

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич

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

Специальность: 1.5.5 — Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины.

Научный консультант: *Ткачук Всеволод Арсеньевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН*

Официальные оппоненты: *Тарасова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, профессор*

Шестопалов Александр Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Директор управления последипломного образования, ординатуры, аспирантуры

Авдонин Павел Владимирович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, лаборатория Физиологии рецепторов и сигнальных систем, заведующий лабораторией

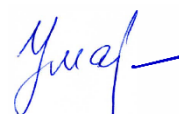
Защита диссертации состоится «27» мая 2024 года в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0 <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.07/2906>

Автореферат разослан «26» марта 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.015.7
доктор биологических наук



Умарова Б.А.

Общая характеристика работы

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 (Maximow, 1909). А уже в наше время, в XXI веке произошло открытие механизма транsdифференцировки (Jorling et al., 2011).

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 (Cornier et al., 2008). Обновление жировой ткани человека осуществляют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) (Bourin et al., 2013; Viswanathan et al., 2019). 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 (Cornier et al., 2008). 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 (Maximow, 1909). 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) (Friedenstein et al., 1976). 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 (иницированное 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 инициированного 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 $\beta 3$ -АР, а затем $\alpha 1A$ -АР 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 $\beta 3$ -АР, затем $\alpha 1A$ -АР, 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 $\beta 3$ -адренорецепторов. При этом происходит повышение чувствительности клеток к норадреналину, сопряженное с экспрессией $\alpha 1A$ -адренорецепторов за счет синтеза цАМФ, активации протеинкиназы А и повышения трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -

адренорецепторов и не активации цАМФ-зависимых транскрипционных факторов. После повышения уровня $\alpha 1A$ -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 иницированное состояние, то есть то состояние, в которое они перешли под влиянием стимуляции $\beta 3$ -адренорецепторов. Из этого же иницированного 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 автора

Автор выдвинул рабочую гипотезу, спланировал исследования. Личный вклад в выполнение биохимических, физиологических и молекулярно-биологических экспериментов более половины. Автор осуществил статистическую обработку, анализ и представление результатов, написание статей и представлял результаты на российских и международных конференциях.

Апробация материалов работы

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 47 работ (из них 34 статьи в международных рецензируемых журналах, входящих в базы данных Scopus, Web of Science и RSCI), определенных пунктом 2.3. Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. 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.

Материалы и методы исследования

Выделение первичной культуры МСК и культивирование

МСК выделяли из подкожной жировой ткани человека, которую получали 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. От каждого донора получали добровольное информированное согласие. Локальные этические комитеты главного военного клинического госпиталя имени Бурденко (Москва, Россия) и медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова (IRB00010587, Москва, Россия) одобрили протокол исследования: №160 от 22 июля 2019 года и №4 от 4 июня 2018 года соответственно. Для выделения МСК из жира разрушали межклеточные контакты и внеклеточный матрикс при помощи коллагеназы и диспазы после механического измельчения жира. Инкубировали с ферментами в течение 0,5-1 часа при 37°C. Отделяли центрифугированием (200g, 10 мин) стромально-васкулярную фракцию. Культивировали в полной среде роста МСК (AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media (HyClone), содержащей 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone) и 1% раствора антибиотиков пенициллина и стрептомицина (HyClone). Клеточные культуры МСК культивировали в полной среде роста в инкубаторе при 37°C и с 5% CO₂. МСК пассировали с помощью растворов Версена и трипсина. Первичную культуру МСК использовали в экспериментах в течение 8-9 пассажей, затем утилизировали. Часть клеточных культур замораживали для возможности повторной работы с этой же культурой в дальнейшем при необходимости.

Иммуногистохимический анализ

Подкожную жировую ткань человека использовали ту же, что и для выделения первичных культур МСК. Образец подкожной жировой ткани человека помещали в реагент tissue-tek otc compound (Sakura Inc.) и замораживали в жидком азоте. Далее нарезали срезы толщиной 10 µМ при помощи криотома. Срезы фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 мин. AP

визуализировали в ткани путем иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов с использованием антител к α 1A- (ab137123, Abcam, 1:250) и β 3-AP (Abnova, H00000155-B01P, 1:100). Для оценки совместной локализации клеток, экспрессирующих различные изоформы AP, и сосудов проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: срезы инкубировали со смесью антител к AP и/или антител к маркерам эндотелиальных клеток (CD31, IR610, Dako), или гладкомышечных клеток (α SMA, 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. Изображения получали при помощи конфокального микроскопа LSM 780 с программным обеспечением ZEN2010 (Zeiss).

Кальциевая сигнализация

Функциональные ответы МСК на гормоны регистрировали на уровне одиночных клеток. 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. Активацию α -AP определяли по изменению уровня кальция в клетках. Клетки окрашивали с помощью проникающего через мембрану красителя Fluo-8 AM (Abcam). Для активации α -AP использовали норадреналин (Abcam, 1 μ M). В случае использования антагонистов AP клетки стимулировали норадреналином в присутствии либо α 1-антагониста празозина (Abcam, 10 μ M), либо α 2-антагониста атипамезола (Abcam, 100 μ M). Флуоресценцию регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon) и sCMOS камерой Photometrics Kinetix (Teledyne Photometrics). Гормоны добавляли не останавливая съемки фильма прямо под микроскопом. 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). Для исследования изменения чувствительности клеток при предварительной инкубации с норадреналином или агонистами за 6 часов до эксперимента клетки инкубировали в полной среде роста с норадреналином (1 μ M) (или соответствующими агонистами) в течение 1 часа. Специфические ингибиторы при необходимости добавляли за 15-30 минут до норадреналина. С контрольными лунками проводили все те же операции, что и с экспериментальными, но без добавления норадреналина и/или специфических ингибиторов.

Подготовка библиотек для анализа транскриптома одиночных клеток и биоинформатический анализ транскриптома одиночных клеток

Для анализа транскриптома одиночных клеток scRNAseq клеточные препараты готовили в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки использовали на 1 пассаже.

Секвенированные образцы были проанализированы с помощью референсного генома человека 38 версии (NCBI build 38, GRCh38) с использованием программного обеспечения Cell Ranger 6.1.2 (10x Genomics, США) в Linux. 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. 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 (Hao et al., 2021). 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 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. 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. Чтобы выполнить анализ тенденций изменения транскрипции мРНК, мы оценили количество несплайсированных и сплайсированных форм мРНК, используя velocity 0.17.16. 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. Изменение транскрипции мРНК визуализировали на интегрированных образцах с помощью UMAP. Построение траекторий развития было выполнено с помощью набора пакетов Dynverse с использованием наиболее оптимального для наших данных метода Paga-tree. Анализ активности транскрипционных факторов был осуществлен с помощью пакета SCENIC в R на основе 38 версии генома.

Контракция МСК-коллагеновых дисков

Коллаген (PC11-NCL, Imtek) растворяли до концентрации 3 мг/мл в 0,1% уксусной кислоте (Imtek). Затем, в процессе формирования дисков, pH доводили до pH7,4 при помощи 1M NaOH. На 1 лунку 24-луночного планшета отбирали 100 000 клеток, добавляли DMEM LG и коллаген. Для того чтобы открепить МСК-коллагеновый диск от стенок лунки, добавляли среду для ведения клеток AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащую 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone, USA). Через 30 мин после открепления диска к культуральной среде добавляли норадrenalин 1 μ M. Через 1 ч диски промывали полной средой роста. Через 5 часов в среду снова добавляли норадrenalин. Площадь диска измеряли с помощью Nikon SMZ18 до и через 30 минут и 24 ч после второго добавления норадrenalина.

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

Для нокаута генов ADRB2/ADRB3 (β 2- и β 3-АР 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. 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 и амплифицировали. Полученные ампликоны секвенировали по Сэнгеру. Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Австралия).

Проточная цитометрия и клеточный сортинг по кальциевой сигнализации

Иммунофенотип МСК и долю клеток, экспрессирующих AP, анализировали с помощью проточной цитометрии. AP выявляли с помощью специфических антител $\alpha 1A$ (Abcam ab137123, 1:250), $\alpha 1B$ (Abcam ab169523, 1:100), $\alpha 2A$ (Abcam ab65833, 1:100), $\alpha 2B$ (Abcam ab151727, 1:100), $\beta 1$ (Abcam ab3442, 1:100), $\beta 2$ (Abcam ab61778, 1:100), $\beta 3$ (Acris, H00000155-B01P, 1:100) на фиксированных формалином непроницаемых клетках. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa Special Order Product (BD Pharmingen, США). Результаты анализировали при помощи 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 Fluo-8 AM и готовили для проведения клеточного сортирования. Стимуляцию $\alpha 1A$ -AP производили непосредственно в сортере. Клетки сортировали по яркости флуоресценции кальциевого красителя. Далее вырастили клетки до достижения ими монослоя и направили в адипогенную дифференцировку.

Регистрация адипогенной дифференцировки в реальном времени на уровне единичных клеток

Для прямого наблюдения за дифференцировочной судьбой клеток, подвергшихся сенситизации при действии норадреналина мы провели дифференцировку клеток в режиме реального времени под микроскопом после наблюдения за кальциевыми ответами на норадреналин. Клетки высаживали на культуральные планшеты в конфлюэнтном монослое. Клетки красили Fluo-8 AM (4 μM) в течение 1 часа, после чего под микроскопом стимулировали норадреналином и регистрировали кальциевые ответы на уровне одиночных клеток. Клетки отмывали, переводили в среду для адипогенной дифференцировки и возвращали под микроскоп в те же поля зрения. Адипогенную дифференцировку производили при помощи редуцированного коктейля факторов: инсулин (10 нг/мл), избутиметилксантин (IBMX, 0,5 мМ) и дексаметазон (1 μM). Планшет с клетками находился под микроскопом в течение двух недель. Каждые 3-4 дня не останавливая фильм, под ламинаром заменяли клеткам среду на новую адипогенную. Интервал съемки составлял 1 час. Обработку фильмов производили при помощи ImageJ (США).

Для проверки дифференцировки МСК в бежевые адипоциты мы усложнили эксперимент. После проведения данного эксперимента мы зафиксировали клетки и окрасили их иммуноцитохимически на адипонектин и UCP1.

Регистрация активности цАМФ-зависимого сигнального каскада при помощи биосенсора

Мы регистрировали активацию PKA с помощью биосенсора PKA-Spark. Для этого 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 раствор Хенкса (ПанЭко) с 20 мМ ХЕПЕС (HyClone). Для анализа функциональной активности клетки обрабатывали 1 μM норадреналина (Abcam). Активацию PKA измеряли в одиночных клетках с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного CCD-камерой Nikon DS-Qi1 (Nikon). Использовали одновременное измерение 6×6 полей зрения в режиме Large Image. Видеозаписи анализировали с помощью программы ImageJ (США).

Предварительно мы отработали условия регистрации сигнала PKA-Spark на клетках линии HeLa-Kyoto. Образование агрегатов в ответ на гормон демонстрировали только клетки с высоким уровнем экспрессии PKA-Spark. Для дальнейшего анализа ответов МСК мы определили

пороговый уровень экспрессии биосенсора, позволяющий регистрировать сигнал. Для количественной оценки образования флуоресцентных агрегатов мы сравнили 3 альтернативных подхода: (1) сигнал PKA-Spark определяли как сумму интенсивности пикселей флуоресцентных капель, деленную на сумму интенсивности пикселей клеток (Zhang et al., 2018); (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" (ImageJ, США). Третий подход - подсчет общей площади флуоресцентных агрегатов - показал минимальный базальный уровень сигнала и лучшую контрастность. Для количественной оценки ответов МСК мы использовали этот подход. Изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ. Мы также проанализировали обратимость сигнала: PKA-Spark демонстрировал медленную динамику распада флуоресцентных капель, капли частично сохранялись через 30 мин после вымывания гормона.

Работа с мышами. Индукция побурения. Локальная симпатэктомия парных жировых 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 соответствовал международным стандартам (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 использовали самцов мышей линии C57Bl6/N возрастом 8-12 недель. Мышей содержали в стандартных условиях вивария, 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 построили на оценке эффективности побурения белого жира в предварительно десимпатизированных эпидидимальных жировых депо (eWAT), при этом парный eWAT всегда использовался в качестве контрольного. Локальную симпатэктомию производили следующим образом: Манипуляции с животными проводили под общим ингаляционным наркозом (ингаляция воздушной смесью с 2 - 4% Изофлюрана (Laboratorios Karizoo) и ок. 93% кислорода (испаритель V3000 Parkland Scientific с кислородным концентратором Nuvo Lite 52). Операционное поле выбривали от шерсти и обрабатывали кожным антисептиком АХД-2000. Делали разрез и непосредственно в eWAT вводили препараты. В опытный eWAT делали 12 инъекций по периметру жирового депо по 3,3 мкл. 10 мг/мл р-ра гуанетидина (MedChem Express LLC) в PBS или 9 мг/мл 6-гидроксидофамина (Sigma). В контрольный eWAT вводили стерильный PBS таким же способом. Разрез ушивали послойно викрилом. 10 мышей для эксперимента с гуанетидином и 5 для эксперимента с 6-гидроксидофамином. Для индукции побурения мышам вводили внутривенно 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 мышам эвтаназировали передозировкой анестетика (смесь 30 мг/мл Zoletil 100 (Virbac) и 3 мг/мл Xyla (Interchemie werken "De Adelaar" Eesti AS), 300 мкл/мышь), после чего забирали ткани обоих eWAT для последующего анализа. Всего использовали 17 мышей для эксперимента с локальной симпатэктомией гуанетидином с последующей индукцией побурения.

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 различались, 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 $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

Результаты и обсуждение

Характеризация МСК

Гормональную регуляцию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) мы изучали на примере МСК, выделенных из подкожной жировой клетчатки человека. МСК, выделяемые из жира, отвечали всем критериям мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, сформулированным международным обществом (Dominici et al., 2006; Viswanathan et al., 2019). Выделяемые нами МСК экспрессировали ключевые маркеры CD73, CD90 и CD105 и не экспрессировали общий маркер гематopoэтических предшественников CD45. Клетки проявляли мультипотентность, которая проявлялась в способности к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Несмотря на то, что МСК удовлетворяли минимальным критериям, входящим в определение этих клеток, эти клетки проявляли значительную функциональную гетерогенность. Например, лишь 20-80% клеток подвергалось адипогенной дифференцировке, а отложение кальциевых оссификатов при остеогенной дифференцировке осуществлялось неравномерно в культуре МСК. Кроме того, мы охарактеризовали гормональную чувствительность МСК на уровне одиночных клеток. При помощи регистрации внутриклеточной кальциевой сигнализации на уровне одиночных клеток мы установили, что МСК отвечали на кальций-мобилизующие гормоны гетерогенно: индивидуальная клетка отвечала на один, реже два гормона. Различные клетки популяции МСК отвечали на разные гормоны несмотря на то, что экспрессировали на своей поверхности множество различных рецепторов. Мы также проанализировали на уровне одиночных клеток ответы МСК на цАМФ-зависимые гормоны при помощи флуоресцентного генетически-кодируемого биосенсора PKA-Spark. Регистрация функциональных ответов на цАМФ-зависимые гормоны показала, что не более 45% МСК отвечали на такие гормоны. При этом на различные цАМФ-зависимые гормоны отвечали одни и те же клетки популяции, что сильно контрастирует с Ca^{2+} -зависимыми ответами. 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.

Инициация МСК

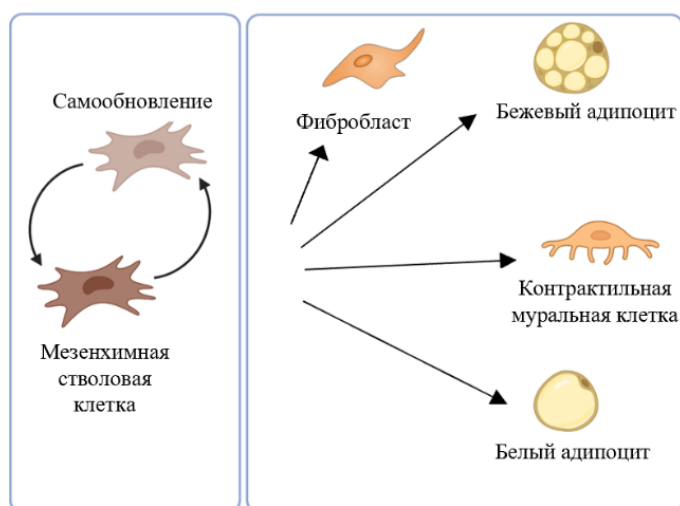


Рис. 1. Наиболее часто используемая схема выбора направления дифференцировки мультипотентными стволовыми клетками.

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. Массив МСК, направленных в адипогенную дифференцировку при помощи стандартного редуцированного коктейля (инсулин, дексаметазон и IBMX), на 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 «Дифференцировка МСК в контрактильный фенотип», 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.

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.

Мы провели попарную интеграцию образцов и кластеризацию полученных массивов данных (Рис. 2). 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. 2, 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. 2, 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, характеризовалось 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 (*RPL41*, *RPL28*, *RPS12*).

