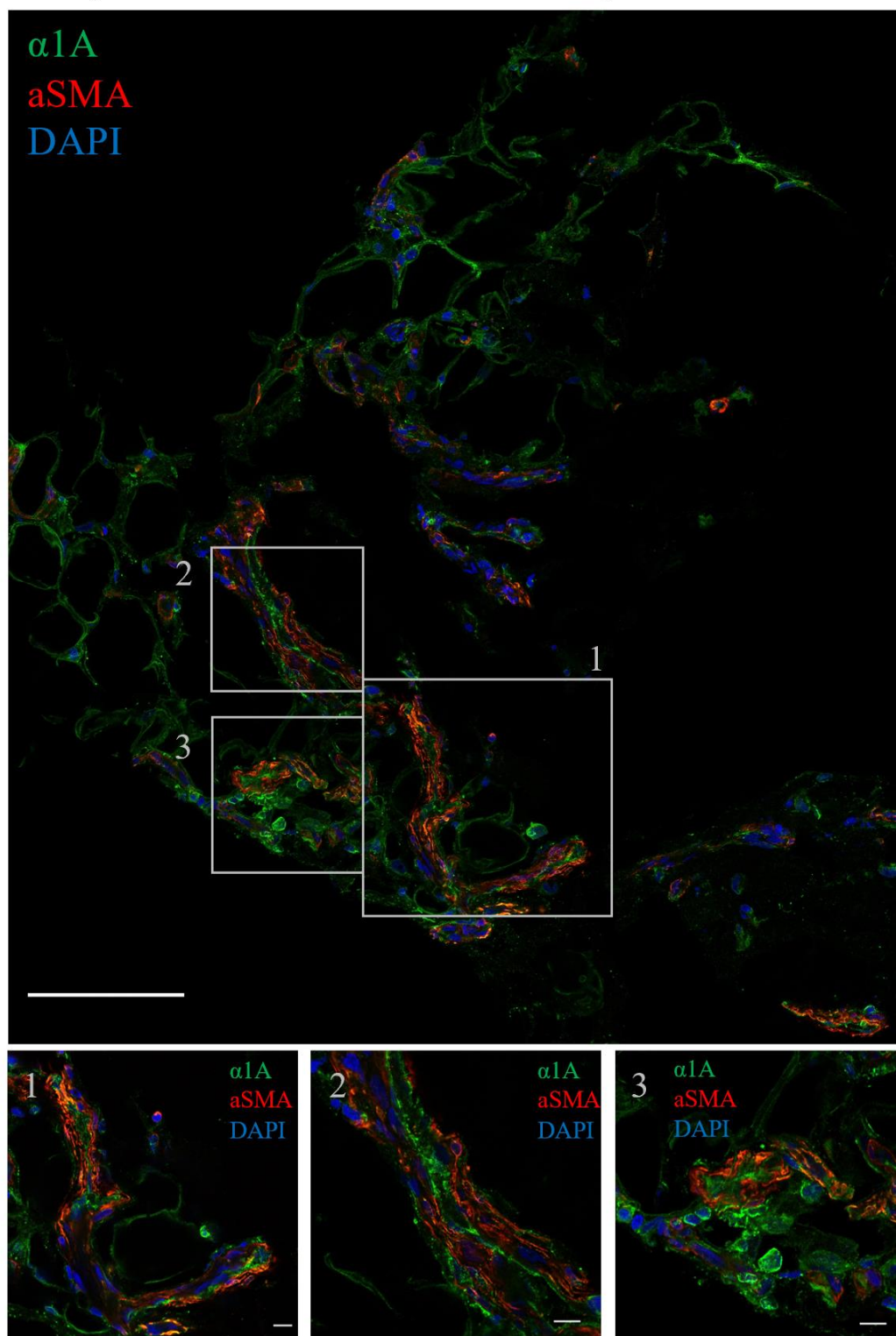
Нормотензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 4. Конфокальные изображения замороженных секций подкожного жира из области живота человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый), CD31-экспрессирующие эндотелиальные клетки

(красный). Ядра окрашены Дапи (голубой). Масштаб 100 мкм для изображения целого среза и 10 мкм для увеличенных областей.

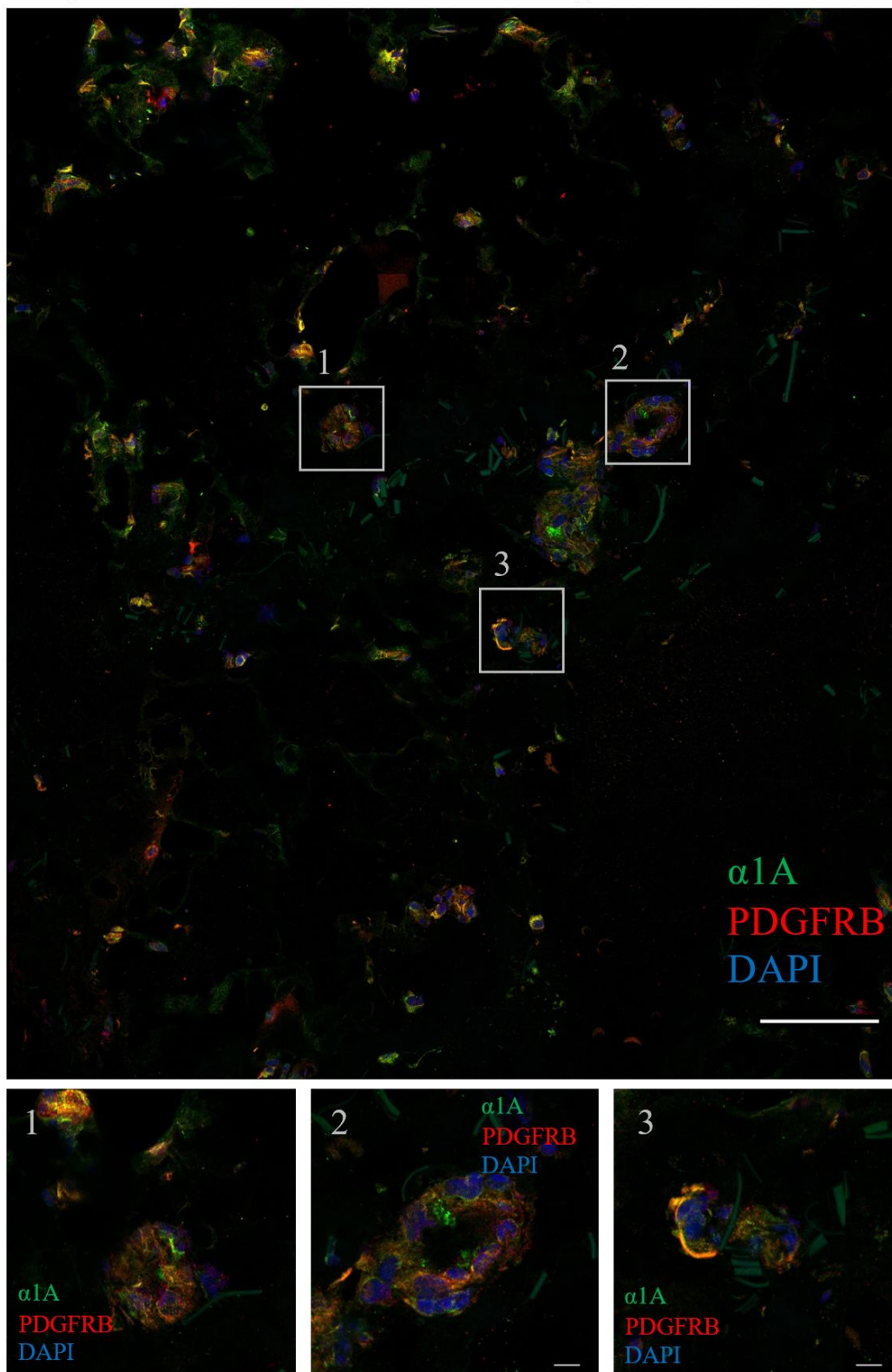
Нормотензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 5. Конфокальные изображения замороженных секций подкожного жира из области живота человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый), aSMA гладкомышечные клетки (красный). Ядра

окрашены Дапи (голубой). Масштаб 100 мкм для изображения целого среза и 10 мкм для увеличенных областей.