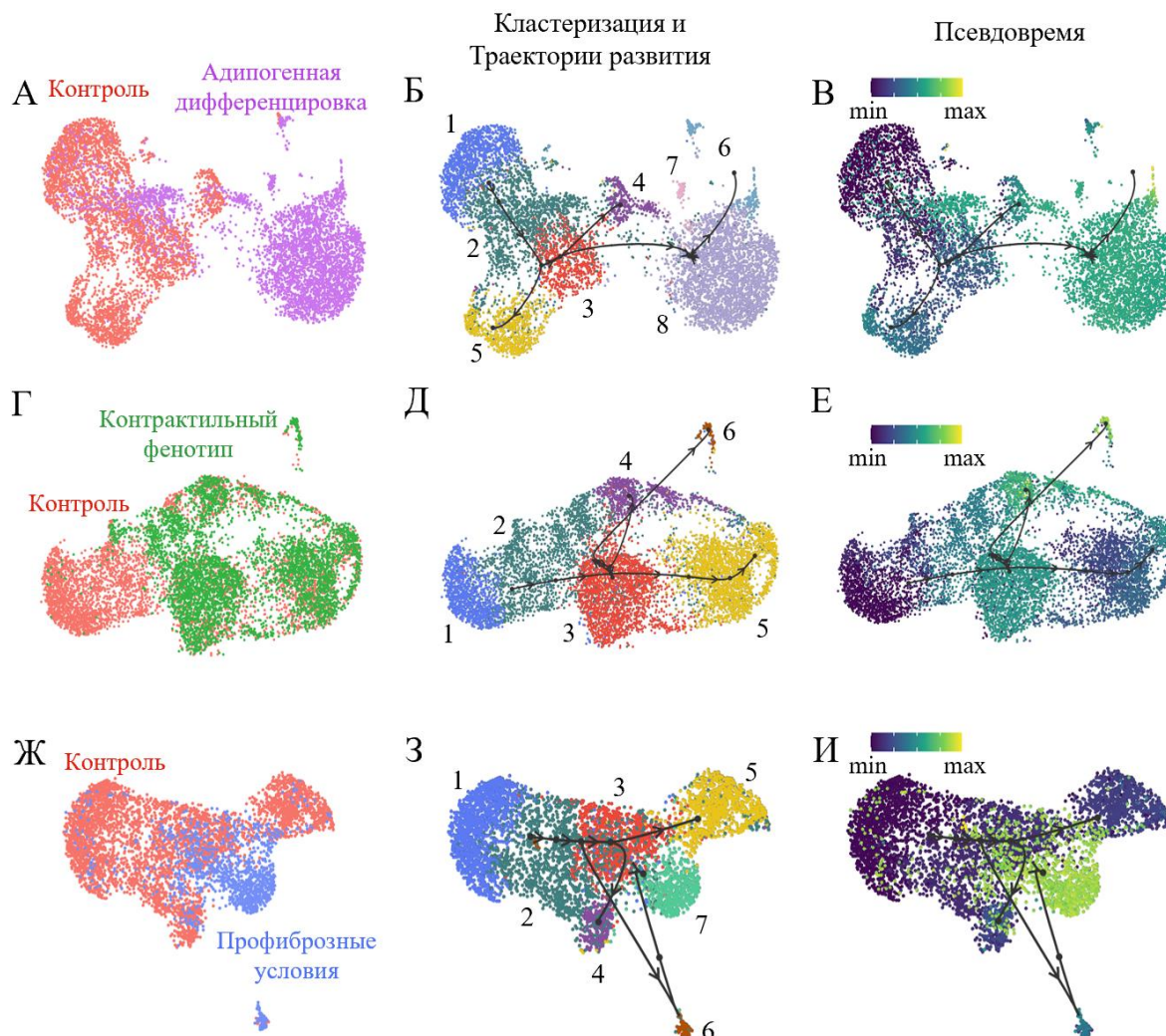


Рис. 2. Результаты транскриптомного профилирования на уровне единичных клеток (scRNAseq) МСК жировой ткани, направленных в адипогенную дифференцировку (А-В), в контрактильный фенотип (Г-Е) и в фиброзный фенотип (Ж-И). Контрольные клетки в интеграторах (А, Г, Ж) отмечены красным, клетки, направленные 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.

Кластер 4 во всех вариантах интеграции данных содержал фибробластоподобные 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, CEVPA, 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 (данные 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 (Saelens et al., 2019; Wolf et al., 2019). При помощи метода Paga tree trajectory inference мы показали, что во всех трех парах массивов существовал один кластер, в котором происходит разветвление траекторий развития между различными направлениями дифференцировки (Рис. 2, второй столбец).

В случае адипогенной дифференцировки клетки превращались в адипоциты (Кластер 6), фибробласты (Кластер 4) или делящиеся клетки (Кластер 5) (Рис. 2, А-В). Фибробласты создают окружение для регуляции и поддержания дифференцировки МСК в адипоциты (Marinkovic et al., 2020). При этом направление клеток в митоз лежит в основе процесса самообновления стволовых клеток. Стоит отметить, что часть МСК не отвечала на дифференцировочный стимул.

В случае направления МСК в контрактильный фенотип (Рис. 2, 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. 2, Д. При фиброзной дифференцировке МСК с первого по третий кластеры все происходило аналогичным образом, а далее траектория развития 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 пар массивов латентное время было 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 как инициированное. Действительно, в этом состоянии стволовые клетки вышли из состояния покоя, но еще не коммитированы ни в каком направлении, они все еще сохраняли свою мультипотентность.

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 изображен перенос кластеризации Контроль-Адипогенез (Рис. 3,Б) в датасеты Контроль-Контрактильный (Рис. 3,А) и Контроль-Фиброз (Рис. 3,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 не переносились 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. Таким образом, анализ траекторий развития совместно с совпадением кластера 3 в разных интегрированных датасетах указал на формирование общего инициированного состояния при различных вариантах дифференцировки МСК.

Обсуждение. Инициация МСК как выход стволовой клетки из функциональной ниши

Мы смогли предположить существование универсального для разных направлений дифференцировки инициированного функционального состояния МСК, в котором происходит выбор направления дифференцировки. Подобное состояние постнатальных стволовых клеток, насколько нам известно, описано впервые. Некое транзиторное 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 (Rodgers et al., 2014). В условиях химического повреждения мышцы токсическим агентом TCDD переход стволовых клеток в состояние “alert” выполняет защитную роль, предотвращая их спонтанную и неконтролируемую активацию (Der Vartanian et al., 2019). Инициированное состояние, показанное в данной работе, проявляет отличные функции от состояния “alert” сателлитных клеток. В инициированном состоянии МСК приобретали возможность выбора направления дифференцировки между несколькими возможными.

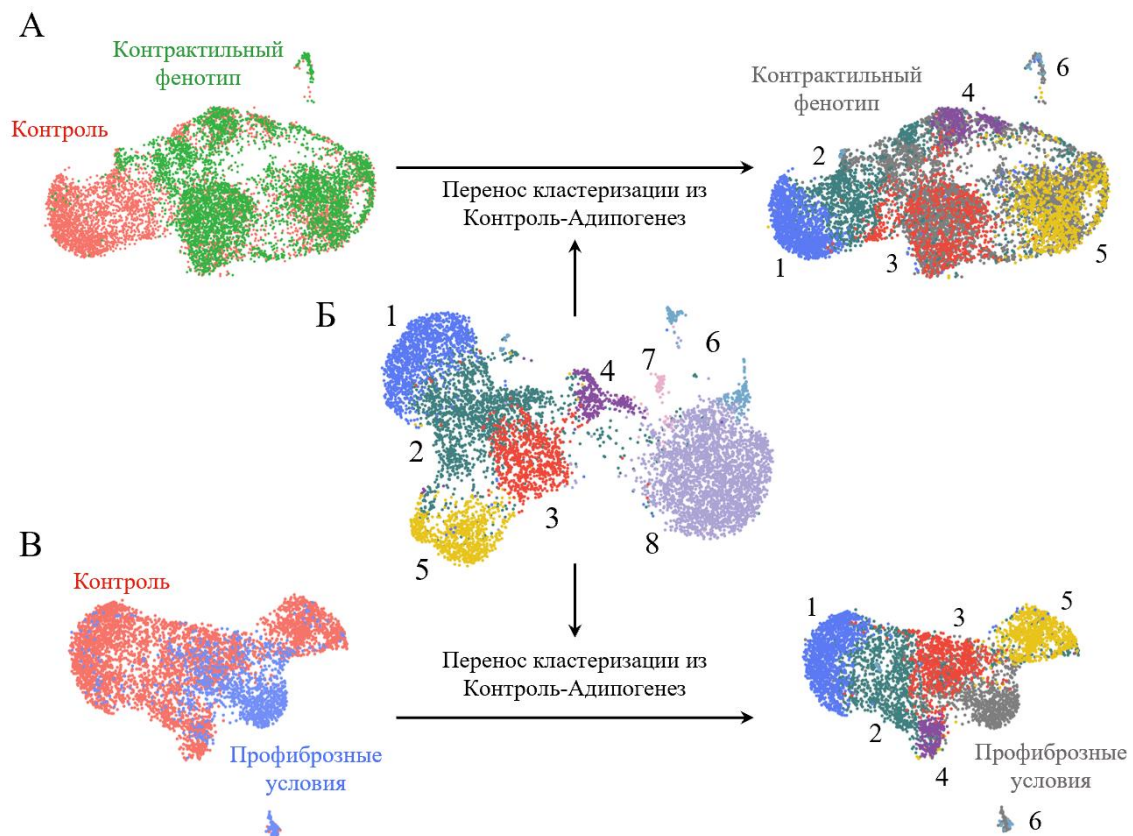


Рис. 3 Различные направления дифференцировки МСК связаны с формированием универсального инициированного состояния. А. Перенос кластеризации из массива данных Контроль-Адипогенез (Б) в интегрированные данные Контроль-Контрактивный. В. Перенос кластеризации из массива данных Контроль-Адипогенез (Б) в интегрированные данные Контроль-Фиброз.

Для нормального функционирования стволовых клеток важным компонентом является ниша стволовой клетки (Нимирицкий et al., 2018). Так, для эпителиальных стволовых клеток показано существование морфологически четко выявляемых структур, в которых располагаются стволовые клетки (Singh et al., 2019; Wilson and Trumpp, 2006). 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 дискуссионным, поскольку в тканях не обнаружены воспроизводимые структуры, которые могли бы соответствовать нише стволовой стромальной клетки (Kuhn and Tuan, 2010). 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.

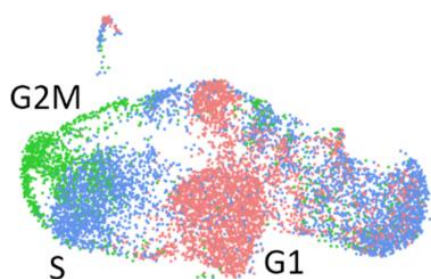
Пролиферация МСК как ключевой процесс самообновления

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, самообновлению МСК может соответствовать пролиферация этих клеток с последующим возвратом в функциональное базальное состояние.

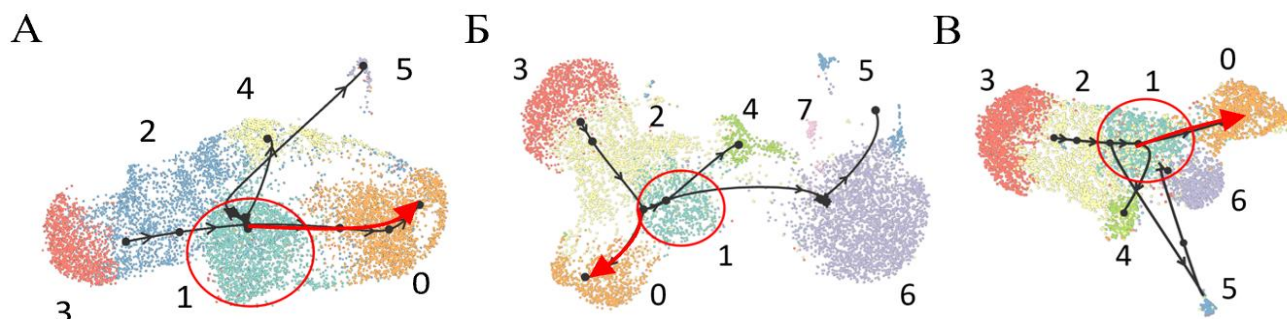
Иницированное состояние как ключевой этап направления МСК в пролиферацию

Для выяснения условий перехода МСК в пролиферацию и механизмов регуляции этого процесса мы на первом этапе воспользовались методами scRNAseq. Мы выяснили, какие кластеры МСК соответствовали пролиферирующим клеткам при помощи двух инструментов по предсказанию стадии клеточного цикла по транскрипционному профилю клеток. Как показано на Рис. 4 (приведен один из результатов анализа), клетки, относящиеся к кластеру 0, находились в стадии клеточного цикла подготовки к митозу (G2-фаза) или непосредственно митоза (M-фаза).



Аналогично, кластеры 0 на массивах Контроль-Адипогенная дифференцировка и Контроль-Фиброз соответствовали делящимся клеткам (Рис. 3, В-Г). Как видно из рассчитанных траекторий развития клеток, МСК направлялись в митоз строго из иницированного состояния при всех направлениях дифференцировки (Рис. 5).

←Рис. 4. Расчет состояния клеточного цикла при помощи биоинформатического подхода scVelo.



↑Рис. 5. В самообновление МСК направлялись из иницированного состояния. А. – контрактильная дифференцировка, Б. – адипогенная дифференцировка, В. – фиброзная дифференцировка. Иницированное состояние обведено красным кругом.

Ключевые регуляторы пролиферативной активности МСК

Для выяснения механизмов регуляции пролиферативной активности МСК мы стимулировали пролиферацию при помощи ключевого фактора роста, регулирующего митогенную активность МСК – тромбоцитарного фактора роста (PDGF). 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. 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 разрушает непосредственно пероксид водорода. Пероксид водорода выступает в данном случае в качестве вторичного посредника (Рис. 6). 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. 7). Таким образом, МСК направлялись в пролиферацию через промежуточное иницированное состояние, а ключевой митоген МСК, PDGF, регулировал деление этих клеток редокс-зависимым образом.

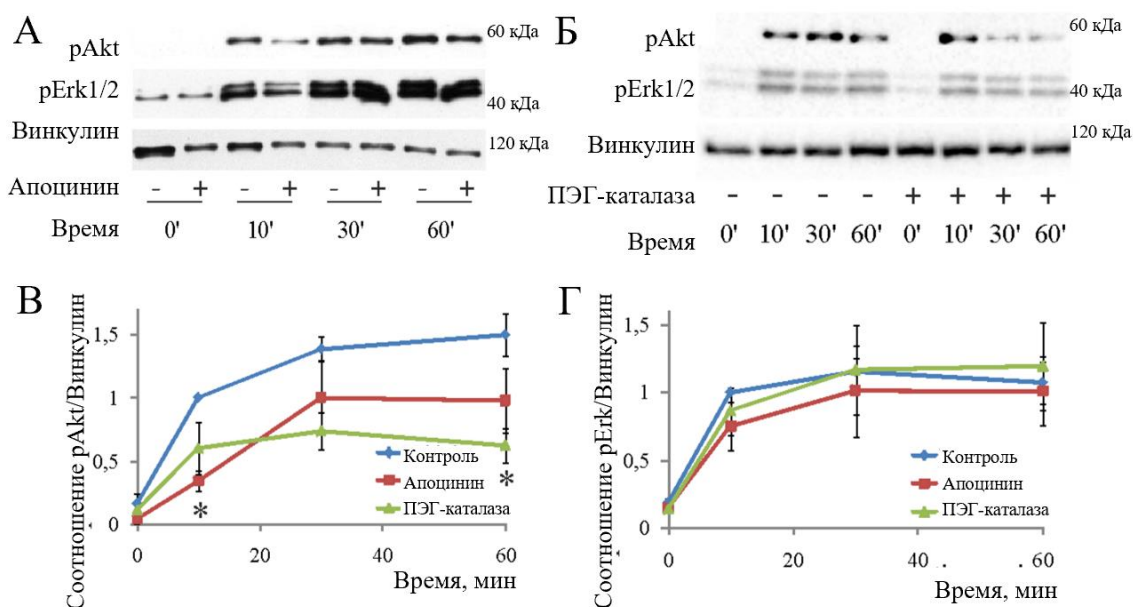


Рис. 6. PDGF-зависимая активация РКВ/Akt-зависимого, но не Erk1/2-зависимого сигнального каскада носила редокс-зависимый характер. А-Б. – репрезентативные мембраны вестерн-блоттинга, показывающие влияние апоцинина (А) и ПЭГ-каталазы (Б) на кинетику фосфорилирования РКВ/Akt и Erk1/2 в МСК, стимулированных PDGF. Для контроля загрузки использовали окрашивание винкулином. В-Г. – Статистический анализ изменения фосфорилирования РКВ/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.

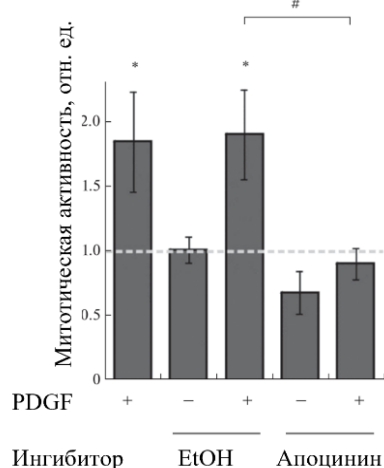


Рис. 7. Ингибирование образования пероксида водорода апоцинином предотвращало PDGF-зависимое усиление пролиферации стромальных клеток. EtOH – этанол, растворитель апоцинина. PDGF добавлен в концентрации 10 нг/мл.

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

Биоинформатический анализ показал, что МСК направлялись в пролиферацию из того же иницированного состояния, в котором они осуществляют 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 B/Akt. 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 H_2O_2 , и антиоксидант (Altenhofer et al., 2015). Во-вторых, это проникающая в клетку ПЭГ-каталаза, быстро разрушающая образующийся H_2O_2 (Viau et al., 1986). При этом другой фактор роста, EGF, тоже усиливал митотическую активность стромальных клеток, но его эффект не зависел от H_2O_2 , и он не активировал РКВ/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 (Jones and Kazlauskas, 2001; Plotnikov et al., 2011) 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 ГСК показано, что в эндостальной нише она испытывает недостаток кислорода, что HIF1-зависимым образом поддерживает ее в стволовом состоянии (Simsek et al., 2010). При делении ГСК в эндостальной нише обе дочерние клетки остаются стволовыми и не идут в дифференцировку.

Механизмы перехода МСК в иницированное состояние

Норадреналин как регулятор инициации МСК

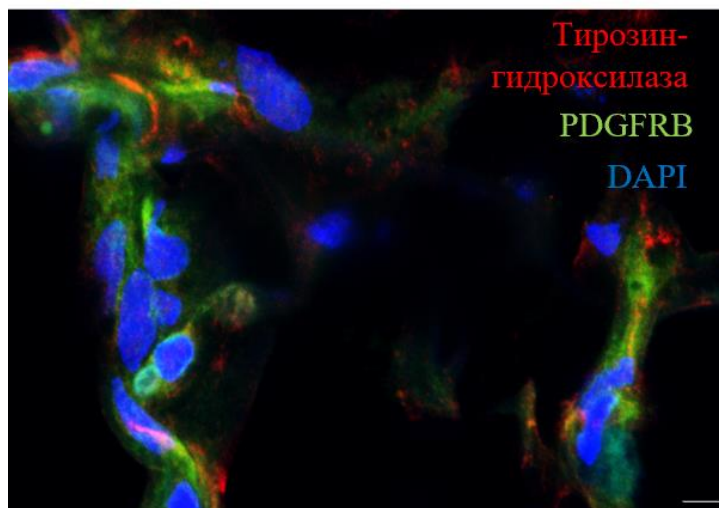


Рис. 8. Норадреналин является ключевым регулятором МСК в стромальной нише. Микрофотография иммуногистохимической окраски МСК и симпатических волокон в подкожной жировой ткани человека. Маркер МСК – PDGFR β (зеленый), маркер симпатических волокон – тирозин-гидроксилаза (красный); ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 10 μ М.