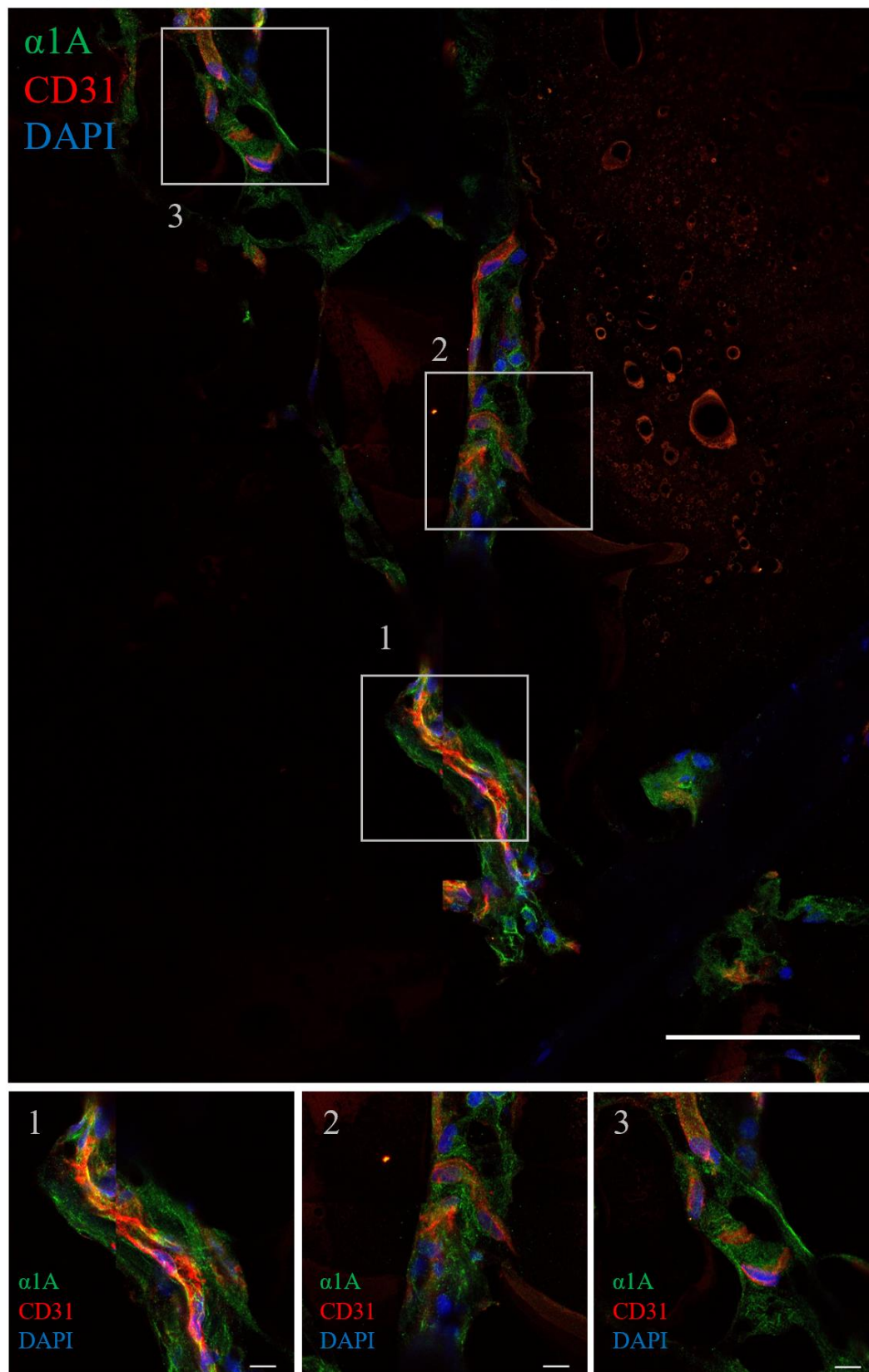
Нормотензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 6. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -адренергический рецептор (зеленый), перициты $PDGFR\beta^+$ (красный). Ядра

окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 100 мкм для сканирования
целого среза и 10 мкм для отдельных областей.

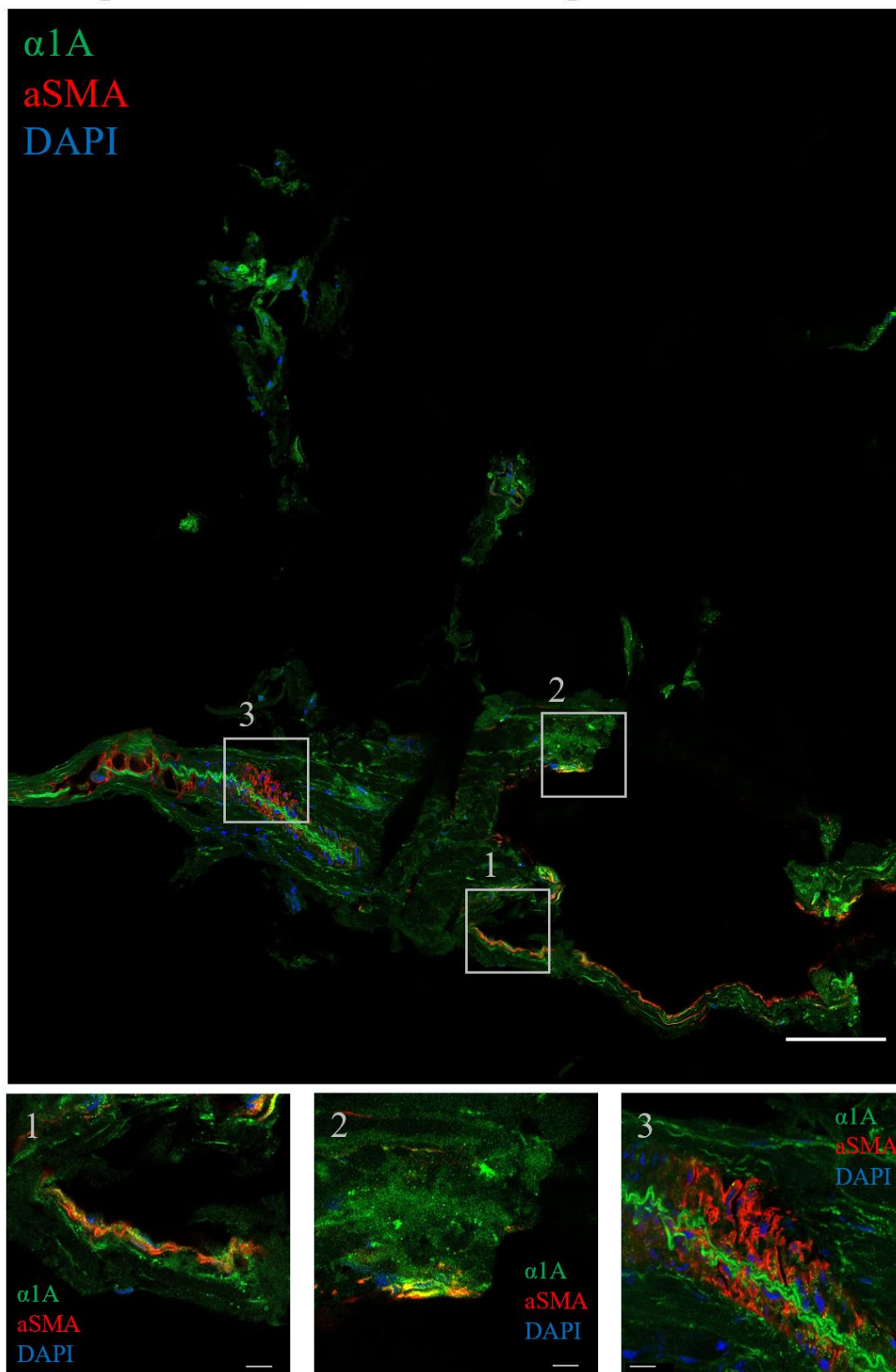
Гипертензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 7. Конфокальные изображения замороженных секций подкожного жира из области живота человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -

адренорецепторы (зеленый), CD31-экспрессирующие эндотелиальные клетки (красный). Ядра окрашены Дапи (голубой). Масштаб 100 мкм для изображения целого среза и 10 мкм для увеличенных областей.