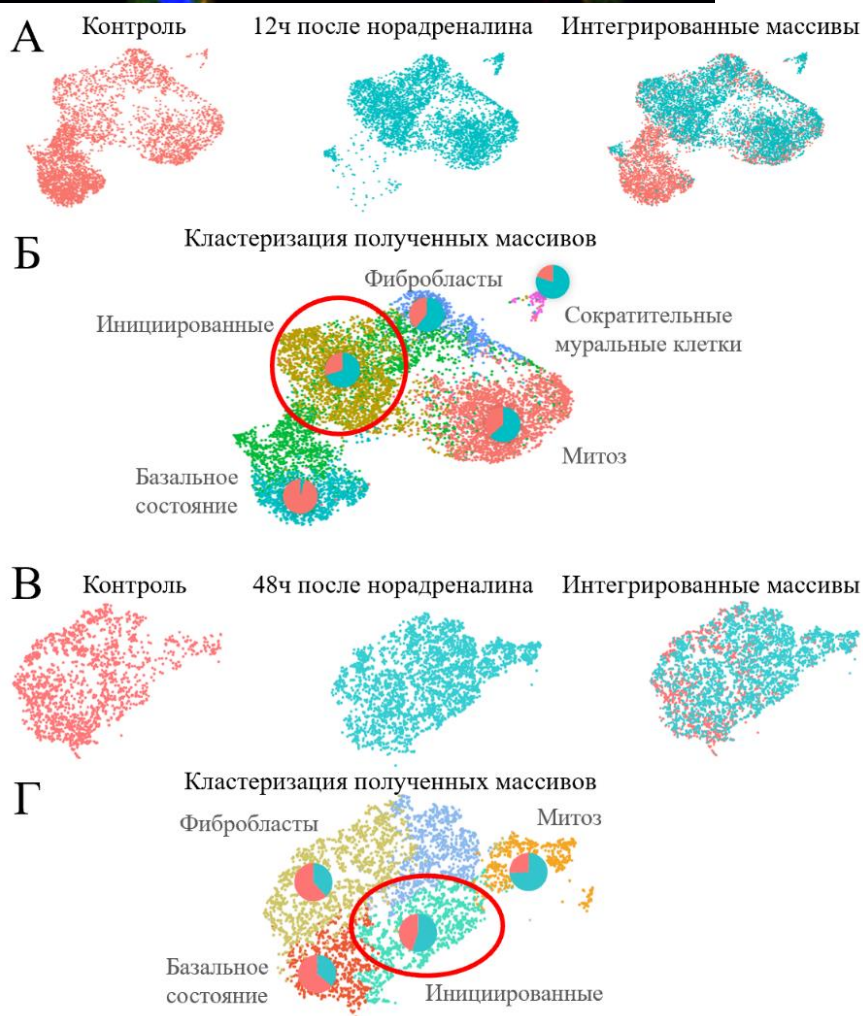


Рис. 9. Анализ транскриптома одиночных клеток после воздействия норадреналина на МСК. Анализ был проведен через 12 часов после обработки клеток (А-Б) и через 48 часов (В-Г). Красным цветом показаны контрольные массивы клеток (обработанных средой с растворителем без норадреналина), голубым – МСК, обработанные 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).

Для поиска сигнальных механизмов перевода МСК в инициированное 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 (Isern and Mendez-Ferrer, 2011; Mendez-Ferrer et al., 2010). Более того, процесс кроветворения СНС регулирует исключительно через посредничество МСК, не влияя напрямую на гематопозитические клетки-предшественники. При деплеции МСК в костном мозге исчезает симпатическая регуляция кроветворения (Mendez-Ferrer et al., 2010). 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. 8, 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 1 μ M норадреналина в течение 1 часа с интервалом в 5 часов. Как видно на Рис. 9, 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. 9, В-Г). Таким образом, стимуляция МСК норадреналином приводила к транзиторному 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.

Сигнальные механизмы инициации МСК под действием норадреналина

На первом этапе выяснения адренергических сигнальных механизмов перевода МСК в инициированное состояние мы проанализировали представленность различных изоформ AP на поверхности МСК и их функциональную активность. Для идентификации типов и подтипов AP, экспрессируемых МСК, мы использовали проточную цитометрию. МСК экспрессировали на своей поверхности AP α 1A, α 1B, α 2A, α 2B, β 1, β 2 и β 3 (Рис. 10, А). МСК, выделенные из ткани от разных доноров, демонстрировали схожий фенотип (>99% этих клеток были CD105+CD73+CD90+CD45-) и проявляли схожие способности к дифференцировке, являясь мультипотентными. Процент клеток, экспрессирующих различные изоформы AP, сильно разнился у разных доноров и не зависел от их пола, возраста и ИМТ. Среди 13 проанализированных пациентов было 7 мужчин и 6 женщин, возраст разнился от 27 до 63 лет (средний 42,8), ИМТ – от 19 до 28 (средний 23,3). Что интересно, МСК большинства доноров содержали небольшое количество клеток, экспрессирующих изоформы β 2 и β 3 (медианы 6 и 1%, соответственно) (Рис. 10, Б), несмотря на то, что именно эти рецепторы считаются основными AP для МСК (Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Mendez-Ferrer et al., 2010).

Мы проанализировали функциональную активность AP, экспрессируемых МСК. Как было показано выше, МСК экспрессировали α 1-, α 2- и β -AP. Все они являются семидоменными рецепторами, ассоциированными с тримерными G-белками. α 1-AP ассоциированы с Gq, который запускает фосфоинозитидный обмен и кальциевую сигнализацию. На уровне единичных клеток кальциевую сигнализацию можно регистрировать при помощи кальциевых красителей.

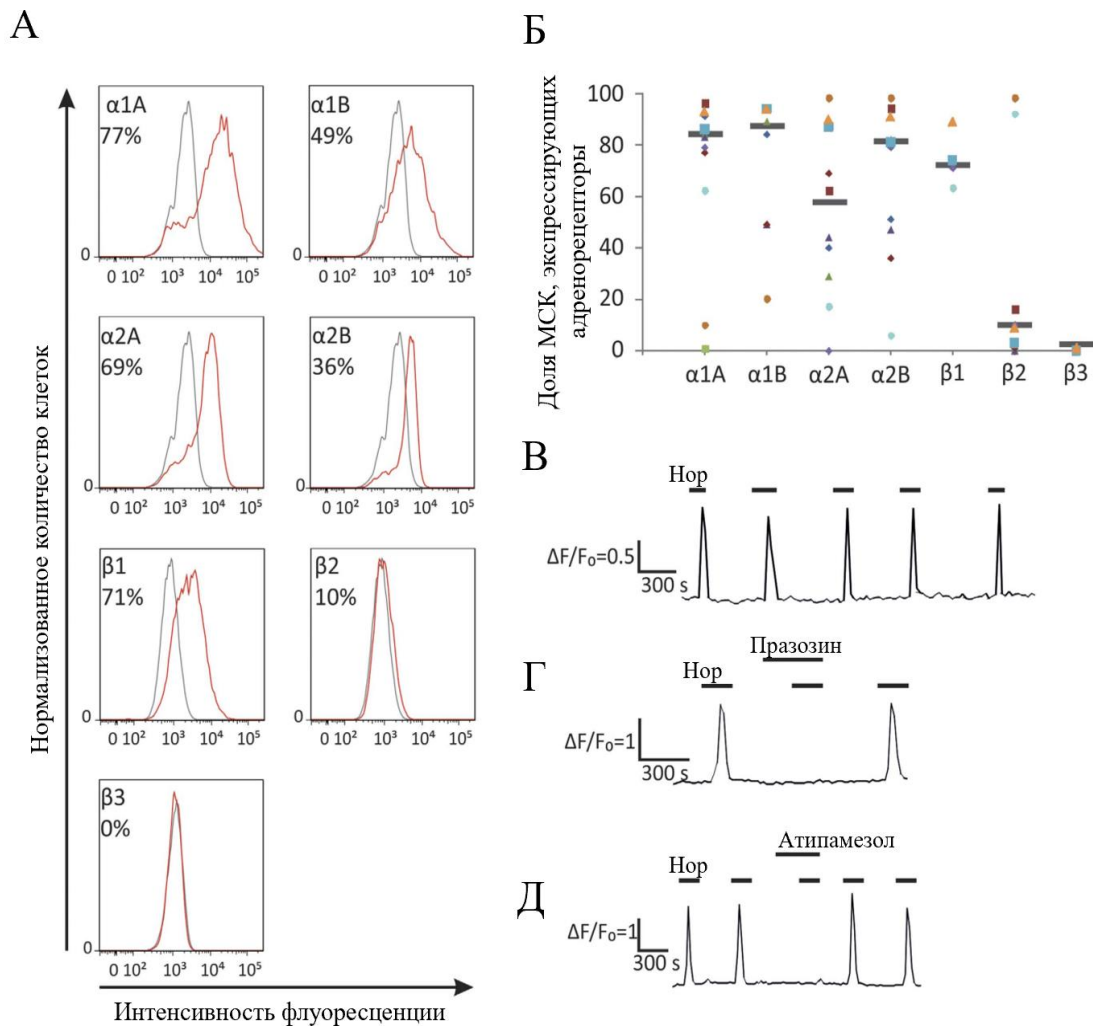


Рис. 10. Представленность различных изоформ АР на поверхности МСК и их функциональная активность. А. – Проточная цитометрия на представленность различных изоформ АР. Клетки фиксированные непермеабиллизованные. Б. – Представленность различных изоформ АР. Значками одного цвета показаны измерения изоформ 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).

$\alpha 2$ -АР ассоциированы с G_i , который ингибирует аденилатциклазы. Для G_i показано, что комплекс $\beta\gamma$ -субъединиц может активировать кальциевую сигнализацию через фосфоинозитидный обмен или через вход кальция через плазматическую мембрану (Cottingham et al., 2011; Dorn et al., 1997). β -АР 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 $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -АР мы регистрировали изменение внутриклеточного уровня Ca^{2+} на уровне единичных клеток при помощи флуоресцентного красителя Fluo-8. Мы серийно стимулировали клетки норадреналином или норадреналином в присутствии антагонистов различных АР для функционального разделения изоформ рецепторов. Клетки специфически отвечали на серийную стимуляцию 1 μM норадреналина (Рис. 10,В). Поскольку практически 100% МСК экспрессировали $\alpha 1$ -АР, 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 $\alpha 1$ -антагонист празозин (10 μM) полностью блокировал действие норадреналина в части клеток ($26 \pm 4\%$ от ответивших) (Рис. 10,Г) и $\alpha 2$ -антагонист атипамезол (100 μM) – в других клетках ($67 \pm 7\%$ от ответивших) (Рис. 10,Д). Можно предположить, что в остальных клетках, отвечавших кальцием на норадреналин, ответ мог активироваться несколькими разными АР. Поскольку МСК на уровне единичных клеток отвечали на норадреналин по принципу все-или-ничего, аддитивности между ответами, активируемыми различными изоформами рецепторов, мы не наблюдали.

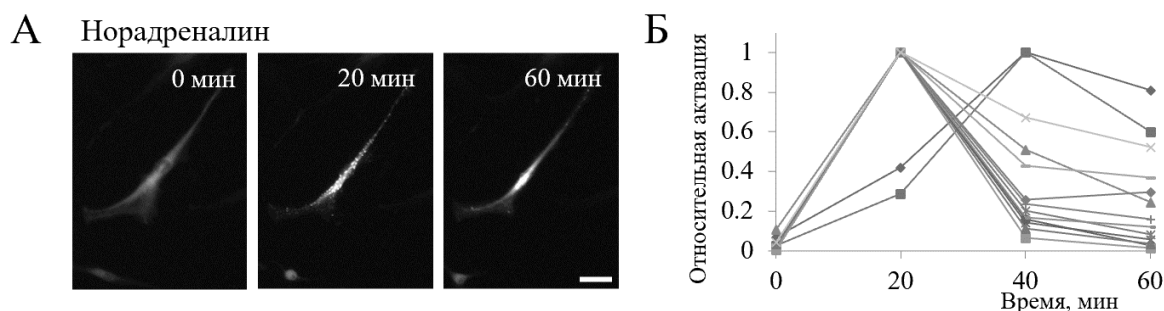


Рис. 11 А-Б. – Репрезентативные фотографии (А) и графики (Б) цАМФ-зависимых ответов на норадреналин. Линии показывают динамику ответа отдельных клеток на норадреналин. Активность протеинкиназы А регистрировали при помощи биосенсора РКА-Spark. Масштаб 10 μM .

Мы также проанализировали цАМФ-зависимые ответы на стимуляцию МСК норадреналином. Для этого мы использовали генетически-кодируемый внутриклеточный биосенсор РКА-Spark (Zhang et al., 2018). Этот биосенсор в ответ на активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы А обратимо собирается в агрегаты в цитоплазме. На Рис. 11 показан репрезентативный ответ МСК на норадреналин при регистрации биосенсором РКА-Spark. МСК отвечали цАМФ-зависимым образом на норадреналин гетерогенно (отвечали $34,7 \pm 5,5\%$ клеток популяции МСК). Кроме того, как видно на Рис. 11, Б, 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 АР, которые запускают и кальций-зависимые, и цАМФ-зависимые сигнальные каскады, лишь небольшая часть из них оказывалась функционально активными.

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 μM 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. 12, А). Поскольку известно, что гормоны могут регулировать чувствительность клеток к самим себе, мы предположили, что норадреналин может влиять на функциональную активность АР 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 (Luttrell and Gesty-Palmer, 2010; von Zastrow, 2001; Zeiders et al., 1999). 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. 12, Б-В).

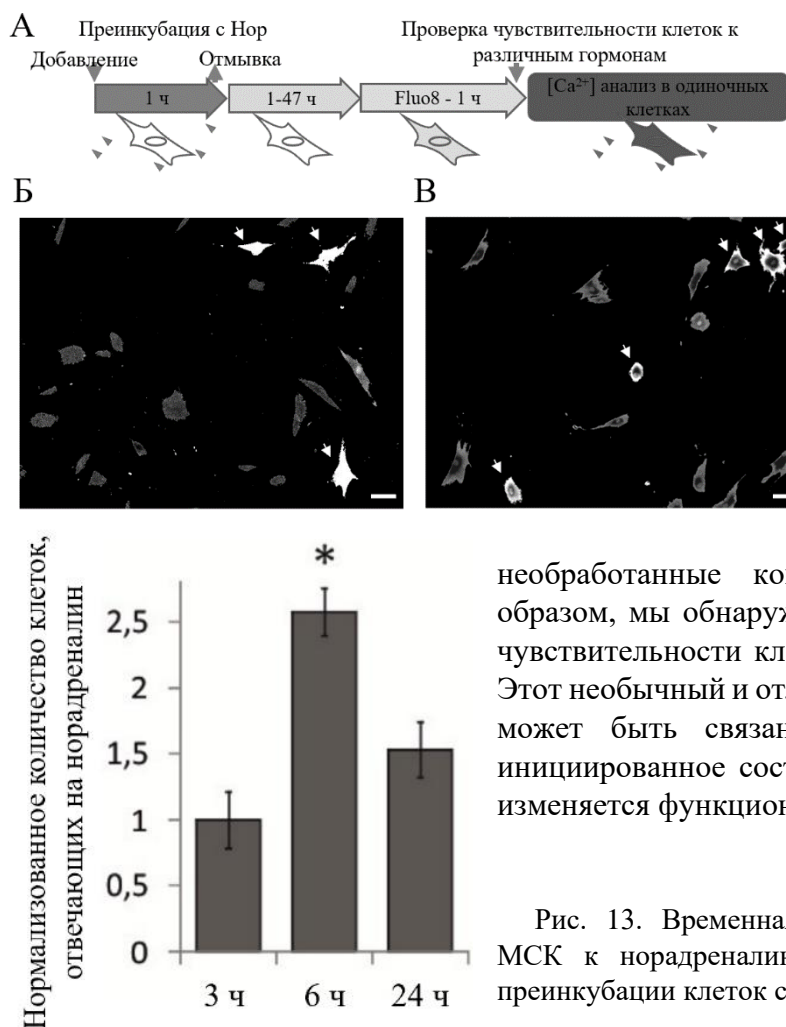


Рис. 12. Преинкубация МСК с 1 μ М норадреналина. А. – Схема обработки МСК норадреналином с последующим измерением восприимчивости клеток к различным гормонам. Б-В. – Изображения отвечающих клеток контрольных (Б) и преинкубированных с норадреналином через 6 часов после преинкубации (В). Масштаб 20 μ М.

Эффект был ограниченным по времени. Через 3 или 24 часа МСК реагировали так же, как и

необработанные контрольные клетки (Рис. 13). 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 краткое время изменяется функциональная активность клеток.

Рис. 13. Временная развертка изменения чувствительности МСК к норадреналину (по кальциевой сигнализации) после преинкубации клеток с норадреналином.

Норадреналин-зависимое повышение чувствительности МСК к норадреналину связано с повышением уровня α 1A-AP

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 отвечающих клеток. Мы проанализировали, как изменялась чувствительность МСК к норадреналину после преинкубации с этим гормоном. МСК отвечали на норадреналин по принципу все-или-ничего, который связан с активным механизмом кальций-индуцированного выхода кальция (CICR). Это нам позволило измерить пороговые концентрации норадреналина, при которых появлялся ответ для измерения чувствительности МСК. Для этого на МСК, окрашенные кальциевым красителем Fluo-8, воздействовали ступенчато повышающимися концентрациями норадреналина (15 точек в диапазоне 10нМ-2000нМ) и регистрировали кальциевые ответы клеток. В контрольных МСК пороговый уровень норадреналина составлял 431 ± 71 нМ. При этом преинкубация МСК с норадреналином через 6 часов приводила к более чем пятикратному повышению их чувствительности к норадреналину. Пороговое значение ответа клеток снизилось до 88 ± 18 нМ, $p < 0,001$ (Рис. 14). Таким образом, норадреналин при действии на МСК вызывал транзиторное повышение чувствительности МСК к норадреналину.

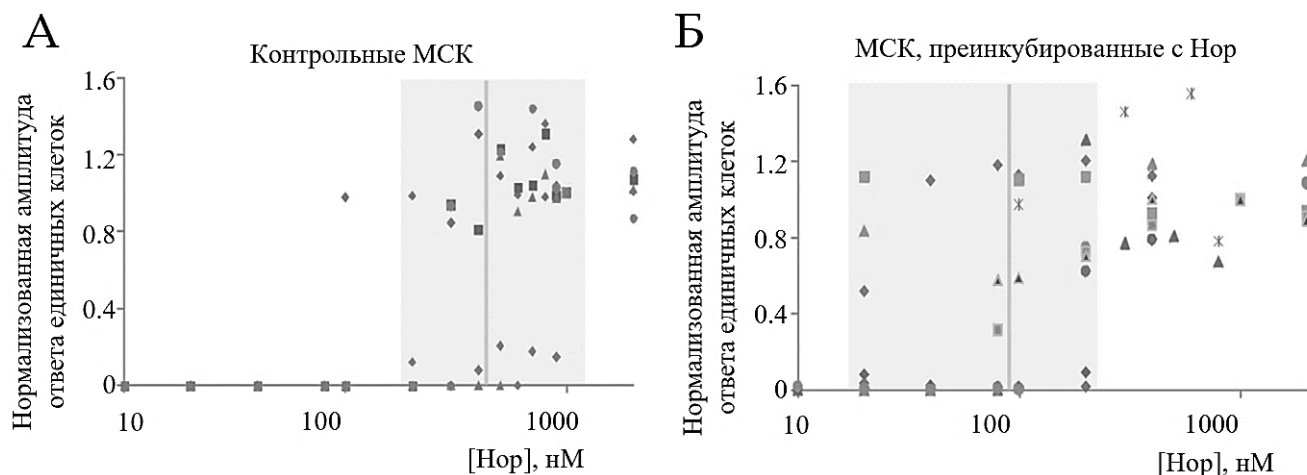


Рис. 14. Определение чувствительности МСК к норадреналину в контрольных клетках и через 6 часов после их преинкубации с норадреналином. Серая область на рисунке показывает интервал концентраций норадреналина, в котором клетки начинали отвечать. При этом клетки отвечают сразу максимально возможной амплитудой 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.

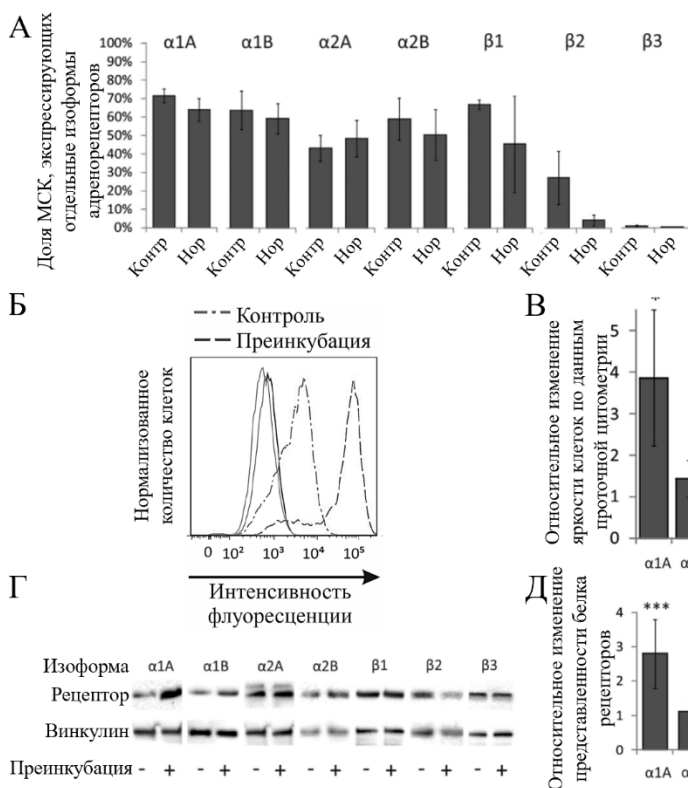


Рис. 15. Стимуляция норадреналином увеличивала количество $\alpha 1A$ -АР в МСК. А. – Доля МСК, содержащих АР, после преинкубации с Нор по сравнению с необработанными клетками (Контроль). Б. – Репрезентативные графики проточной цитометрии с антителами против $\alpha 1A$ -АР в МСК через 6 часов после стимуляции норадреналином (синие кривые), по сравнению с контрольно обработанными МСК (красные кривые). Графики IgG серые. В. – Относительное изменение интенсивности флуоресценции МСК по данным проточной цитометрии. Г. – Репрезентативные мембраны вестерн-блоттинга с окрашенными изоформами АР в контрольных МСК и МСК, преинкубированных с 1 μ М норадреналина. Д. – Среднее относительное изменение экспрессии АР по данным вестерн-блоттинга в клетках, предварительно обработанных 1 μ М норадреналина, по сравнению с контрольными клетками. Ср.зн. \pm ст.ош., n=8-10, *p<0,05.

в контрольных МСК и МСК, преинкубированных с 1 μ М норадреналина. Д. – Среднее относительное изменение экспрессии АР по данным вестерн-блоттинга в клетках, предварительно обработанных 1 μ М норадреналина, по сравнению с контрольными клетками. Ср.зн. \pm ст.ош., n=8-10, *p<0,05.

Для выяснения механизма повышения чувствительности МСК к норадреналину мы проанализировали экспрессию АР в МСК через 6 часов после преинкубации с 1 μ М норадреналина. Мы проанализировали количество МСК, экспрессирующих отдельные изоформы АР. Как видно на Рис. 15, А, доля клеток, положительных по экспрессии рецепторов, существенно не изменилась. Для оценки количества молекул рецептора, представленных на

поверхности клеток, мы измерили среднюю интенсивность флуоресценции окрашенных антителами к АР МСК. Представленность $\alpha 1A$ -АР на поверхности МСК существенно (практически в 4 раза) выросла после преинкубации МСК с норадреналином (Рис. 15, Б-В).

Это указывало на увеличение плотности $\alpha 1A$ -АР на поверхности клетки, что могло быть связано с повышенным выходом рецепторов. При этом уровень других изоформ АР 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. Общее содержание белка $\alpha 1A$ -АР также повышалось в МСК, преинкубированных с норадреналином (Рис. 15, Г-Д). Это означает, что действие норадреналина приводило к синтезу дополнительного числа молекул $\alpha 1A$ -АР и выходу их на поверхность МСК.

Кроме того, мы проанализировали функциональность вышедших на поверхность $\alpha 1A$ -АР (Рис. 16). После преинкубации с норадреналином доля клеток, отвечающих на $\alpha 1$ -агонист фенилэфрин, выросла в 2 раза, тогда как доля МСК, отвечающих на $\alpha 2$ -агонист клонидин, не изменилась. Таким образом, норадреналин транзиторно повышал чувствительность МСК к катехоламинам за счет повышения общего клеточного содержания функционально-активных $\alpha 1A$ -АР и их выхода на поверхность клетки.

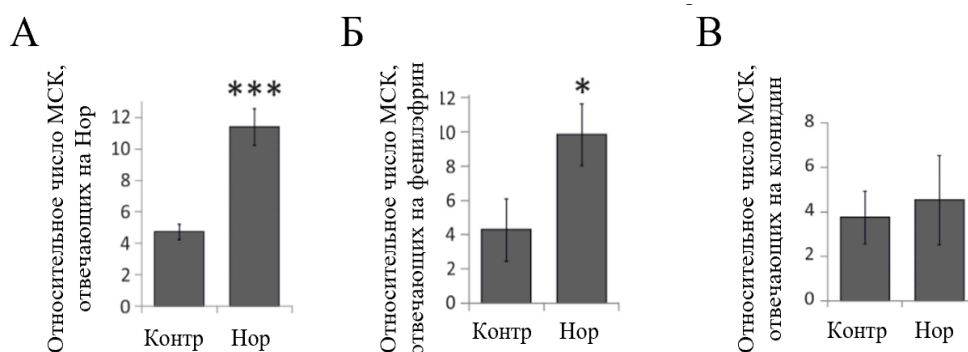
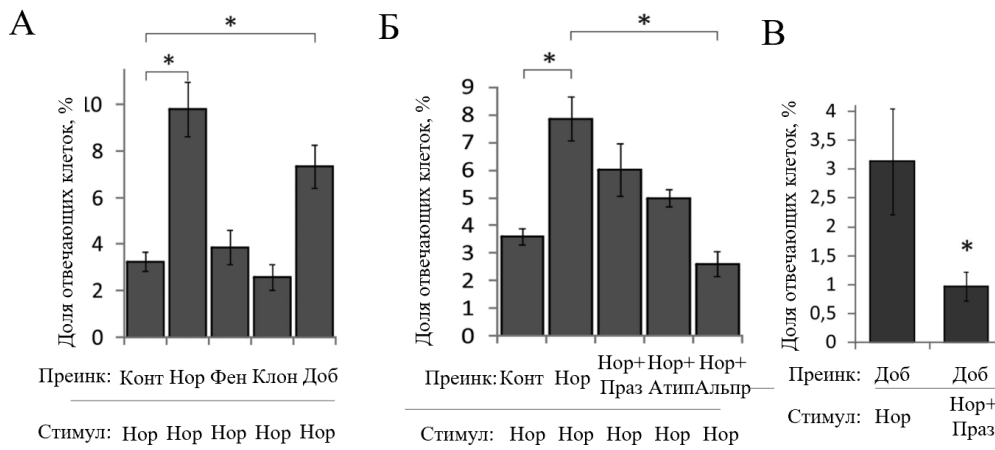


Рис. 16. А. – Доля МСК, отвечающих на Нор (А), на на $\alpha 1$ -агонист фенилэфрин (100 μM) (Б), на на $\alpha 2$ -агонист клонидин (100 μM) (В) через 6 ч. после преинкубации с 1 μM Нор. Ср.зн. \pm ст.ош., n=10-12, *p<0,05, ***p<0,001.

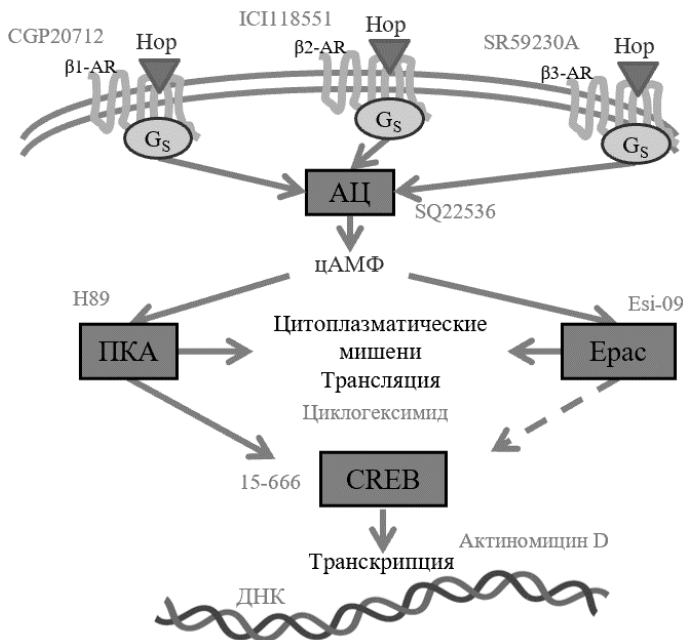
Механизмы норадреналин-зависимого повышения чувствительности МСК к норадреналину

В продолжение работы мы установили, какие изоформы АР и их сигнальные каскады ответственны за сенситизацию МСК к норадреналину. МСК стимулировали специфическими агонистами АР, а также норадреналином в присутствии антагонистов. После обработки клеток через 6 ч. регистрировали кальцевый ответ на норадреналин. Только β -агонист добутамин увеличивал число отвечающих МСК (Рис. 17, А). Антагонист β -АР альпренолол предотвращал сенситизацию МСК (Рис. 17, Б). Также показали, что добутамин сенситизировал МСК путем активации именно $\alpha 1$ -АР (Рис. 17, В). Таким образом, увеличение числа клеток, чувствительных к норадреналину, в результате воздействия норадреналина осуществляется через β -АР.

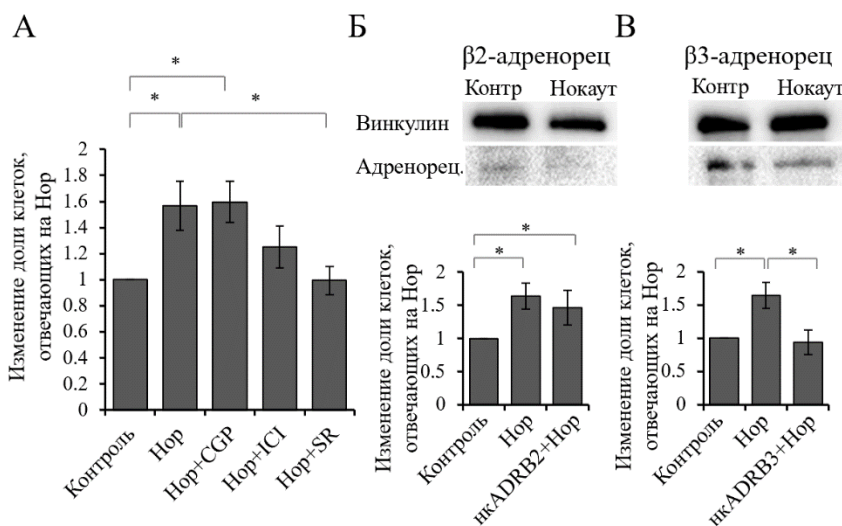
β -АР передают сигналы преимущественно через активацию Gs-белка, запуск АЦ и синтез цАМФ. Далее цАМФ активирует протеинкиназу А либо белок Ерас. У обоих белков имеются как цитоплазматические, так и ядерные мишени (Рис. 18). Для выяснения механизма регуляции чувствительности МСК к норадреналину мы проанализировали эти сигнальные каскады. При помощи ингибиторного анализа мы выяснили, какая конкретно изоформа β -АР опосредует действие норадреналина на чувствительность МСК. Мы использовали специфические ингибиторы $\beta 1$ -АР (CGP20712, 0.1 μM), $\beta 2$ -АР (ICI118551, 0.05 μM) и $\beta 3$ -АР (SR59230A, 0.25 μM). Как показано на Рис. 19, А, ингибирование $\beta 3$ -АР нивелировало потенцирующий эффект норадреналина, поскольку только в случае SR наблюдалось статистически достоверное снижение по сравнению с выборкой Нор. Ингибирование $\beta 2$ -АР показывало статистически не значимую тенденцию к снижению эффекта.



↑Рис. 17. β -АР регулировали количество МСК, реагирующих на норадреналин. А-Б. – Доля МСК, реагирующих на норадреналин через 6 часов после предобработки агонистами: 1 μ М Нор, 100 μ М α 1-АР фенилэфрином (Фен), 100 μ М α 2-АР клонидином (Клон), 1 μ М β -АР добутамином (Доб) или Нор в присутствии антагонистов АР: 10 μ М α 1-АР празозина (Праз), 100 μ М α 2-АР атипамезола (Атип), 10 μ М β -АР альпренолола (Альпр). В. – Доля МСК, реагирующих на норадреналин либо норадреналин в присутствии α 1-антагониста празозина (Нор+Праз, 10 μ М) через 6 часов после предварительной инкубации с норадреналином. Ср.зн. \pm ст.ош., n=6-21, *p<0,05.



←Рис. 18. Схема β -АР-зависимого сигнального пути с ключевыми мишенями участие которых в развитии эффекта сенситизации к норадреналину проверялось при помощи ингибиторного анализа. Используемые ингибиторы указаны серым.



←Рис. 19. Выяснение изоформы β -АР. А. – Ингибиторный анализ β -АР, инициирующих повышение чувствительности МСК к норадреналину. β 1-антагонист CGP20712 (100 нМ, CGP), β 2-антагонист ICI118551 (50 нМ, ICI) и β 3-антагонист SR59230A (250 нМ, SR) Ср.зн. \pm ст.ош., n = 12-19, *p <0,05. Б-В. – CRISPR-Cas9-опосредованное подавление экспрессии β -АР. Сверху - вестерн-блот-анализ уровня экспрессии β 2-АР (Б) и β 3-АР (В) после нокаута, соответственно, *ADRB2* или *ADRB3* в ASC52telo. Ниже в каждом блоке

представлены графики относительного изменения доли клеток, ответивших на норадреналин после преинкубации с норадреналином линейных МСК (линия ASC52, столбцы «Контроль», «Нор»), а также клеток после нокаута *ADRB2* (Б) или *ADRB3* (В). Ср.зн. \pm ст.ош., n = 4-7, *p <0,05.

Ключевую роль β 3-АР в описываемом процессе мы дополнительно проверили при помощи нокаута белка с использованием CRISPR-Cas9 системы (Рис. 19, Б-В). Для подавления экспрессии этих рецепторов в данном эксперименте мы использовали иммортализованные МСК жировой ткани – коммерчески доступную линию ASC52-telo. Поскольку ингибирование β 2-АР химическими ингибиторами показывало тенденцию к подавлению эффекта, их вклад в эффект норадреналина мы тоже проверили путем нокаута. Нокаут β 3-, но не β 2-АР привел к предотвращению норадреналин-зависимого повышения чувствительности МСК к норадреналину (Рис. 19, Б-В).

Для выяснения компонентов сигнальных каскадов, задействованных в реализации эффекта норадреналина на МСК, мы провели ингибиторный анализ. Активация АЦ форсколином (1 μ М) имитировала эффект норадреналина. При этом ингибитор АЦ SQ22536 (1 μ М), предотвращал эффект норадреналина. Ингибиторы PKA (H89, 5 μ М) и Ерас (Esi09, 10 μ М) показали вклад протеинкиназы А, но не Ерас в развитие эффекта сенситизации (Рис. 20). Сенситизация МСК была не связана с усилением транскрипции гена α 1А-АР, но ассоциирована с трансляцией мРНК. Ингибитор транскрипции актиномицин D (4 нМ) не влиял на эффект, тогда как подавление трансляции циклогексимидом (90 нМ) предотвращало сенситизацию.