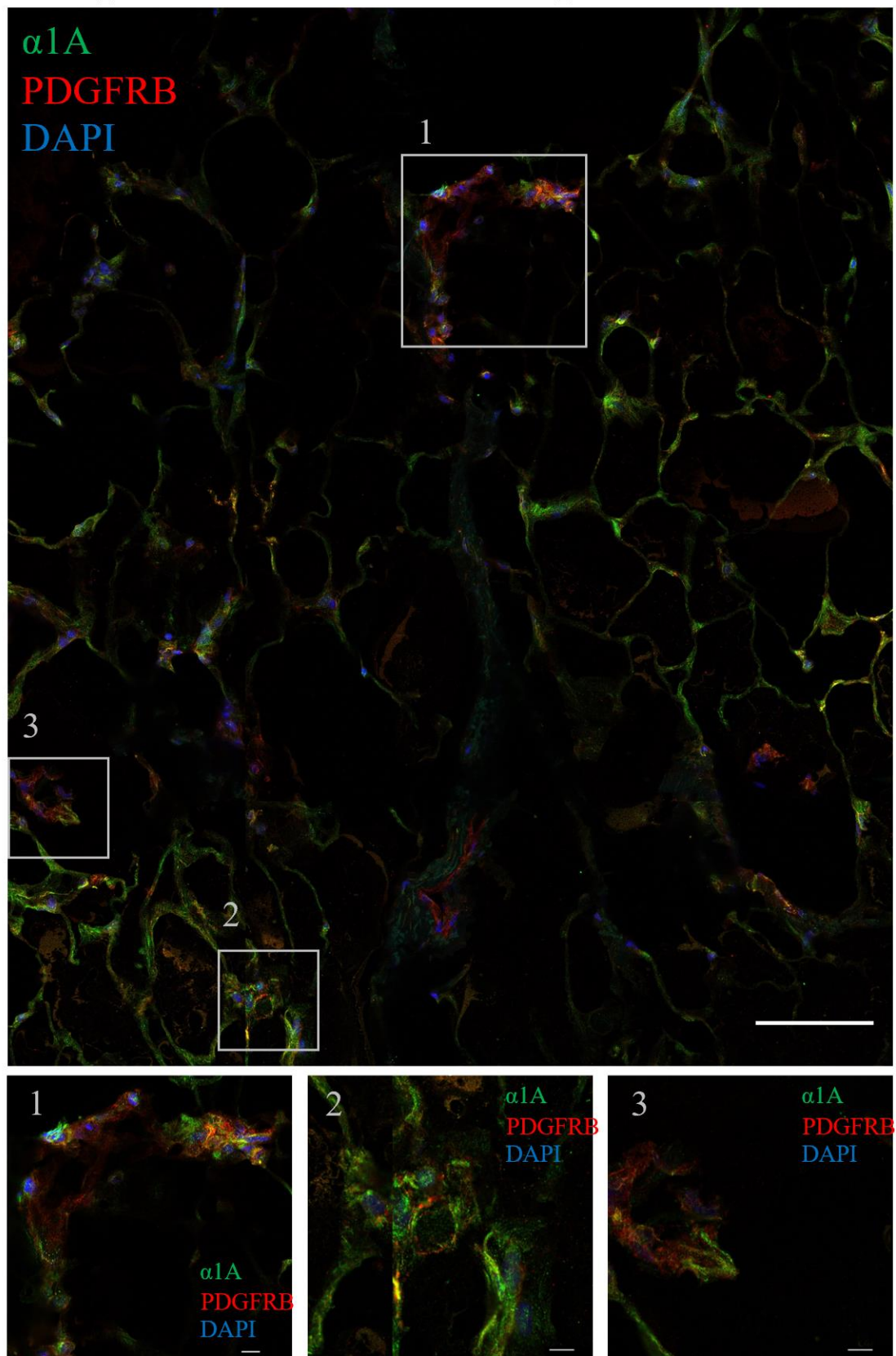
Гипертензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 8. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -адренергический рецептор (зеленый), альфа-актин гладких мышц (красный).

Ядра окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 100 мкм для сканирования
целого среза и 10 мкм для отдельных областей.