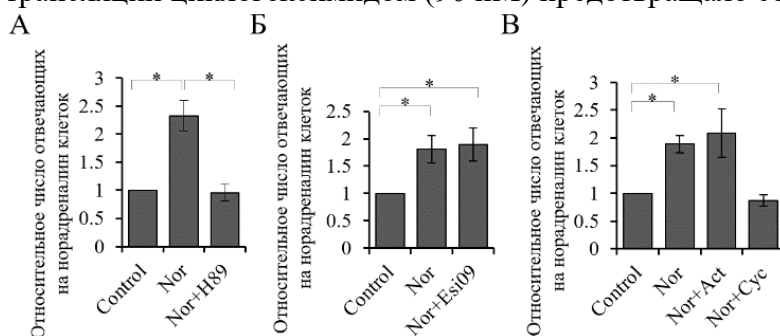


Рис. 20. Ингибиторный анализ сигнальных каскадов, активируемых β -АР. А-Б. H89-ингибитор PKA (5 μ М, n=7-8), Esi09- ингибитор ЕРАС (10 μ М, n=7-10). В-Г. –Ингибирование транскрипции актиномицином D (Act, 4 нМ, n = 14) и трансляции циклогексимидом (Cyc, 90 нМ, n = 8-10) Ср.зн. \pm ст.ош. * p < 0,05.

Уровень мРНК α 1А-АР не изменялся несмотря на рост экспрессии белка. Таким образом, чувствительность МСК к норадреналину регулировалась за счет активации β 3-АР, которые запускали цАМФ-зависимым образом PKA. Последняя, действуя на цитоплазматические мишени, повышала уровень белка α 1А-АР, не затрагивая транскрипцию его гена.

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

Показанный нами эффект повышения чувствительности клеток к действующему на них гормону является уникальным для клеток взрослого организма. При этом схожий сигнальный феномен показан в эмбриогенезе. При созревании адренергической сигнализации в эмбриогенезе чувствительность клеток за счет экспрессии β -АР появляется раньше, чем начинают синтезироваться катехоламины (Fujinaga and Scott, 1997). При появлении катехоламинов β -АР клеток сердца не десенситизируются и не подавляются β -агонистами (Zeiders et al., 1999). Наоборот, стимуляция β -агонистами приводит к повышению чувствительности этих клеток к катехоламинам. Согласно нашим данным, норадреналин приводит к транзитной сенситизации МСК к катехоламинам. Однако, в отличие от эмбриональных тканей, стимуляция МСК катехоламинами приводила к специфическому повышению уровня экспрессии не β -, а α 1А-АР. Тем не менее, показанный феномен может свидетельствовать, что в МСК проявляются регуляторные механизмы, схожие с эмбриональными прогениторными клетками.

Мы показали один из возможных путей инициации МСК, которая производилась путем действия на стволовую клетку норадреналина. Последний выделялся из симпатических волокон, непосредственно иннервирующих МСК в ткани. Норадреналин воспринимался β 3-АР, которые запускали цАМФ-зависимые сигнальные каскады, в результате чего на поверхность клеток выходили α 1А-АР. Это приводило к изменению чувствительности МСК: на повторное воздействие норадреналина клетки отвечали уже не β 3-АР/цАМФ-путем, а α 1А-АР/ Ca^{2+} -зависимым. При этом значительно возрастала чувствительность МСК к норадреналину. Кроме

того, что представляется крайне важным, наблюдаемый сигнальный эффект носил транзиторный характер, что соответствует транзиторности перехода МСК в инициированное состояние.

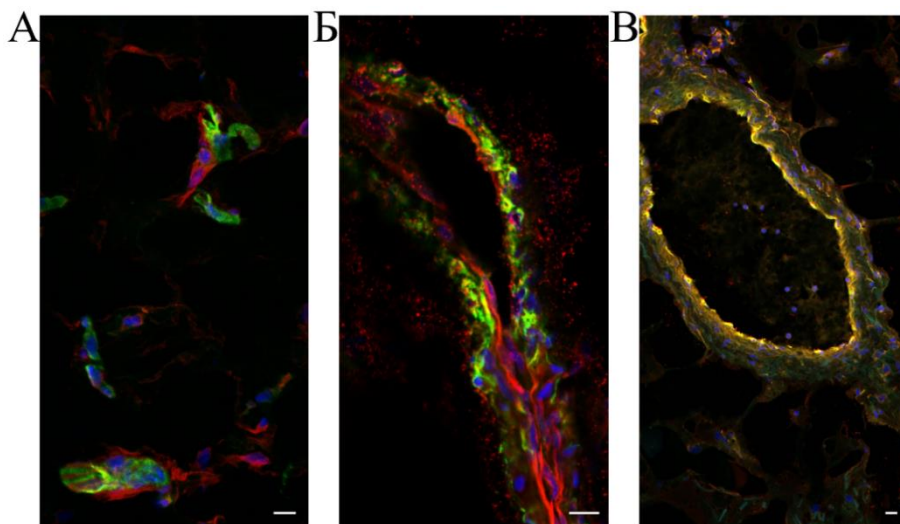
Подводя промежуточный итог, можно заключить, что МСК на начальных этапах активации переходили в особое функциональное состояние, которое мы назвали инициированным. В этом состоянии МСК приобретали возможность произвести выбор дальнейшей судьбы клетки. Именно из этого состояния клетки направлялись на 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: увеличивалась чувствительность клеток к передаче сигнала от катехоламинов через кальций-зависимые $\alpha 1A$ -АР. В целом, можно предположить, что инициированное состояние являлось ключевым этапом выхода МСК из стромальной ниши, которая носит не структурный характер, а функциональный.

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 СК в дифференцировку или самообновление, но при этом сами по себе не задают направления выбора судьбы клетки. Они необходимы, но не достаточны для прохождения дифференцировки СК. В данном случае пермиссивным сигналом выступал стимуляция $\beta 3$ -АР. После действия пермиссивного сигнала на СК должен подействовать инструктивный сигнал, который она воспринимает только в инициированном состоянии, и который определяет направление дифференцировки СК. Для поиска инструктивных сигналов мы на первом этапе проверили роль выходящих на поверхность МСК $\alpha 1A$ -АР.

Локализация $\alpha 1A$ -АР в жировой ткани

Перед началом изучения роли $\alpha 1A$ -АР в регуляции функциональной активности МСК в жировой ткани мы выяснили, где располагаются в ткани клетки, экспрессирующие эти рецепторы. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов жировой ткани человека показало, что $\alpha 1A$ -АР экспрессировались в жировой ткани в районе кровеносных сосудов. При этом они не колокализировались с эндотелием (Рис. 21, А) и, что особенно удивительно, эти вазоконстрикторные рецепторы не колокализировались с ГМК (Рис. 21, Б). $\alpha 1$ -АР, в первую очередь, $\alpha 1A$ -изоформа, являются ключевыми АР, регулирующими контракцию малых резистивных сосудов в жировой ткани (Piascik and Perez, 2001; Rudner et al., 1999). Они являются сенсорами симпатических сигналов, которые ведут к контракции ГМК. В связи с этим, до сих



пор по умолчанию считалось, что $\alpha 1A$ -АР в составе сосудов экспрессируются на ГМК.

Рис. 21. Иммунофлуоресцентное окрашивание замороженных срезов подкожной жировой ткани человека, конфокальные изображения. $\alpha 1A$ -АР везде помечены красным. Эндотелий (секция А, CD31, зеленый). Гладкомышечные клетки (секция Б, α SMA, зеленый). Перicyты (секция В, PDGFR β , зеленый) Ядра Dapi (синий). Масштаб 10 μ М.

Согласно нашим результатам, $\alpha 1A$ -AP строго колокализовались с перицитами, экспрессирующими PDGFR β (Рис.21, Б). 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 контракцию ГМК. Стимулом к контракции может быть передача ряда цитокинов в растворимой форме. Кроме того, перициты обладают крайне высокой склонностью к образованию щелевых контактов, через которые может происходить прямая передача кальциевого сигнала при формировании контрактного ответа. Таким образом, $\alpha 1A$ -AP в жировой ткани локализовались периваскулярно и располагались на перицитах.

scRNaseq анализ изменения МСК в направлении контрактного фенотипа

Для анализа изменений МСК после стимуляции вышедших на поверхность инициированных МСК $\alpha 1A$ -AP мы воспользовались scRNAseq. Мы подвергли свежесыведенные МСК (1 пассаж) первичному воздействию норадреналина в течение 1 часа для их инициации и далее через 6 часов повторному воздействию норадреналина в течение 1 часа для стимуляции $\alpha 1A$ -AP. Контролем выступали те же МСК, но без воздействия норадреналина. Анализировали клетки через 12 часов после второго воздействия гормона. После интеграции сделали кластеризацию (Рис. 22). Проанализировали, как инициация клеток с последующим воздействием на вышедшие на поверхность $\alpha 1A$ -AP повлияет на ключевые субпопуляции МСК.

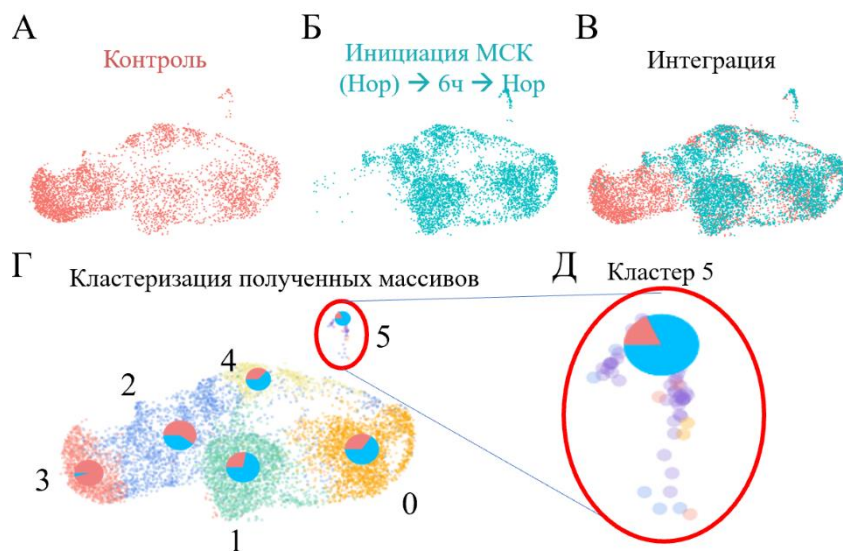


Рис. 22. scRNAseq анализ МСК жировой ткани в контрольных условиях (А, Контроль) и после двукратного воздействия норадреналина (Б, Инициация), при котором первое воздействие служило для инициации клеток, а при второй добавке норадреналина происходила стимуляция вышедших на поверхность клеток $\alpha 1A$ -AP. В. – Интеграция массивов. Г. – Кластеризация интегрированного массива. Д. – увеличенное изображение кластера 5, который проявил наибольшее повышение.

Мы попарно сравнили число клеток, попавших в каждую из субпопуляций в контрольном (красное) и опытном (синее) массивах. Результаты сравнения представлены на Рис. 22, Г в виде секторных графиков на фоне каждого из кластеров. Наибольший рост показал кластер контрактных клеток (кластер 5) Таким образом, двукратное действие норадреналина с интервалом в 6 часов привело к повышению числа контрактных клеток.

Чтобы установить, какой тип контрактных клеток образуется после воздействия на $\alpha 1A$ -AP после инициации МСК мы проинтегрировали наши образцы с референсным образцом стромально-васкулярной фракции жировой ткани (образец SRR12423012, находится в свободном доступе, из статьи (Hildreth et al., 2021)). В этом массиве данных клеток жировой ткани без культивирования охарактеризованы подтипы сосудистых клеток. Контрактные клетки кластера 5 полностью совпали ГМК жировой ткани *in vivo*.

Для анализа тенденций изменения всех клеток популяции мы проанализировали RNA velocity при помощи подходов Velocyto и scVelo. Они показали, что после инициации МСК с последующим воздействием на них норадреналина во всей популяции происходит рост экспрессии генов, ассоциированных с контрактным фенотипом, а не только в кластере 5.

Кроме того, мы проанализировали регулоны, которые оценивают активность транскрипционных факторов (алгоритм Scenic). В экспериментальном образце повысилась активность мастер-регуляторов контрактильных клеток и миогенной дифференцировки MEF2A (2,16 раз), NFATC3 (1,51 раз) и TEAD1 (1,78 раз). Эти транскрипционные факторы регулируют переход малодифференцированных клеток в сократительный фенотип и ГМК (Mask, 2011). 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.

Проверка дифференцировки МСК в контрактильные клетки функциональными тестами

Для проверки направления МСК в контрактильный фенотип после инициации с последующей стимуляцией норадреналином, мы произвели окраску клеток на α -гладкомышечный актин антителами и общий актин фаллоидином. Клетки приобрели выраженный контрактильный фенотип: у них проявились более выраженные стресс-фибриллы, а также в культуре появились клетки, экспрессирующие α -гладкомышечный актин. Таким образом, иммунофлуоресцентный анализ подтвердил повышение выраженности контрактильности МСК на уровне фенотипа.

Далее мы проверили, как влияет норадреналин на контрактильность МСК на функциональном уровне. Для этого мы провели тест контрактиции МСК-коллагеновых дисков. Для этого теста МСК помещали в трехмерное окружение коллагенового матрикса, после чего полученный МСК контрактировали полученный коллагеновый диск. Мы подготовили МСК-коллагеновые диски, после чего обработали их норадреналином для инициации МСК с последующим повторным воздействием норадреналина. Как видно на Рис. 23, МСК-коллагеновые диски после инициации клеток с последующим воздействием норадреналина на сенситизированные α 1A-AP контрактировали значительно быстрее, чем во всех остальных вариантах обработки клеток. 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. Необходима стимуляция вышедших на поверхность клеток α 1A-AP.

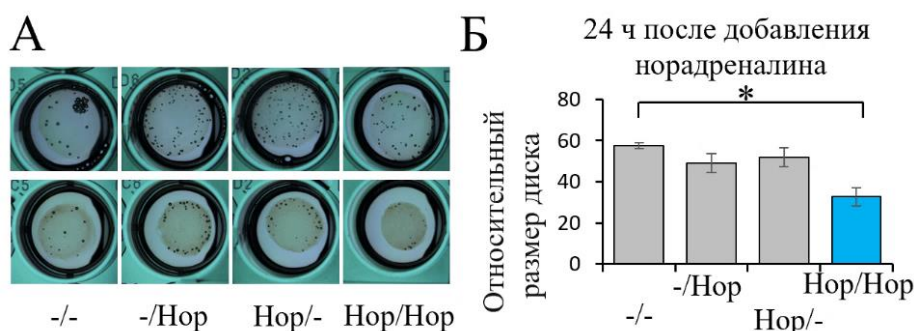


Рис. 23. Проверка изменения контрактильности МСК на функциональном уровне при помощи теста на контрактицию МСК-коллагеновых дисков. А. – Общая схема теста на контрактицию МСК-коллагеновых дисков. Б. – Схема эксперимента, проведенного нами. После заключения МСК

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. Ср.зн. \pm ст.ош. 3 донора, n = 4-6, * p < 0,05.

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

Ключевой регулятор контрактильности резистивных сосудов жировой ткани – это $\alpha 1A$ -АР. Мы выбрали физиологическую модель, в которой происходит повышение контрактильности сосудов жировой ткани в результате усиленного воздействия СНС. 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 (Kalil and Haynes, 2012). Вызванная ожирением избыточная активация СНС ведет к повышенной стимуляции катехоламинами $\alpha 1A$ -АР на поверхности клеток сосудов ткани, что приводит к усилению вазоконстрикции и развитию артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Однако при стабильном повышенном воздействии катехоламинов на МСК жировой ткани, вызванном ожирением, усиление контрактильности сосудов происходит не у всех пациентов. У ряда пациентов, страдающих ожирением, на фоне гиперактивации СНС артериальная гипертензия не развивается (Kotchen, 2010).

Мы проанализировали функциональную активность МСК у пациентов двух экспериментальных групп: 1. пациентов с ожирением, сопровождающемся развитием артериальной гипертензии, и 2. пациентов с ожирением, но не сопровождающемся развитием артериальной гипертензии. 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 (Williams et al., 2018; Кобалава et al., 2020). Мы выдвинули следующую гипотезу развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением: вследствие повышенной активности СНС при ожирении происходит инициация МСК (Рис. 24). Как следствие, на поверхность перicyтов/МСК выходит дополнительное количество $\alpha 1A$ -АР, что мы и видим на иммунофлуоресцентном окрашивании срезов жировой ткани. Кроме того, появление ГМК, положительных по экспрессии $\alpha 1A$ -АР, можно связать с дифференцировкой МСК в ГМК, которую мы выявили при помощи scRNAseq. Мы проверили гипотезу о возможной связи механизма инициации МСК, ассоциированной с выходом на поверхность клеток $\alpha 1A$ -АР, и направления МСК в контрактильный фенотип. Мы выделили МСК из пациентов двух вышеописанных групп. На этих МСК мы определили способность к сенситизации клеток в ответ на действие норадреналина. Как видно из Рис. 25, сенситизация к норадреналину проявлялась только в МСК пациентов, страдающих АГ на фоне ожирения. МСК нормотензивных пациентов не проявляли норадреналин-зависимую сенситизацию к норадреналину.

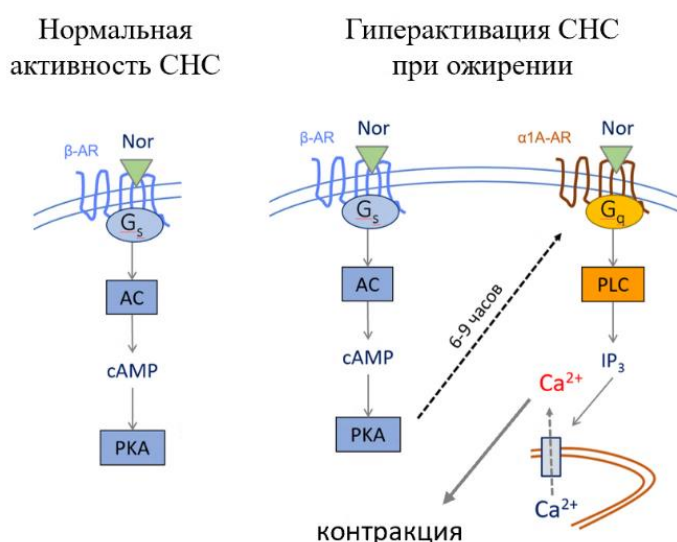


Рис. 24. Общая схема предположительного механизма развития АГ, ассоциированной с ожирением и ее связь с перmissивным эффектом инициации МСК на представленность $\alpha 1A$ -АР. Кратковременное действие норадреналина приводит к активации β -АР и цАМФ-зависимой сигнализации в ткани. При возникновении избыточной адренергической стимуляции сосудов происходит инициация МСК, что приводит к выходу на поверхность клеток $\alpha 1A$ -АР. Как следствие, контрактильные свойства сосудов возрастают. При продолжительном избыточном воздействии СНС на сосуды это может привести к развитию АГ.

Кроме того, уровень АД пациентов с ожирением достоверно коррелировал с величиной относительной сенситизации клеток (отношение числа отвечающих на норадреналин клеток после их предварительной обработки норадреналином к контрольной группе клеток, Рис. 25, А). Таким образом, возможность развития АГ, ассоциированной с ожирением, коррелировала со способностью МСК сенситизироваться в ответ на действие норадреналина.

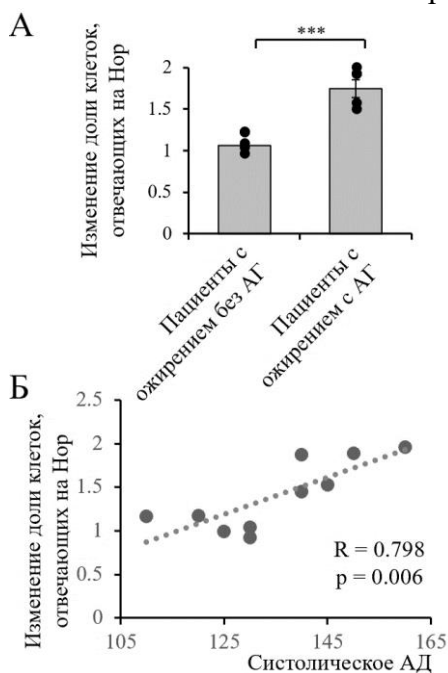


Рис. 25. Сенситизация МСК к норадреналину у пациентов с ожирением с/без артериальной гипертензией. R – коэффициент корреляции Пирсона; p – уровень значимости. Б. – Доля сенситизирующихся к норадреналину клеток у пациентов двух групп Ср.зн. \pm ст.ош. *** p < 0,001.

Обсуждение. Общая схема развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением

Общая схема развития АГ, ассоциированной с ожирением, исходя из полученных нами результатов, выглядит следующим образом. Ожирение приводит к повышению активности СНС, которая стимулирует АР в тканях, в том числе и в жировой. Поскольку при ожирении жировая ткань составляет существенную часть организма, составляя 30-45% от всей массы тела (Lee et al., 2013; Salans et al., 1973), ее кровеносные сосуды вносят ключевой вклад в общее периферическое сосудистое сопротивление. Норадреналин, интенсивно выделяемый гиперактивированной СНС, действует на β_3 -АР на МСК/перичитах сосудов, вызывая их переход в инициированное состояние. При этом на поверхности МСК в несколько раз повышается представленность α_1 -АР, являющихся ключевыми вазоконстрикторными АР для сосудов жировой ткани. Продолжение повышенной активности СНС приводит к стимуляции α_1 -АР на сосудах, контракции сосудов, а также к частичной дифференцировке МСК в ГКМ, что еще значительно усиливает контрактильный ответ сосудов. Как итог, развивается артериальная гипертензия, ассоциированная с ожирением. Рассматривая стимуляцию β_3 -АР как перmissive сигнал для МСК, который служит для их перевода в инициированное состояние, можно заключить, что стимуляция α_1 -АР и активируемой ими кальциевой сигнализации является инструктивным сигналом для направления МСК в контрактильный фенотип. При этом действие на сами α_1 -АР без предварительной инициации клеток не вызывает подобных эффектов, как показали на модели контракции МСК-коллагеновых дисков.

Инструктивные сигналы для адипогенной дифференцировки МСК

Активация β -АР приводит к подавлению дифференцировки МСК в белые адипоциты

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 направляли МСК в адипогенез коктейлем факторов инсулин, дексаметазон и ИВМХ после обработки клеток норадреналином по схеме двукратной обработки с интервалом 6 часов. В процессе адипогенной дифференцировки МСК накапливали жировые капли, которые возможно наблюдать под микроскопом без специальной окраски клеток, что мы далее использовали для наблюдения за адипогенной дифференцировкой в режиме реального времени. Ингибиторный анализ и использование специфических агонистов АР показал, что норадреналин подавлял адипогенную дифференцировку в белые адипоциты независимо от схемы его воздействия: однократного или двукратного с интервалом в 6 часов.

Адипогенная дифференцировка МСК в режиме реального времени на уровне единичных клеток

Адиipoциты в белой жировой ткани представлены несколькими различными фенотипами (Durandt et al., 2016). Для детального анализа того, как инициация МСК с последующим действием норадреналина влияет непосредственно на процесс адипогенной дифференцировки МСК и на фенотип образующихся адипоцитов, мы произвели прямое наблюдение за процессом дифференцировки в режиме реального времени под микроскопом. Схема эксперимента показана на Рис. 26, А. МСК высаживали на культуральные планшеты в плотности, преинкубировали норадреналином за 6 ч. перед съемкой, окрашивали кальций-чувствительным красителем Fluor-8 (4 μ M) и непосредственно под микроскопом повторно стимулировали норадреналином (Рис. 26, Б-В). Клетки, ответившие на норадреналин кальциевой сигнализацией, указаны красными точками. Далее клетки дифференцировали в адипогенном направлении непосредственно под микроскопом в течение двух недель (Рис. 27, А). После окончания съемки фильма мы проследили за дифференцировочной судьбой отдельных клеток, ответивших и не ответивших на норадреналин кальцием. Ни одна клетка, ответившая кальцием на норадреналин, не накопила крупные жировые капли. Цитоплазма таких клеток оставалась свободной от капель либо содержала много мелких жировых капель (Рис. 27, В). Клетки же, не ответившие кальцием на норадреналин, хорошо дифференцировались (Рис. 27, 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 может свидетельствовать о дифференцировке этих клеток в другой тип жировых клеток белой жировой ткани – бежевые адипоциты.

Последовательная стимуляция β -АР и $\alpha 1$ -АР приводит к бежевой дифференцировке МСК

Для проверки участия норадреналин-зависимой инициации МСК и появляющихся вследствие этого на поверхности клеток $\alpha 1$ A-АР 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). Одно- и двукратная обработка МСК норадреналином показала (Рис. 28), 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. Двукратное действие β -агониста добутамина подавляло экспрессию UCP1. Различные комбинации агонистов АР при их поочередной добавке с интервалом в 6 часов показали, что только комбинация добутамин \rightarrow 6 ч \rightarrow фенилэфрин, которая специфически имитирует инициацию МСК с последующей стимуляцией $\alpha 1$ -АР, вызывал эффект, аналогичный двукратному действию норадреналина. Те же агонисты, добавленные в другом порядке, не влияли на экспрессию UCP1. Как было сказано выше, норадреналин подавлял дифференцировку МСК в белые адипоциты через β -АР. Таким образом, стимуляция $\alpha 1$ -АР, выходящих на поверхность в результате инициации МСК, коммитировала клетки в сторону дифференцировки в бежевый фенотип адипоцитов, подавляя направление в белый фенотип.

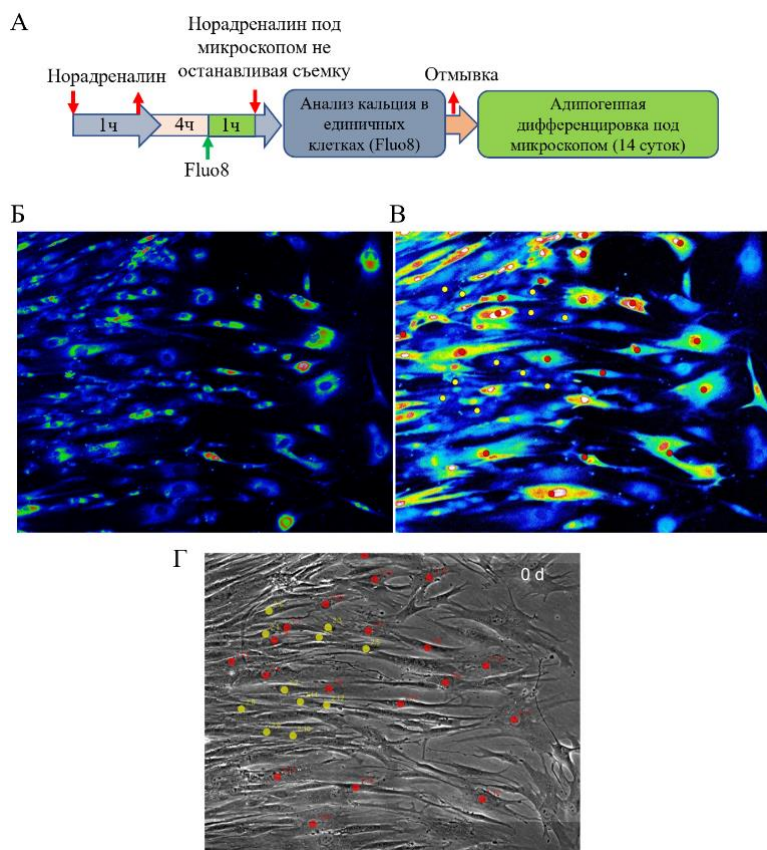


Рис. 26. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени после стимуляции клеток норадреналином. А. – схема эксперимента. Клетки были преинкубированы с норадреналином (1 μ M) в течение 1 часа, затем, через 4 ч окрашены Fluo-8. Кальциевый ответ на норадреналин регистрировали непосредственно под микроскопом. После этого направили МСК в адипогенную дифференцировку прямо под микроскопом. Б-В. Кальциевые ответы индивидуальных клеток в поле зрения микроскопа: базальная флуоресценция (Б) и после добавки норадреналина (В). Флуоресценция показана в режиме проекции максимальной интенсивности клеток на протяжении всего времени после стимуляции клеток. Красными точками отмечены клетки, ответившие кальцием на норадреналин, желтыми – не ответившие клетки. Г. – изображение того же поля зрения в проходящем свете.

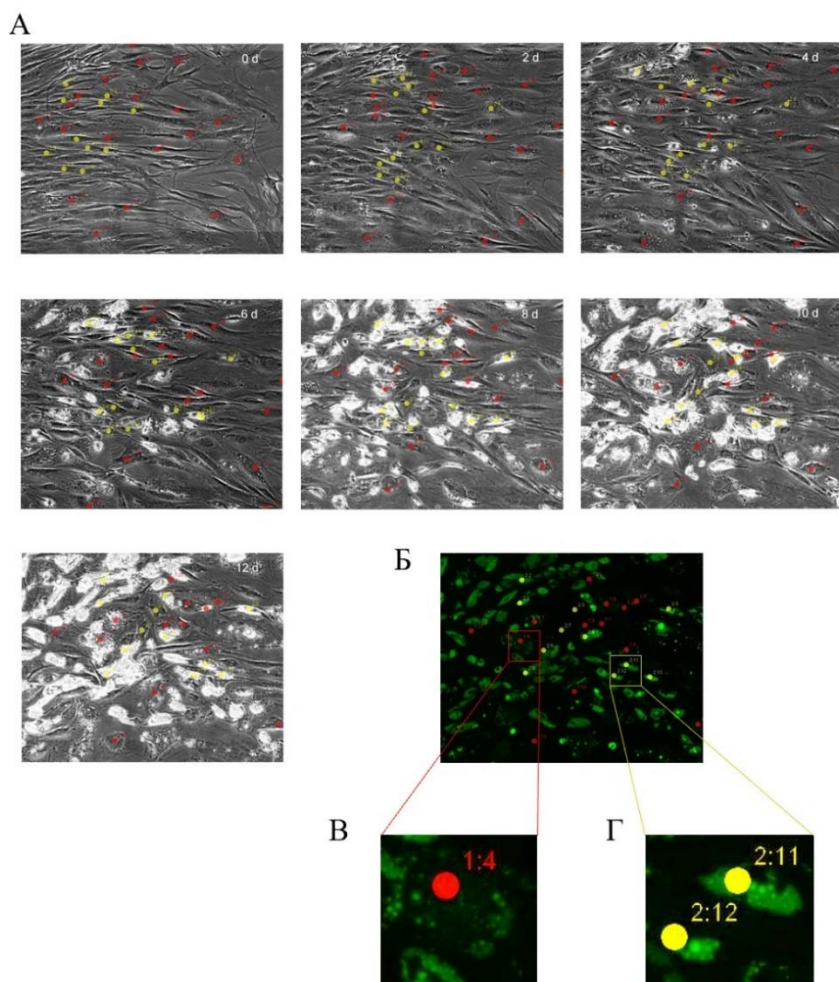


Рис. 27. Наблюдение за адипогенной дифференцировкой МСК в режиме реального времени на уровне единичных клеток. А. – Некоторые временные точки цейтраферного фильма, где отмечено местоположение клеток, за дифференцировочной судьбой которых проводили наблюдение. Б. – Окраска нейтральных липидов флуоресцентным красителем NileRed. В. – Пример клетки, которая отвечала кальцием на норадреналин, в ее цитоплазме выявляется большое количество жировых капель малого размера. Г. – Пример клеток, которые не ответили кальцием на норадреналин. Их цитоплазма набита крупными жировыми каплями.

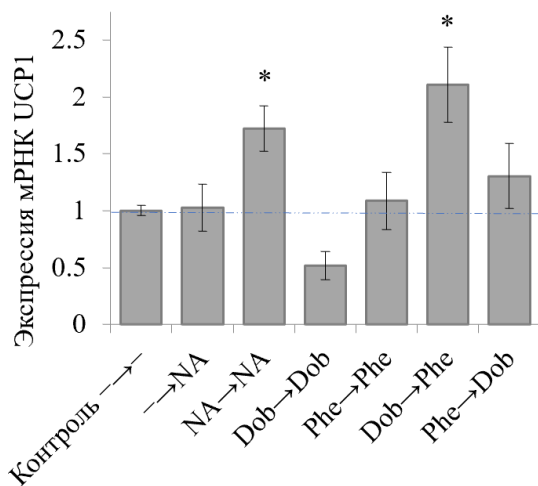


Рис. 28. Влияние комбинированной добавки агонистов $\alpha 1$ - и β -АР на экспрессию UCP1. Клетки стимулировали агонистом $\alpha 1$ -АР фенилэфрином (Phe, 100 μ M) и агонистом β -АР добутамином (Dob, 1 μ M) с интервалом в 6 часов в различных комбинациях. Комбинации первой и второй стимуляций указаны на рисунках через стрелку под соответствующим столбиком диаграммы. Ср.зн.±ст.ош. * $p < 0,05$.

Изоляция МСК, 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 $\alpha 1$ -АР, но функционально активной оказывалась лишь небольшая субпопуляция клеток. Таким образом, стандартные методики сортировки клеток с помощью антител к рецептору оказалось 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. Количество клеток, отделяемых по данному протоколу, было достаточно низким (0,44% на сортере против 5-14% при регистрации кальциевых ответов под микроскопом). МСК сортировали на две группы: клетки, обладающие высоким уровнем флуоресценции и клетки из нижнего квартиля гистограммы распределения флуоресценции по яркости. В контрольную и опытную группы отсортировали равное количество клеток (ок. 500 клеток). Клетки вырастили до достижения ими монослоя (на это ушло примерно 3 недели) и направили в адипогенную дифференцировку. На Рис. 29 приведены изображения клеток после 21 дня адипогенной дифференцировки.

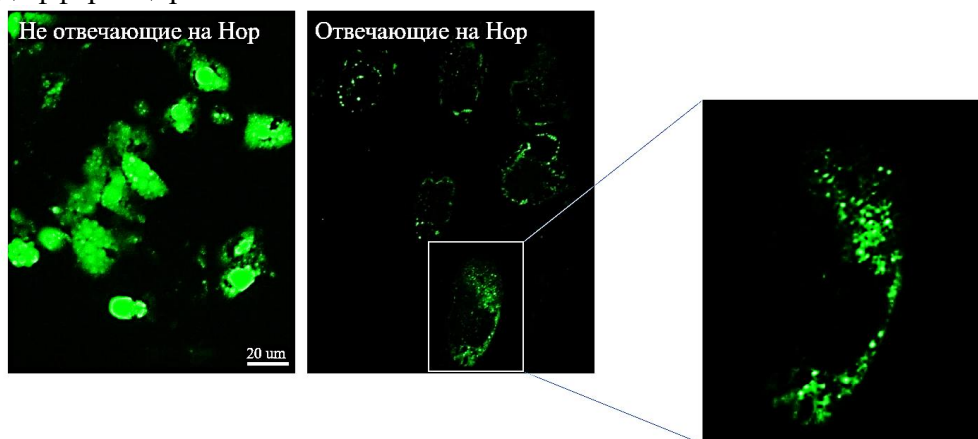


Рис. 29. МСК после сортировки по ответу на норадреналин через 21 день адипогенной дифференцировки. Жировые капли окрашены Nile Red.

Клетки, ответившие на норадреналин, не дифференцировались в характерные адипоциты. Они либо не содержали жировые капли, либо содержали жировые капли маленькие и многочисленные. В контрольной группе большинство клеток дифференцировалось в адипоциты характерного фенотипа. Таким образом, клетки, отвечающие кальцием на норадреналин, не дифференцировались в белые адипоциты, но приобретали фенотип, схожий с бежевыми адипоцитами.

Метаболические изменения в дифференцирующихся адипоцитах вследствие их коммитирования в бежевом направлении

Бежевые и бурые адипоциты образуют тепло за счет перестройки метаболизма: разобщение дыхательной цепи UCP1 приводит к тому, что митохондрии снижают свою роль в качестве источников АТФ, но при этом усиливают интенсивность дыхания. Гликолиз при этом усиливается. Мы проверили, изменяется ли метаболизм в МСК, направленных в адипогенную дифференцировку после обработки по схеме инициация → стимуляция $\alpha 1$ -АР при помощи прибора SeaHorse. Этот прибор измеряет закисление среды для регистрации интенсивности гликолиза и потребление кислорода для измерения интенсивности дыхания.