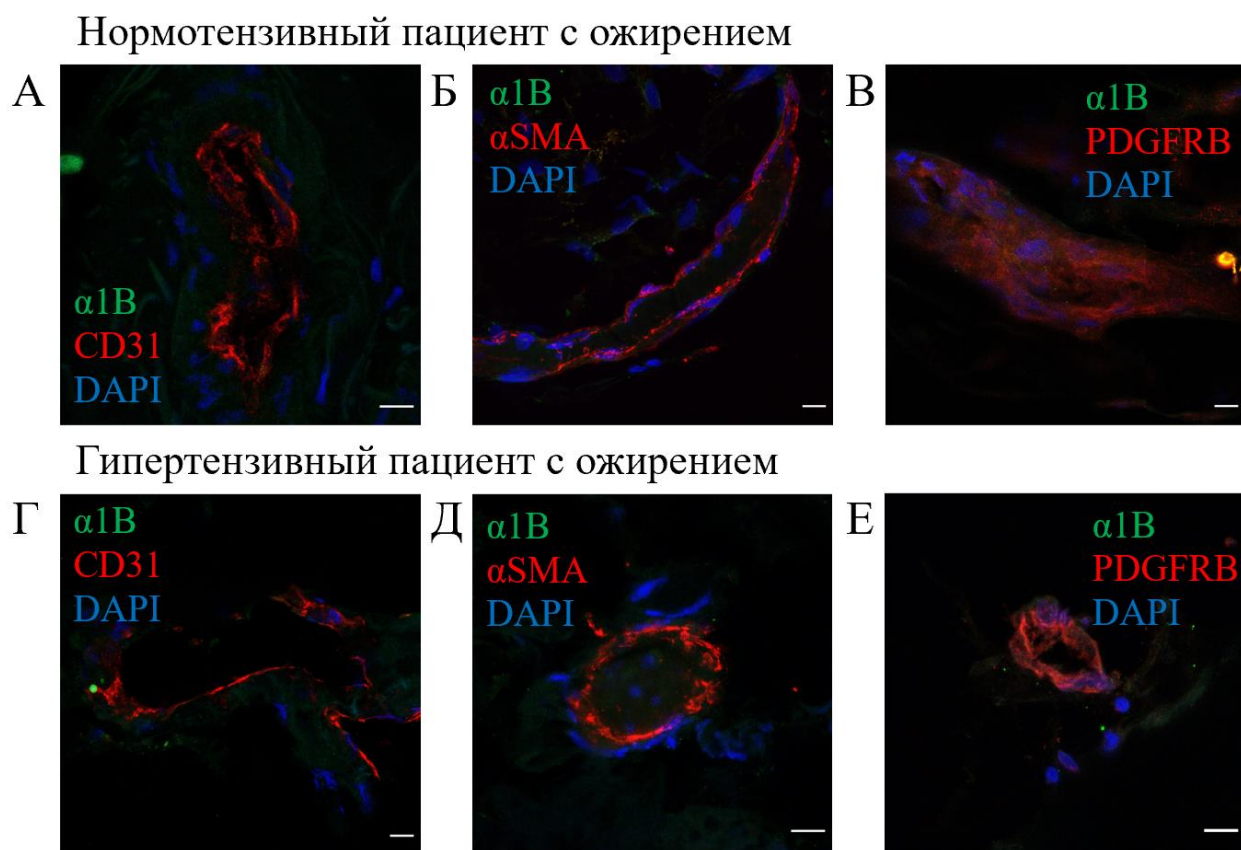
Гипертензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 9. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1A$ -

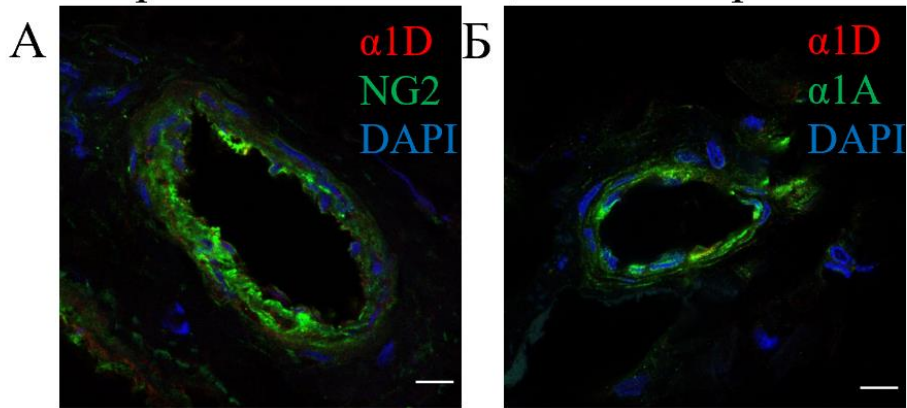
адренергический рецептор (зеленый), перициты PDGFR β ⁺ (красный). Ядра окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 100 мкм для сканирования целого среза и 10 мкм для областей

Приложение 7. Экспрессия $\alpha 1B$ - и $\alpha 1D$ -адренорецепторов в жировой ткани

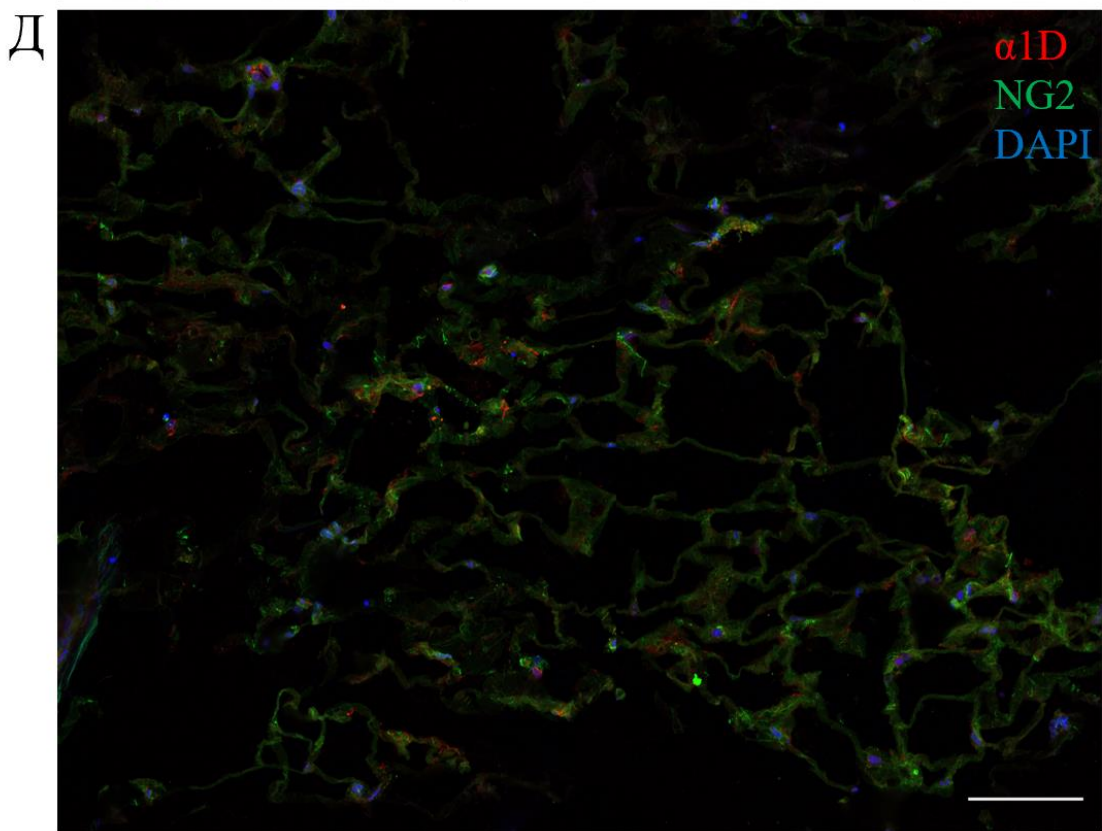
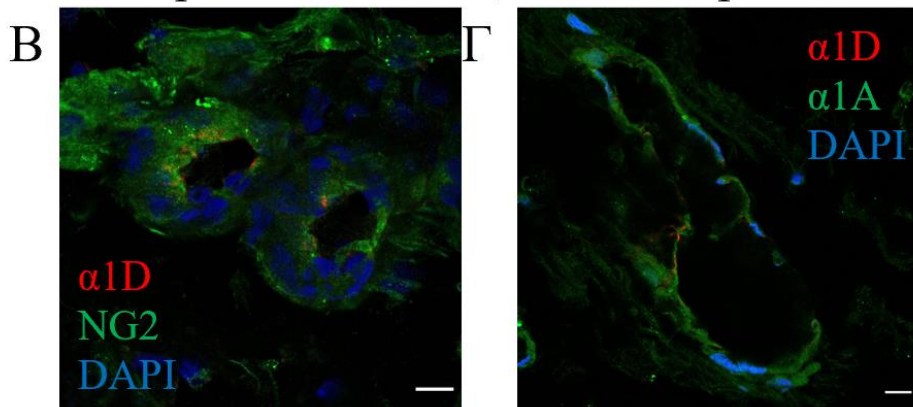


Приложение Рис. 10. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. А-Б — экспрессия альфа1B-адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки у пациентов с нормальным давлением, страдающих ожирением. Г-Е — экспрессия альфа1B-адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки больных гипертонической болезнью с ожирением. Клетки, экспрессирующие $\alpha 1B$ -адренергический рецептор (зеленый), CD31-положительные эндотелиальные клетки (красный), альфа-актин-положительные клетки (красный), PDGFR β -положительные перициты (красный). Ядра окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 10 мкм.