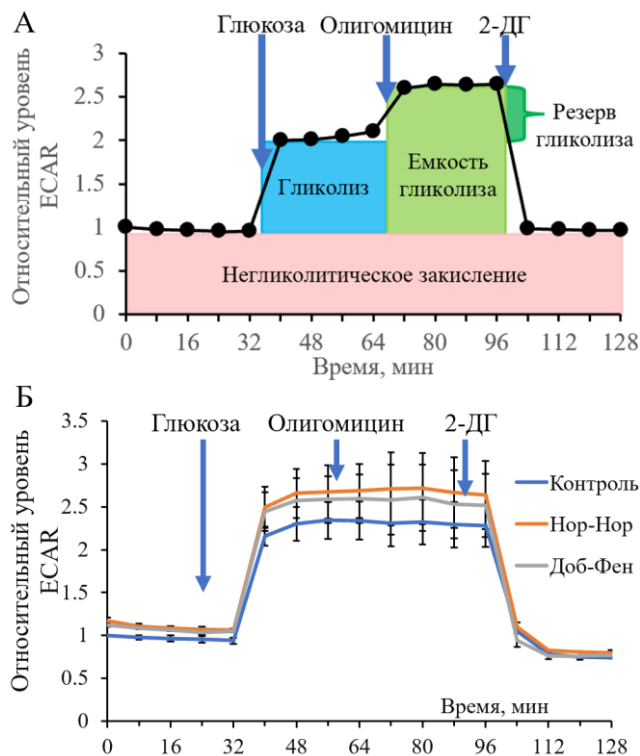


Рис. 30. Определение параметров гликолиза при помощи SeaHorse (измеряется закисление среды). А. – Схема измеряемых параметров гликолиза при помещении клеток в безглюкозную среду. Добавление глюкозы запускает гликолиз. Олигомицин выключает дыхание, гликолиз достигает максимальных значений. 2-дезоксиглюкоза (2-ДГ) выключает гликолиз. Б. – МСК подвергнуты двукратной обработке $1\mu\text{M}$ норадреналина (Нор-Нор) либо последовательно агонистом β -АР добутамином ($1\mu\text{M}$) и агонистом $\alpha 1$ -АР фенилэфрином ($100\mu\text{M}$) (Доб-Фен). Затем адипогенная дифференцировка. Через 14 дней измеряли параметры метаболизма.

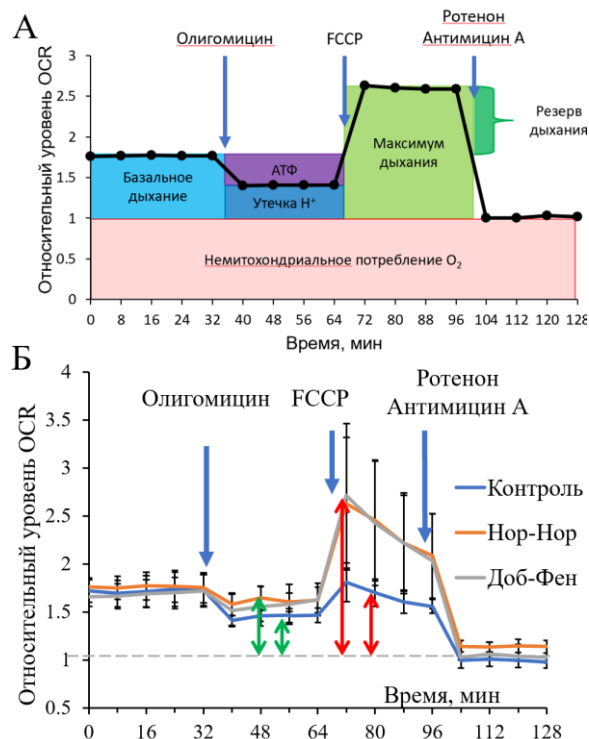
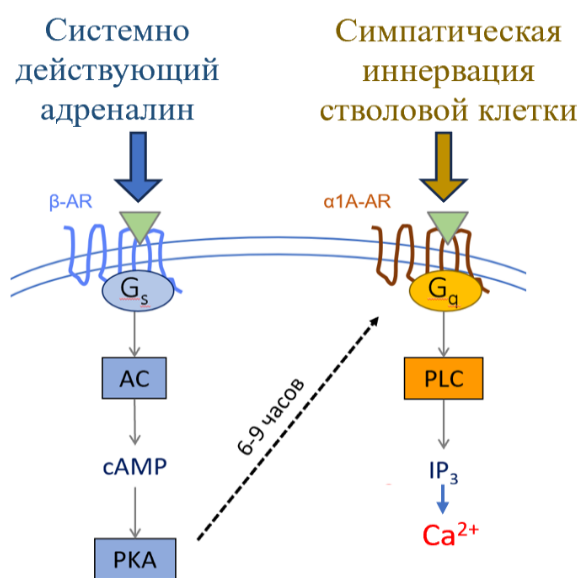


Рис. 31. Определение параметров дыхания при помощи SeaHorse (измеряется потребление кислорода). А. – Схема измеряемых параметров дыхания (среда с глюкозой). Олигомицин ингибирует АТФ-синтазу и вызывает гиперполяризацию. Разобщитель дыхательной цепи FCCP включает дыхание на максимальном уровне. Ротенон и антимицин А, блокаторы I и III комплексов дыхательной цепи выключают дыхание. Б. – МСК подвергнуты двукратной обработке $1\mu\text{M}$ норадреналина (Нор-Нор) либо последовательно агонистом β -АР добутамином ($1\mu\text{M}$) и агонистом $\alpha 1$ -АР фенилэфрином ($100\mu\text{M}$) (Доб-Фен). Затем адипогенная дифференцировка. Через 14 дней измеряли параметры метаболизма.

На Рис. 30 показаны результаты измерения интенсивности гликолиза, а на Рис. 31 – измерения дыхания в клетках, которые перед адипогенной дифференцировкой были подвергнуты двукратной обработке норадреналином (Нор-Нор), либо последовательно β -агонистом добутамином и через 6 часов α 1-агонистом фенилэфрином (Доб-Фен), либо в контроле растворителями. МСК, подвергнутые стимуляции α 1-АР после инициации показали повышенную емкость гликолиза и его работу в базальных условиях на максимальном уровне. Это согласуется с теоретическими изменениями в интенсивности гликолиза, которые происходят при бежевой дифференцировке клеток. На Рис. 31 показана оценка интенсивности дыхания в МСК с теми же обработками. 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. Полученные данные подтвердили участие α 1A-АР в коммитировании клеток в бежевую дифференцировку.

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 не-термонейтральные условия, когда на организм на протяжении длительного времени воздействует холод (Young et al., 1984). Во-вторых, эффект длительного охлаждения полностью воспроизводится при системном или внутрибрюшинном введении β 3-агониста Cl-316243 (Cousin et al., 1992). В настоящее время считается, что β 3-агонист имитирует системное действие адреналина, продукция которого повышается при стабильном воздействии холода на организм (Dronjak et al., 2007). Стоит отметить, что β 3-АР показывают схожее сродство к норадреналину и к адреналину (Ritter et al., 2020). Однако в ряде работ была показана ключевая роль СНС и локально продуцируемого норадреналина в реализации побурения белой жировой ткани



(Contreras et al., 2014). Мы предлагаем модель коммитирования МСК в направлении бежевых адипоцитов, которая решает имеющиеся в литературе разногласия (Рис. 32). Согласно нашему предположению, для коммитирования МСК в бежевые адипоциты требуется инициация МСК под действием системно действующего адреналина. Это приводит к выходу на поверхность МСК α 1A-АР. Далее на иницированную клетку должен прийти сигнал от СНС. Сигнальные каскады α 1A-АР приводят к коммитированию в направлении бежевой дифференцировки.

Рис. 32. Предполагаемый механизм совместного действия адреналина и СНС в коммитировании МСК в направлении бежевой адипогенной дифференцировки.

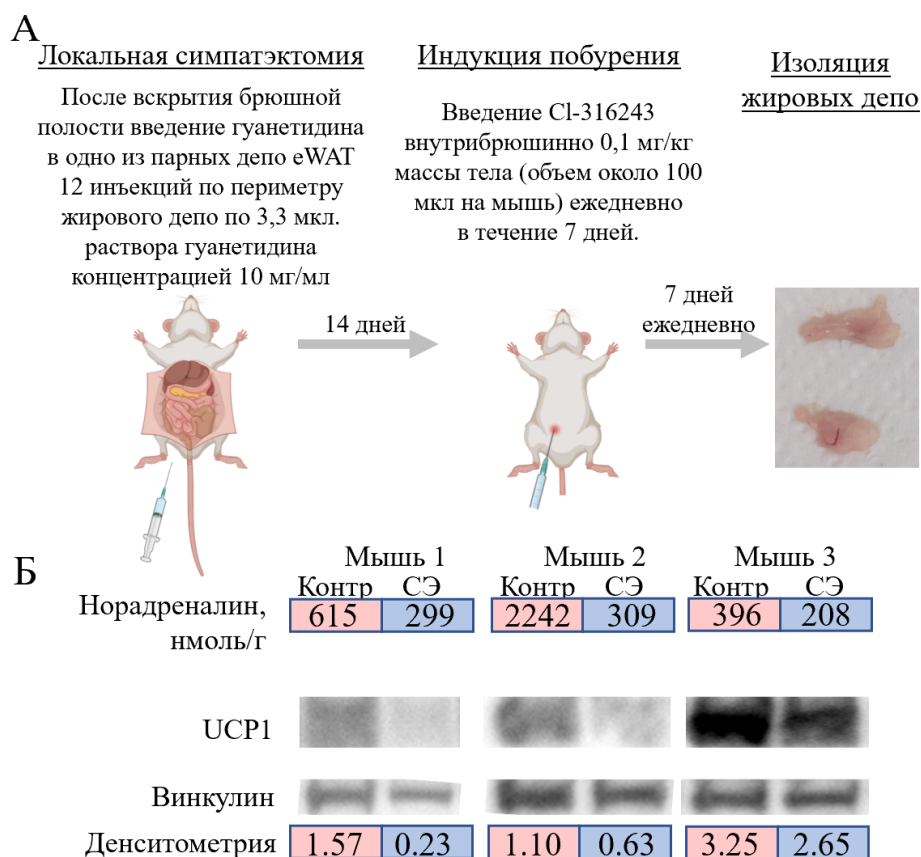
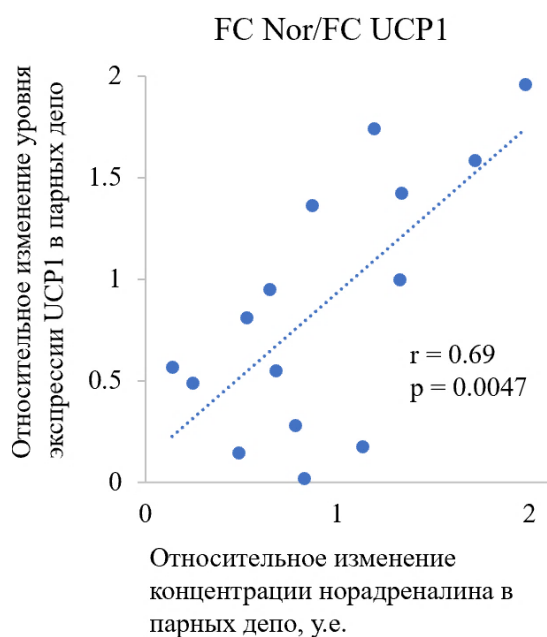


Рис. 33. Эксперимент по проверке гипотезы о необходимости поступления двух сигналов системного и локального для коммитирования МСК в направлении бежевой дифференцировки. А. – Схема эксперимента. Б. – Репрезентативные результаты измерения концентрации норадреналина в парных жировых депо, одно из которых было симпатэктомизировано (синий блок в каждой паре). Ниже представлены соответствующие мембраны вестерн-блоттинг анализа уровня экспрессии UCP1 в этих жировых депо.

Для проверки нашей гипотезы *in vivo* мы сделали следующий эксперимент (Рис. 33, А): мы сделали локальную симпатэктомию одного из парных эпидидимальных жировых депо (eWAT) мыши, а затем индуцировали побурение внутрибрюшинно введенным β 3-агонистом C1-316243. Такой эксперимент до сих пор в литературе не встречался. С точки зрения имеющихся моделей побурения белой жировой ткани он кажется абсурдным: мы убрали катехоламины, действующие на ткань локально (секреция из СНС), и добавили их системно (введением C1-316243). Второе интактное депо (закальвали растворитель) выступало в качестве внутреннего контроля. Мы протестировали несколько вариантов введения симпатэктомизирующих агентов 6-гидроксидофамина (6-OHDA) и гуанетидина: менее инвазивный через кожу и более точный с полостным доступом. Наилучшие результаты избирательной симпатэктомии показало локальное введение гуанетидина после вскрытия брюшной полости. Эффективность симпатэктомии мы проверили иммунофлуоресцентно путем покраски срезов контрольного и опытного депо жировой ткани на симпатические волокна (маркер тирозин-гидроксилаза). В параллельном эксперименте мы наладили методику индукции побурения белой жировой ткани у мышей при помощи внутрибрюшинного введения β 3-агониста C1-316243. В результате индукции побурения в белой жировой ткани появлялись очаги более мелких клеток, интенсивнее окрашиваемых при окраске гематоксилином – группы бежевых адипоцитов. Ни локальная симпатэктомию, ни индукция побурения по отдельности не влияли на равномерность экспрессии UCP1 между парными eWAT (вестерн-блоттинг).

На Рис. 33, Б показаны результаты измерения концентрации норадреналина в парных eWAT и соответствующий им уровень экспрессии UCP1 в тех же образцах. На диаграмме на Рис. 34 приведены результаты взаимного измерения концентрации норадреналина в парных жировых



депо и уровня экспрессии UCP1. Относительный уровень экспрессии UCP1 коррелирует и прямо пропорционален разнице в локальном уровне норадреналина в парных депо. При этом какой-либо зависимости уровня экспрессии UCP1 от абсолютных значений концентрации норадреналина мы не выявили. Таким образом, *in vivo* подтверждается гипотеза о том, что для индукции бежевой дифференцировки МСК требуется поступление двух сигналов: системного сигнала адреналина и локального воздействия норадреналина.

Рис. 34. 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. r – коэффициент корреляции Пирсона, p – вероятность ошибки.

Заключение

Обобщая полученные в данной работе результаты (см. схему на Рис. 35), 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 обладали сниженной чувствительностью к агонистам β -АР, которые являются ключевыми сенсорами катехоламинов в базальном состоянии. При этом клетки существенно сенситизировались к $\alpha 1$ -агонистам. Это приводило 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 $\beta 3$ -АР, 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 $\beta 3$ -АР не активировались, но клетки переходили в иницированное состояние, из которого далее в дифференцировку.

Далее, находясь в иницированном состоянии, МСК могли воспринимать 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 контрактильной дифференцировки являлась $\alpha 1A$ -АР-зависимая кальциевая сигнализация. Воздействие инсулина на МСК приводило к их дифференцировке в направлении белых адипоцитов. А вот если на клетках, иницированных воздействием $\beta 3$ -агониста, сперва простимулировать вышедшие на поверхность $\alpha 1A$ -АР, а затем подействовать инсулином, то они коммитировались в направлении бежевых адипоцитов. Эта траектория дифференцировки

перекликается с путем коммитирования бурых адипоцитов, которые происходят из миогенных Myf5⁺ предшественников (Rodgers and Sferruzzi-Perri, 2021). 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 $\alpha 1$ -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 $\alpha 1A$ -АР. 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 уже воспринимали инструктивный сигнал. Инструктивным сигналом для МСК являлась комбинация и последовательность подействовавших с определенными временными интервалами гормональных стимулов.

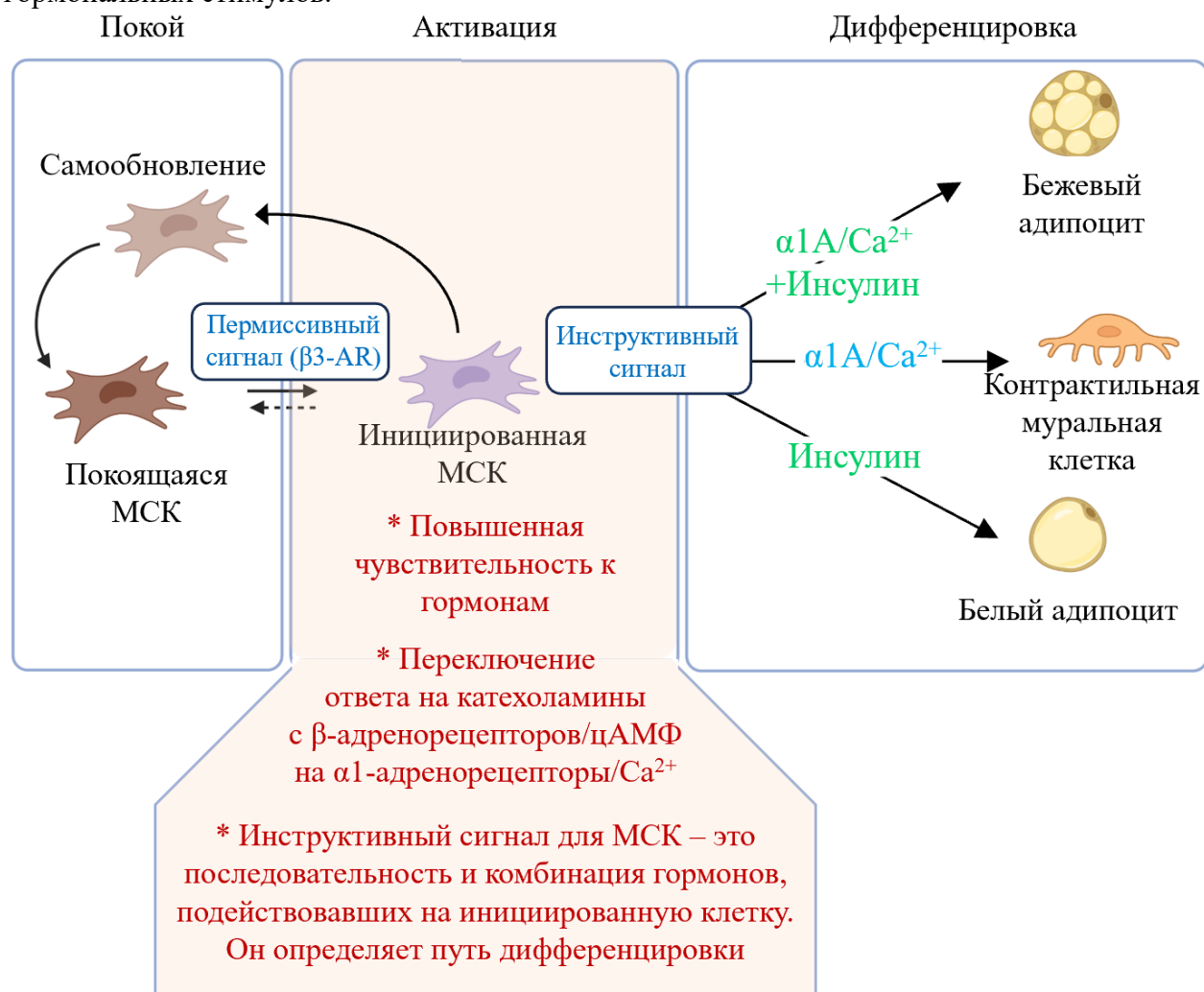


Рис. 35. Итоговая схема модели ранних этапов выбора направления дифференцировки МСК.