Нормотензивный пациент с ожирением



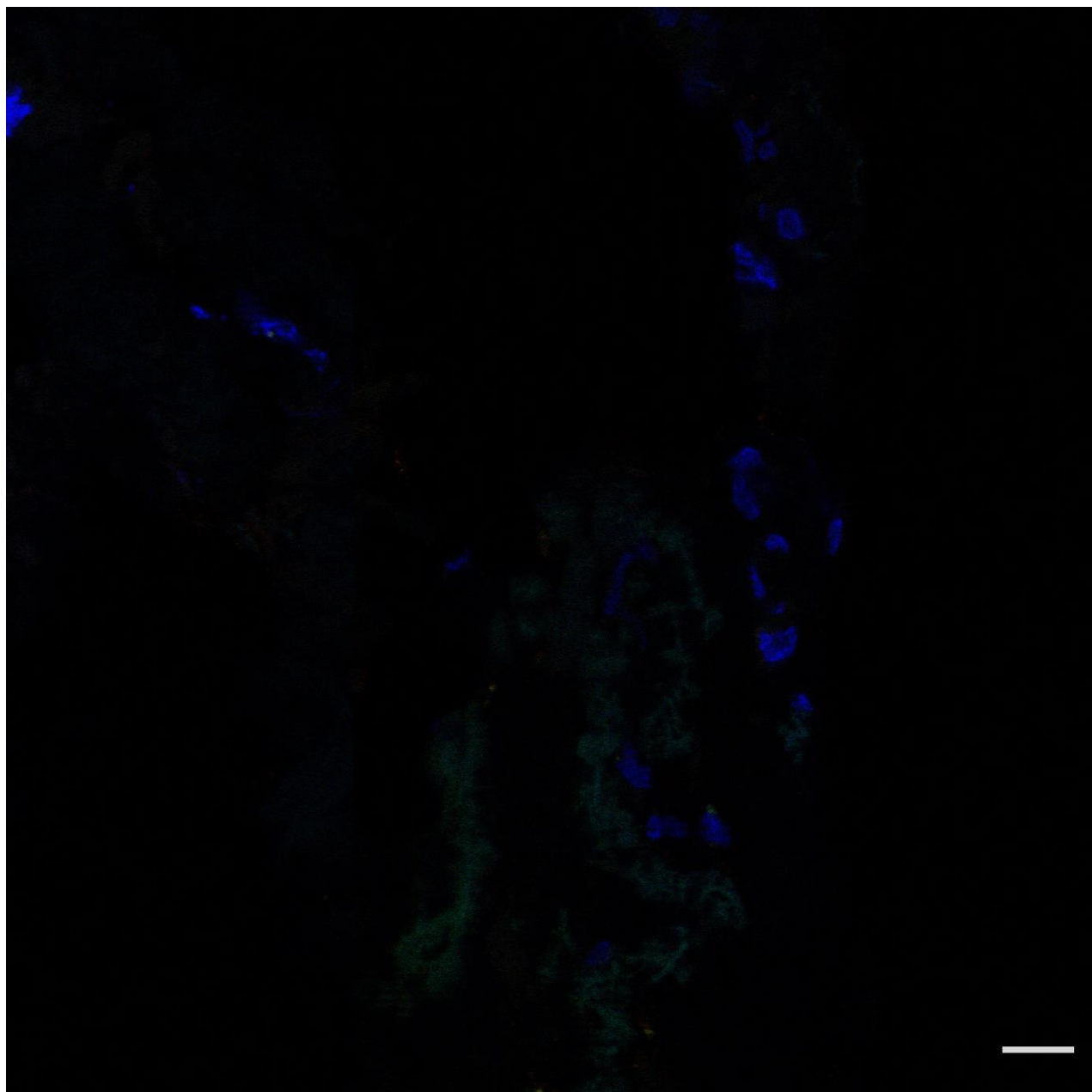
Гипертензивный пациент с ожирением



Приложение Рис. 11. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. А-Б — экспрессия альфа1D-

адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки у нормотензивных пациентов с ожирением. В-Г — экспрессия альфа1D-адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки больных гипертонической болезнью с ожирением. Д — экспрессия альфа1D-адренорецептора в подкожной жировой ткани человека. Клетки, экспрессирующие α 1D-адренергический рецептор (красный), α 1A-адренергический рецептор (зеленый), NG2-положительные перициты (зеленый). Ядра окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 100 мкм для крупного изображения и 10 мкм для вставок.

*Приложение 8. Репрезентативный IgG контроль для
иммунофлуоресцентной окраски жировой ткани*



Приложение Рис. 12. Конфокальные изображения замороженных срезов подкожной жировой ткани человека. IgG (красный), IgG (зеленый). Ядра окрашены Дапи (синий). Масштабная линейка 100 мкм.