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, контрактильной 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, контрактильная 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 1А-адренорецепторы, что приводит к повышению чувствительности МСК к норадреналину.
5. Дифференцировка МСК в направлении гладкомышечных клеток (контрактильный фенотип) достигается путем β 3-адренорецептор-зависимой инициации клеток с последующей стимуляцией вышедших на поверхность клеток α 1А-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 инициированное состояние, однако адренергическая стимуляция МСК путем цАМФ-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 β 3-адренорецептор-зависимой инициации клеток с последующей стимуляцией α 1А-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 β 3-агониста получены указания на вклад данного механизма в формирование бежевого жира *in vivo*.

Список публикаций по теме диссертации в рецензируемых журналах, входящих в SCOPUS, WOS, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных

1. Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Воротников А.В. НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по

- механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ // Биофизика. – 2010. – Т. 55. – С. 1048-1056. doi.org/10.1134/S0006350910060126 (IF = 1,24, РИНЦ 2023)(1,0/0,7)*
2. Mishina N.M., **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. Does Cellular Hydrogen Peroxide Diffuse or Act Locally? // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – V. 14, №. 1. – P.1-7. doi.org/10.1089/ars.2010.3539 (IF = 6,6, WoS 2023) (1,0/0,5)*
3. Ткачук В.А., **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. // *Биологические мембраны*. – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 1–17. (IF = 0,6, РИНЦ 2023) (2,2/1,5)*
4. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Воротников А.В., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы выбора направления движения мезенхимными клетками. // *Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова* 2013 Т 9, № 3, с. 294-312 (IF = 0,37, РИНЦ 2023) (2,4/1,7)*
5. Котова П.Д., **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Рогачевская О.А., Фадеева Ю.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Колесников С.С. Кальций-индуцированный выброс депонированного кальция определяет триггерный характер ответов мезенхимальных стромальных клеток на норадреналин. // *Биологические мембраны*. – 2013. – Т. 30, № 5-6. – С. 422. doi.org/10.1134/S1990747813050085 (IF = 0,6, РИНЦ 2023) (0,9/0,2)*
6. Vorotnikov A.V., **Tyurin-Kuzmin P.A.** Chemotactic signaling in mesenchymal cells compared to amoeboid cells.// *Genes & Diseases*, 2014, Vol.1№2 – P.162-173. doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.006 (IF = 6,8, WoS 2023) (1,5/0,7)*
7. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. – 2014. – V.1843, №9. – P.1899-1908. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.002 (IF = 5,1, WoS 2023) (1,3/0,5)*
8. **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Zhdanovskaya N.D., Sukhova A.A., Sagaradze G.D., Albert E.A., Ageeva L.V., Sharonov G.V., Vorotnikov A.V. and Tkachuk V.A. Nox4 and Duox1/2 Mediate Redox Activation of Mesenchymal Cell Migration by PDGF // *PloS one*. – 2016. – V.11№. 4. – P.e0154157. doi.org/10.1371/journal.pone.0154157 (IF = 3,7, WoS 2023) (2,90/1,5)*
9. **Тюрин-Кузьмин П. А.**, Ждановская Н. Д., Сагарадзе Г. Д., Сухова А. А., Воротников А. В. Редокс-зависимая активация PI3-киназы участвует в пролиферативной реакции фибробластов на действие факторов роста. // *Биологические мембраны*. – 2016. – Т. 33. № 6. – С. 398-405. doi.org/10.1134/S199074781604022 (IF = 0,6, РИНЦ 2023) (1,0/0,7)*
10. **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Fadeeva J.I., Kanareikina M.A., Kalinina N.I., Sysoeva V.Yu., Dyikanov D.T., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A. Activation of β -adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells // *Scientific Reports*. – 2016. – V.6. – P. 32835. doi:10.1038/srep32835 (IF = 4,6, WoS 2023) (1,2/0,9)*
11. Sysoeva V.Y., Ageeva L.V., **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Sharonov G.V., Dyikanov D.T., Kalinina N.I., Tkachuk V.A. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor. // *Stem cell research*, – 2017 – Vol.3 №25 – P.115-122. doi.org/10.1016/j.scr.2017.10.022 (IF = 1,2, WoS 2023) (1,0/0,3)*
12. **Tyurin-Kuzmin P. A.**, Karagyaur M. N., Rubtsov Y. P., Dyikanov D. T., Vasiliev P. A., Vorotnikov A. V. CRISPR/Cas9-mediated modification of the extreme C-terminus impairs PDGF-stimulated activity of Duox2. // *Biological chemistry*. – 2018. – V.399, №5. – P.437-446. doi.org/10.1515/hsz-2017-0229 (IF = 3,7, WoS 2023) (1,2/0,7)*

13. **Tyurin-Kuzmin P. A.**, Dyikanov D. T., Fadeeva J.I., Sysoeva V.Yu., Kalinina N.I. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // *Scientific Data*. – 2018. – V.5. – P.180196. doi: 10.1038/sdata.2018.196 (IF = 9,8, WoS 2023) (1,0/0,7)*
14. **Tyurin-Kuzmin P.**, Chechekhin V., Ivanova A., Dyikanov D., Sysoeva V., Kalinina N., Tkachuk V. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V.19, № 12. – P. 3712. doi.org/10.3390/ijms19123712 (IF = 5,6, WoS 2023) (1,37/1,0)*
15. Maximchik P., Abdrakhmanov A., Inozemtseva E., **Tyurin-Kuzmin P.**, Zhivotovsky B., Gogvadze V. 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment // *FEBS Journal*. – 2018. – Т. 285. – №. 24. – С. 4590-4601. <https://doi.org/10.1111/febs.14687> (IF = 5,4, WoS 2023) (1,5/0,2)*
16. Dyikanov D.T., Vasiliev P.A., Rysenkova K.D., Aleksandrushkina N.A., **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Kulebyakin K.Y., Rubtsov Y.P., Shmakova A.A., Evseeva M.N., Balatskiy A.V., Semina E.V., Rostovtseva A.I., Makarevich P.I., Karagyaur M.N. Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock out genes of interest in aneuploid cell lines // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2019. – V. 25, №. 3. – P. 168-175. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0365> (IF = 3,0, WoS 2023) (1,0/0,2)*
17. **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Karagyaur M.N., Kulebyakin K.Y., Dyikanov D.T., Chechekhin V.I., Ivanova A.M., Skryabina M.N., Arbatskiy M.S., Sysoeva V.Y., Kalinina N.I., Tkachuk V.A. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V.21, №12. – P.4442. doi.org/10.3390/ijms21124442 (IF = 5,6, WoS 2023) (1,62/1,1)*
18. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Молчанов А.Ю., Чечехин В.И., Иванова А.М., Кулебякин К.Ю. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток млекопитающих. // *Биохимия*. – 2020. – Т.85, №3. – С.307-323. doi.org/10.1134/S0006297920030025 (IF = 2,91, РИНЦ 2021) (2,13/1,5)*
19. Pak V.V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O.G., Pedre B., **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Mishina N.M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Martínez Gache S.A., Demidovich A.D., Ermakova Y.G., Maslova Y.D., Shokhina A.G., Eroglu E., Bilan D.S., Bogeski I., Michel T., Vríz S., Messens J., Belousov V.V. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. // *Cell Metabolism*. – 2020. – V.3, №31. – P.642-653. doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02. (IF = 29, WoS 2023) (1,5/0,3)*
20. **Tyurin-Kuzmin P.A.**, Kalinina N.I., Kulebyakin K.Y., Balatskiy A.V., Sysoeva V.Y., Tkachuk V.A. Angiotensin receptor subtypes regulate adipose tissue renewal and remodelling. // *FEBS Journal*. – 2020. – V.287, №6. – P.1076-1087. doi.org/10.1111/febs.15200 (IF = 5,4, WoS 2023) (1,35/0,9)*
21. Kulebyakin K., **Tyurin-Kuzmin P.**, Efimenko A., Voloshin N., Kartoshkin A., Karagyaur M., Grigorieva O., Novoseletskaya E., Sysoeva V., Makarevich P., Tkachuk V. Decreased insulin sensitivity in telomerase-immortalized mesenchymal stem cells. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 9. – P.1-11 doi.org/10.3389/fcell.2021.662078 (IF = 5,5, WoS 2023) (1,34/0,5)*
22. Beloglazova I., Stepanova V., Zubkova E., Dergilev K., Koptelova N., **Tyurin-Kuzmin P.**, Dyikanov D., Plekhanova O., Cines D.B., Mazar A.P., Parfyonova Y. (2022). Mesenchymal stromal cells enhance self-assembly of a HUVEC tubular network through uPA-uPAR/VEGFR2/integrin/NOTCH crosstalk. // *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* – 2022 – V.1869, №1, P.119157. (IF = 5,1, WoS 2023) (1,37/0,2)*

23. Karagyaur M., Dyikanov D., **Tyurin-Kuzmin P.**, Dzhauari S., Skryabina M., Vigovskiy M., Primak A., Kalinina N., Tkachuk V. (2022). A novel Cre/lox71-based system for inducible expression of recombinant proteins and genome editing // *Cells*. – 2022. – V.11, №14. – P.2141. doi.org/10.3390/cells11142141 (IF = 6,0, WoS 2023) (1,88/0,5)*
24. Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Особенности регуляции гормональной чувствительности стволовых клеток // *Онтогенез*. – 2022. – Т. 53. № 3. – С. 163-172. doi.org/10.1134/S106236042203002X (IF = 0,73, РИНЦ 2023) (1,25/0,9)*
25. Arbatsky M., **Tyurin-Kuzmin P.**, Kulebyakin K., Chechekhin V., Kalinina N., Sysoeva V., Semina E., Rubina K. Points of Significance: Principal Component Analysis for Biocentric Data Visualization // *BioNanoScience*. – 2022. – V.12, №4. – 1366-1380. doi.org/10.1007/s12668-022-01021-w (SJR = 0,5, Scopus, 2023) (1,88/1)*
26. Chechekhin V. I., Kulebyakin K., Kokaev R. I., **Tyurin-Kuzmin P. A.** GPCRs in regulation of functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2022. – V.10. – 953374. doi.org/10.3389/fcell.2022.953374 (IF = 5,5, WoS 2023) (1,34/1)*
27. Хозяинова А.А., Валяева А.А., Арбатский М.С., Исаев С.В., Ямщиков П.С., Волчков Е.В., Сабиров М.С., Зайнуллина В.Р., Чечехин В.И., Воробьев Р.С., Меняйло М.Е., **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Денисов Е.В. Возможности комплексного анализа данных секвенирования РНК единичных клеток // *Биохимия*. – 2023. – Т. 88. № 2. – С. 171-198. doi.org/10.1134/S0006297923020074 (IF = 2,91, РИНЦ 2021) (2,75/1)*
28. Chechekhin V., Ivanova A., Kulebyakin K., Sysoeva V., Naida D., Arbatsky M., Basalova N., Karagyaur M., Skryabina M., Efimenko A., Grigorieva O., Kalinina N., Tkachuk V., **Tyurin-Kuzmin P.** Alpha1A-and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension. // *Cells*. – 2023. – V.12, №4. – P. 585. doi.org/10.3390/cells12040585 (IF = 6,0, WoS 2023) (1,88/0,9)*
29. Grigorieva O., Basalova N., Vigovskiy M., Arbatskiy M., Dyachkova U., Kulebyakina M., Kulebyakin K., **Tyurin-Kuzmin P.**, Kalinina N., Efimenko A. (2023). Novel Potential Markers of Myofibroblast Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing Analysis of Mesenchymal Stromal Cells in Profibrotic and Adipogenic Conditions. // *Biomedicines*. – 2023. – V.11, №3. – P.840. doi.org/10.3390/biomedicines11030840 (IF = 4,7, WoS 2023) (2,0/0,3)*
30. **Tyurin-Kuzmin P. A.**, Hayashi Y., Kulebyakin K. Functional heterogeneity of stem cells. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2023. – Т. 11. – P. 1179911. doi.org/10.3389/fcell.2023.1179911. (IF = 5,5, WoS 2023) (0,25/0,1)*
31. Chechekhin V. I., Ivanova A. M., Kulebyakin K. Y., Antropova Y. G., Karagyaur M. N., Skryabina M. N., Chechekhina E.S., Basalova N.A., Grigorieva O.A., Sysoeva V.Yu, Kalinina N.I., Tkachuk V.A., **Tyurin-Kuzmin P. A.** Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension // *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*. – 2024. – Т. 1871. – №. 2. – С. 119651. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119651 (IF = 5,1, WoS 2023) (1,37/1,0)*
32. Kulebyakina M., Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., **Tyurin-Kuzmin P.**, Kulebyakin K., Klychnikov O. Efimenko A. 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. – Т. 25. – №. 1. – С. 290. https://doi.org/10.3390/ijms25010290 (IF = 5,6, WoS 2023) (1,85/0,3)*
33. Chechekhin V. I. Kulebyakin K. Y., Kalinina N. I., **Tyurin-Kuzmin P. A.** Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline // *MethodsX*. – 2024. – V.12, P. 102587. doi.org/10.1016/j.mex.2024.102587 (IF = 1,9, WoS 2023) (0,9/0,5)*

34. Primak A., Kalinina N., Skryabina M., Usachev V., Chechekhin V., Vigovskiy M., Chechekhina E., Voloshin N., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Grigorieva O., **Tyurin-Kuzmin P.**, Basalova N., Efimenko A., Dzhauari S., Antropova Yu., Plyushchii I., Akopyan Zh., Sysoeva V., Tkachuk V., Karagyaur M. Novel Immortalized Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Line for Studying Hormonal Signaling. // International Journal of Molecular Sciences. – 2024 – Vol 25 №4, P. 2421. doi.org/10.3390/ijms25042421 (IF = 5,6, WoS 2023) (1,72/0,3)*

Статьи в рецензируемых сборниках статей:

1. Чечехин В.И., Иванова А.М., Кулебякин К.Ю., Калинина Н.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Сенситизация периваскулярных клеток к норадреналину – ключевой этап развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2023. – С. 182-187. (0,8/0,4)*
2. Чечехин В.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Анализ одиночных клеток сосудов указывает на ключевую роль перицитов в регуляции вазоконстрикции // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2023. – С. 618-622. (0,7/0,3)*
3. Исмаилова Д.Х., Мазалов В.В., Чечехин В.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Временная динамика изменения уровня $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов на поверхности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток после индукции гетерологической сенситизации // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2023. – С. 675-679. (0,5/0,3)*
4. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., Калинина Н.И., Ткачук В.А. Сигнальные механизмы формирования функциональной гетерогенности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2023. – С. 689-693. (0,5/0,2)*
5. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., Калинина Н.И. Функциональная гетерогенность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2021. – С. 149-153. (0,5/0,2)*
6. Антипин В.А., Карагяур М.Н., Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Мультипотентные стромальные клетки отвечают гетерогенно на сАМР-активирующие гормональные стимулы // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2021. – С. 22-26. (0,6/0,2)*
7. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., Калинина Н.И. Функциональная гетерогенность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в регуляции процессов дифференцировки // Новые технологии в рекреации здоровья населения. Материалы VII научно-практической конференции. Сб.статей. Владикавказ. – 2021. – С. 36-44. (1,0/0,8)*
8. Иванова А.М., Чечехин В.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Сысоева В.Ю., Калинина Н.И. У иммортализованных мезенхимных стромальных клеток, полученных из жировой ткани, нарушена чувствительность к норадреналину // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2019. – С. 455-459. (0,5/0,2)*
9. Чечехин В.И., Иванова А.М., Калинина Н.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Гормоны регулируют чувствительность мезенхимных стромальных/стволовых клеток к норадреналину при помощи гетерологической сенситизации // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2019. – С. 520-525. (0,7/0,4)*
10. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Арбатский М.С., Балацкий А.В., Балацкая М.Н., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И. Гетерологическая сенситизация адренорецепторов в мезенхимных стромальных клетках как механизм выбора направления дифференцировки // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2019. – С. 91-96. (0,7/0,5)*
11. Иванова А.М., Чечехин В.И., **Тюрин-Кузьмин П.А.** Роль нейромедиаторов в регуляции сигнальной активности мезенхимных стромальных клеток // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред.

А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2017. – С. 128-131. (0,5/0,2)*

12. **Тюрин-Кузьмин П.А.**, Фадеева Ю.И., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И. Сигнальные механизмы регуляции чувствительности мезенхимных стромальных клеток к норадреналину // Рец. Внутрикл. сигн. Сб.статей, ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – 2017.–С. 154-158. (0,6/0,3)*

13. Воротников А.В., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Аниол Н.В., Горюнов К.В., Кудряшова Т.В., Тюрин-Кузьмин П.А., Ткачук В.А. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации ткани.//Сб. статей "Стволовые клетки и регенеративная медицина" под ред. В.А. Ткачука, М. – 2012 г., изд. Макс-пресс. – С. 57-91. (4,25/1,2)*

* - Объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах.

Список сокращений:

Нор – норадреналин

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

СНС – симпатическая нервная система

МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

СК – стволовые клетки

АР – адренергические рецепторы

eWAT – эпидидимальное депо жировой ткани

α SMA – α -гладкомышечный актин